



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

**El hierro como regulador del crecimiento y de la producción de microcistinas en poblaciones naturales de *Microcystis* spp.**

**(Embalses de la región semiárida, Córdoba, Argentina)**

Florencia Ullmer

Directora: Dra. Silvana Halac

Codirectora: Dra. Ana Laura Ruibal


Lugar de Trabajo: Instituto Nacional del Agua

Año: 2023


**El hierro como regulador del crecimiento y de la producción de microcistinas en poblaciones naturales de *Microcystis* spp.**

**Tribunal Examinador**

- Nombre y Apellido: María Valeria Amé

Firma: 

- Nombre y Apellido: Inés Claudia Daga

Firma: 

- Nombre y Apellido: Raquel Murialdo

Firma: 

- Calificación: 10

Fecha: 29/11/23

# ÍNDICE

Agradecimientos.....	1
Financiamiento.....	2
Abreviaturas.....	3
Resumen.....	3
Palabras claves.....	4
Introducción.....	4
Marco teórico.....	6
Crecimiento poblacional de cianobacterias.....	6
Factores ambientales que influyen en el crecimiento de <i>Microcystis</i> spp.....	7
Disponibilidad de luz.....	7
Temperatura.....	7
Disponibilidad de nutrientes.....	7
Disponibilidad de nutrientes en el ESR y su relación con el crecimiento de cianobacterias.....	10
Factores biológicos que influyen en el crecimiento de <i>Microcystis</i> spp.....	11
Contenido de microcistinas y su relación con condiciones ambientales.....	11
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	13
Objetivos generales.....	13
Objetivos particulares.....	13
Materiales y Métodos.....	13
Área de estudio.....	13
Diseño experimental y muestreo.....	15
Determinación de parámetros fisicoquímicos y biológicos.....	24
Variables fisicoquímicas.....	24
Fósforo Reactivo Soluble y Hierro Soluble.....	24
Variables biológicas.....	24
Tamaño de Colonias, Abundancia Celular y Biovolumen.....	24
Determinación de MCs.....	26
Análisis de datos.....	27
Resultados.....	28
Experimento 1: Exposición de <i>Microcystis</i> spp. a diferentes concentraciones de Fe.....	28
Condiciones de experimentación.....	28

Crecimiento y contenido de MCs de <i>Microcystis</i> spp.....	31
Experimento 2: Exposición de <i>Microcystis</i> spp. a diferentes pulsos de Fe.....	37
Condiciones de experimentación.....	37
Crecimiento y contenido de MCs de <i>Microcystis</i> spp.....	40
Discusión.....	45
Crecimiento de las poblaciones de <i>Microcystis</i> spp. bajo diferentes concentraciones y pulsos de Fe	45
.....	45
Aumento de la abundancia celular bajo mayores concentraciones de Fe .....	45
El tamaño de colonias en respuesta al aumento de Fe.....	47
Contenido de microcistinas a distintas concentraciones y pulsos de Fe .....	48
Conclusiones .....	51
Limitaciones del estudio y recomendaciones a futuro .....	52
Bibliografía.....	53
ANEXO 1.....	61
Caracterización de la comunidad fitoplanctónica durante las floraciones de <i>Microcystis</i> spp.....	61
ANEXO 2.....	62
Experimento 1. Comprobación de supuestos y ANOVA .....	62
Variables fisicoquímicas.....	62
Variables Biológicas.....	64
ANEXO 3.....	72
Experimento 2. Comprobación de supuestos y ANOVA .....	72
Variables fisicoquímicas.....	72
Variables Biológicas.....	75
ANEXO 4.....	83
Volúmenes celulares en el Experimento 1.....	83
Volúmenes celulares en el Experimento 2.....	83

## **Agradecimientos**

Este proyecto de tesina de grado fue financiado por diversas instituciones y proyectos. En primer lugar agradezco al Instituto Nacional del Agua (INA) y a sus integrantes por abrirme las puertas y ofrecerme esta gran oportunidad. Gracias a la Actividad Permanente de Monitoreo del embalse San Roque, Gestión de Información de Calidad de Aguas y Cianobacterias en la Región Semiárida (Convenio Marco ACSA-INA suscripto el 28/08/2015 Expte INA 14285), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2014-3298), a People Marie Curie Actions (FP7-PEOPLE-2011-IRSES), al proyecto GRFT MINCyT Córdoba (Res. 000077), proyecto SECyT-UNC CONSOLIDAR-2018 (Res. 411-18) y al proyecto UCC (Res. 1084). Sin el aporte de los mismos no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Quiero agradecer a Luciana Mengo por colaborar en todo el periodo experimental tanto en el conteo de las cianobacterias como en la determinación de las variables; a Aldana Cativa por su participación en los experimentos y su gran aporte; a Flavia Garnerio por su apoyo en los experimentos y su ayuda en los conteos de cianobacterias y a Daniela Arán por su ayuda en la determinación del hierro.

También quiero agradecer a María Inés Rodríguez por los datos de monitoreo del embalse San Roque y su gran acompañamiento en el proceso; a Raquel Bazán por su gran apoyo y provisión de las muestras naturales.

Con todo corazón quiero agradecer a Silvana Halac que me ofreció esta oportunidad y me acompañó en este proceso con mucha empatía y dedicación. Gracias a su apoyo y al apoyo y dedicación de Ana Laura Ruibal Conti hoy puedo concluir este trabajo.

Agradezco a las integrantes del tribunal por su gran aporte constructivo y su predisposición en todo el proceso.

Gracias a la Universidad Nacional de Córdoba, pública y gratuita, por brindar tantas oportunidades, con una formación admirable y con tanto prestigio.

Lo más lindo de esta carrera fue haber ganado hermanas y hermanos por elección, vínculos que me llevo para siempre a donde vaya. Gracias a ellas y ellos pude crecer como persona y como estudiante y lo sigo haciendo cada día.

Además de los vínculos ganados en esta carrera, persistieron los que ya tenía. Mis hermanas por elección que me acompañaron desde antes que esto empezara y lo siguen haciendo cada día. Todas estas personas me hicieron sentir que cosas buenas debo haber hecho para tenerlos y tenerlas en mis días.

Gracias a Coqui por su amor. Al conocerla en el final de esta etapa me hizo sentirla como un nuevo comienzo.

Por último, y más importante, gracias a mi mamá que me acompañó con todas las formas de amar que puedan existir y hasta inventándose nuevas, junto a mis dos hermanos, mis grandes compañeros de todo lo que vivo día a día. Gracias a mis cuatro abuelos, que un par de lejos y otro par de cerca me dieron todo el amor que tenían y, junto a mi papá, después me enseñaron que el amor no sólo existe en este plano.

## **Financiamiento**

- Actividad Permanente de Monitoreo del embalse San Roque, Gestión de Información de Calidad de Aguas y Cianobacterias en la Región Semiárida (Convenio Marco ACSA-INA suscripto el 28/08/2015 Expte INA 14285).
- PICT-2014-3298: *“Calidad microbiológica de dos embalses de usos múltiples: factores asociados a floraciones tóxicas e impacto en la salud humana”*.
- Proyecto GRFT MINCyT Córdoba (Res. 000077): *“Evaluación ambiental del embalse San Roque (Córdoba, Argentina). Calibración de datos provenientes de registros sedimentarios y de monitoreos de calidad de agua.”*.
- Proyecto SECyT-UNC CONSOLIDAR-2018 (Res. 411-18): *“Reconstrucción ambiental de sistemas acuáticos artificiales y naturales de la región central de Argentina. Evaluación temporal del impacto de la variabilidad hidroclimática y la actividad antrópica”*.
- Proyecto UCC (Res. 1084). *“Algas tóxicas en agua: evaluación de tratamiento alternativo doméstico para provisión de agua segura”*.

## **Abreviaturas**

ANOVA: Análisis de la varianza

E1: primer experimental

E2: segundo experimento

ERS: Embalse San Roque

ELM: Embalse Los Molinos

FeSol.: Hierro soluble

MCs: Microcistinas

PRS: Fósforo reactivo soluble

PT: Fósforo total

SEM: Error estándar de la media

## **Resumen**

Una problemática actual en los sistemas de agua dulce del mundo es la eutrofización cultural relacionada con el aporte de los nutrientes fósforo (P) y nitrógeno (N) de origen antrópico, lo que produce un aumento en la frecuencia y duración de las floraciones de cianobacterias. En condiciones eutróficas, las concentraciones de P y N son suficientes para el crecimiento de cianobacterias y se considera que algunos micronutrientes se vuelven limitantes para el crecimiento de dichas poblaciones. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del hierro (Fe) sobre el crecimiento de cianobacterias y el contenido de MCs en poblaciones naturales de *Microcystis* spp. Se llevaron a cabo experimentos de microcosmos con muestras naturales recolectadas durante dos eventos de floración de *Microcystis* spp. En el primer experimento se pusieron a prueba diferentes concentraciones de Fe (250, 500 y 1000  $\mu\text{gFe}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para determinar la concentración óptima para el crecimiento. El segundo fue expuesto a diferentes modos de adición de Fe (T1: un pulso y T2: dos pulsos) para imitar la liberación de Fe de los

sedimentos en condiciones de anoxia y el desplazamiento de las colonias de *Microcystis* spp. hacia las capas más profundas para incorporarlo. Con el primer experimento se pudo corroborar, bajo las condiciones experimentales establecidas, que el Fe es un factor promotor del crecimiento y que su rango óptimo de concentración para el crecimiento de *Microcystis* spp. en las condiciones experimentales dadas es entre 500 y 1000  $\mu\text{gFe} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Por otro lado, en el segundo experimento, las tasas de crecimiento no fueron significativamente diferentes entre T1 y T2; por lo tanto, los diferentes pulsos de Fe suministrados no tuvieron efectos diferentes sobre el crecimiento. En cuanto al contenido de microcistinas, la cuota de MCs en poblaciones naturales de *Microcystis* spp. no mostró una relación clara con los tratamientos de Fe. Este trabajo contribuye a la comprensión de los factores que afectan la proliferación de cianobacterias y el contenido de MCs, lo que a su vez ayudaría al desarrollo de estrategias para controlar y mitigar la formación de floraciones algales.

## **Palabras claves**

**Hierro, floraciones de cianobacterias, eutrofización, epilimnion, hipolimnion, *Microcystis* spp.**

## **Introducción**

Una problemática actual en los sistemas de agua dulce del mundo es la eutrofización cultural relacionada con el aporte de los nutrientes fósforo (P) y nitrógeno (N) de origen antrópico, lo que produce un aumento en la frecuencia y duración de las floraciones de cianobacterias (Schindler *et al.*, 2008; Le Moal, 2019). Estas floraciones causan problemas de sabor y olor y amenazan la seguridad del agua potable y suministro de alimentos así como pérdida del valor cultural y social de estas aguas (Wurtsbaugh, 2019). Algunas cepas de cianobacterias pueden ser toxigénicas, es decir, tienen la potencialidad de producir cianotoxinas; sustancias que afectan la salud de quienes consumen el agua y hacen uso recreativo de sistemas acuáticos eutrofizados (Chorus & Bartram, 1999). Se asume que la ingestión directa o indirecta de MCs a través de la cadena alimentaria es una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial y representan un gran desafío para la producción de agua potable segura (Rastogi *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2016).



Entre las cianobacterias formadoras de floraciones se encuentran especies de *Microcystis* que generalmente se presentan en altas concentraciones en lagos eutrofizados durante primavera, verano y/o otoño. Las microcistinas (MCs) son un grupo de hepatotoxinas producidas por varias especies de cianobacterias, entre ellas, algunas cepas de *Microcystis* spp. Las MCs son heptapéptidos monocíclicos que se sintetizan de forma no ribosomal por complejos enzimáticos. Se ha informado de la existencia de más de 85 variantes de MCs en la naturaleza. La eutrofización cultural es producida principalmente por las actividades agrícolas, urbanas e industriales que han aumentado drásticamente la contaminación acuática por N y P, generando condiciones de hipoxia que reducen la producción de peces y del resto de fauna acuática. (Wurtsbaugh, 2019).

En particular, gran parte de los embalses de la Región Semiárida de la provincia de Córdoba presentan la problemática de eutrofización cultural asociada a floraciones de cianobacterias frecuentes (Ruibal Conti *et al.*, 2005; Bazán *et al.*, 2014; Rodríguez & Ruiz, 2016). El embalse San Roque (ESR) y el embalse Los Molinos (ELM), ubicados en esta provincia, son la fuente de provisión de agua de la Ciudad de Córdoba y otras localidades aledañas. El ESR es utilizado principalmente como fuente de abastecimiento de agua potable para el 70% de los habitantes de la ciudad de Córdoba y adicionalmente para generación de energía hidroeléctrica, aporte hídrico para riego, control de inundaciones y desarrollo de diversas actividades recreativas (Rodríguez & Ruiz, 2016). El ESR es uno de los sistemas acuáticos más estudiados en la provincia de Córdoba, ya que desde hace varias décadas presenta un avanzado estado de eutrofización (hipereutrófico) y floraciones recurrentes de cianobacterias toxigénicas (principalmente *Microcystis* spp. y *Dolichospermum* spp.) (Scarafia 1995; Rodríguez 2003; Rodríguez & Ruiz 2016; Pussetto *et al.*, 2020). Al respecto, se confirmó tanto la presencia de las cianotoxinas MC y anatoxina-a, como un aumento de su concentración durante floraciones o posterior a ellas cuando las especies de cianobacterias ya no son dominantes (Amé *et al.*, 2003, Ruibal Conti *et al.*, 2005, Ruiz *et al.*, 2013).

El uso del suelo de la cuenca del ESR muestra una alta influencia urbana, aunque algunas áreas están parcialmente modificadas a pastizales manejados para la cría de ganado vacuno, mientras que una pequeña porción de la cuenca está ocupada por plantaciones forestales. El desarrollo urbano intenso sin una infraestructura y planificación adecuadas está transformando en gran medida la cuenca (Halac *et al.*, 2020). El cambio de uso del suelo a ocupación urbana

se ha incrementado notablemente en la principal ciudad costera (Villa Carlos Paz), y en varias ciudades (*e.g.*, Cosquín y La Falda) y pequeños poblados ubicados junto a los ríos tributarios (Mengo *et al.*, 2022). Por lo tanto, la principal fuente de contaminación está representada por los desechos domésticos humanos (que contienen principalmente bacterias, materia orgánica y nutrientes), ya que el ESR recibe descargas de aguas residuales sin tratar tanto de fuentes directas como difusas (Halac *et al.*, 2019). Además, la deforestación y los incendios causan pérdidas frecuentes de suelo y vegetación en la cuenca, lo que incrementa el proceso de eutrofización (Rodríguez & Ruiz, 2016).

El ELM presenta actualmente un estado eutrófico ya que en las últimas décadas las intensas presiones antrópicas relacionadas con actividades agrícolas y expansión urbana han causado la degradación de la cuenca. En las primeras décadas se destacó el uso agropecuario en todo el perillago del embalse. A partir del año 2005 se hace notorio el crecimiento de los asentamientos urbanos en la zona del perillago (*e.g.*, Potrero de Garay) y sobre los ríos tributarios (*e.g.*, Los Reartes); con el consecuente cambio en el uso del suelo (Bazán *et al.*, 2014). Como consecuencia, el ELM ha experimentado un avance en el estado trófico, una degradación de la calidad del agua y múltiples floraciones de algas (Bazán *et al.*, 2014; Bonansea *et al.*, 2018; Bonansea *et al.*, 2021).

## **Marco teórico**

### **Crecimiento poblacional de cianobacterias**

Las curvas de crecimiento de microalgas reflejan las distintas fases por las cuales los cultivos estáticos atraviesan. La primera fase, fase lag, se caracteriza por un crecimiento celular mínimo. La duración de esta fase es variable dependiendo del inóculo inicial. Luego se presenta la fase de crecimiento exponencial donde la población tiene un crecimiento sostenido debido a que el incremento celular supera al de muerte. Luego, cuando los nutrientes empiezan a consumirse, la población entra en una fase estacionaria. Aquí la tasa de crecimiento se hace cero, pues el recambio de células (generación de nuevas células y muerte celular) se hace constante en el tiempo (MacIntyre & Cullen, 2005).

Para la medición del crecimiento de los cultivos se utilizan distintos parámetros que indican el aumento de la concentración de células a lo largo del tiempo. Es importante destacar que estos parámetros son calculados durante la fase exponencial de crecimiento de las poblaciones en los cultivos.

La tasa intrínseca de crecimiento ( $\mu$ ) mide el incremento de una población por unidad de tiempo. El tiempo de duplicación (T2) expresa el tiempo en el cual la población consigue duplicarse. Así un menor tiempo de duplicación implica un crecimiento más rápido de la población.

## **Factores ambientales que influyen en el crecimiento de *Microcystis* spp.**

### **Disponibilidad de luz**

La intensidad de la luz resulta un factor importante en la dinámica de las poblaciones de *Microcystis* spp. Cada especie en particular, presenta condiciones de luz óptimas para el crecimiento (Utkilen *et al.*, 1992). En respuesta a esto, muchas especies de cianobacterias regulan la flotabilidad, para adaptarse a las condiciones de luz más adecuadas. La flotabilidad de *Microcystis* spp. depende, entre otros factores, de la exposición a la luz, ya que afecta el contenido de vacuolas de gas y carbohidratos de las células (Ibelings *et al.*, 1991; Xiao *et al.*, 2012).

Según algunos autores la toxicidad de *M. aeruginosa* se incrementa, con un leve aumento de la intensidad de la luz (Pavlova *et al.*, 2010) por lo que la toxicidad decrecería en poblaciones de cianobacterias que se localicen a mayor profundidad en la columna de agua.

### **Temperatura**

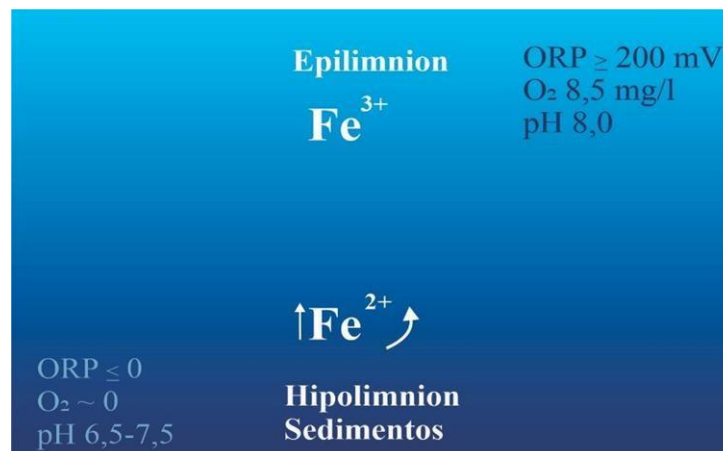
El rango de temperatura a la que generalmente se produce la tasa máxima de crecimiento de *Microcystis* spp. se encuentra entre 25 y 30 °C, según resultados experimentales con cultivos (Reynolds, 2006). Entre el valor mínimo y el valor óptimo de temperatura para cada especie, se produce un incremento de la tasa de crecimiento en función de la temperatura. Por encima del rango de temperatura óptima ocurre una disminución abrupta de la tasa de crecimiento.

### **Disponibilidad de nutrientes**

Los elementos que generalmente limitan el crecimiento del fitoplancton pueden ser N, P y Fe. El N es un elemento esencial en la composición de aminoácidos, de bases nitrogenadas y de las reservas celulares que se restringen a proteínas ricas en N. Este puede ser obtenido del agua a través de la incorporación activa como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  (o nitrógeno inorgánico

disuelto, NID). Dependiendo de la fuente de N, la fijación o asimilación puede requerir de varias etapas para reducirlo y es por ello que el  $\text{NH}_4^+$  es la fuente de N energéticamente menos costosa de metabolizar. La capacidad de fijar N atmosférico es generalmente considerada como una ventaja de algunas especies de cianobacterias (*e.g.*, *Dolichospermum* spp.) que utilizan esta fuente por sobre el resto de cianobacterias y fitoplancton para crecer en ambientes pobres en N (Carvajal, 2011).

Los altos requerimientos de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) del fitoplancton, combinado con un suministro ambiental restringido en relación a los otros nutrientes, determina que el P sea el principal elemento limitante del crecimiento fitoplanctónico en ambientes límnicos. Las cianobacterias poseen una gran capacidad de almacenamiento de P, elemento limitante de la producción en sistemas acuáticos continentales. En algunos casos el P almacenado les permite llevar a cabo de 2 a 4 divisiones celulares es por ello que resultan ser enormemente competitivas en estos ambientes (Long, 2001).

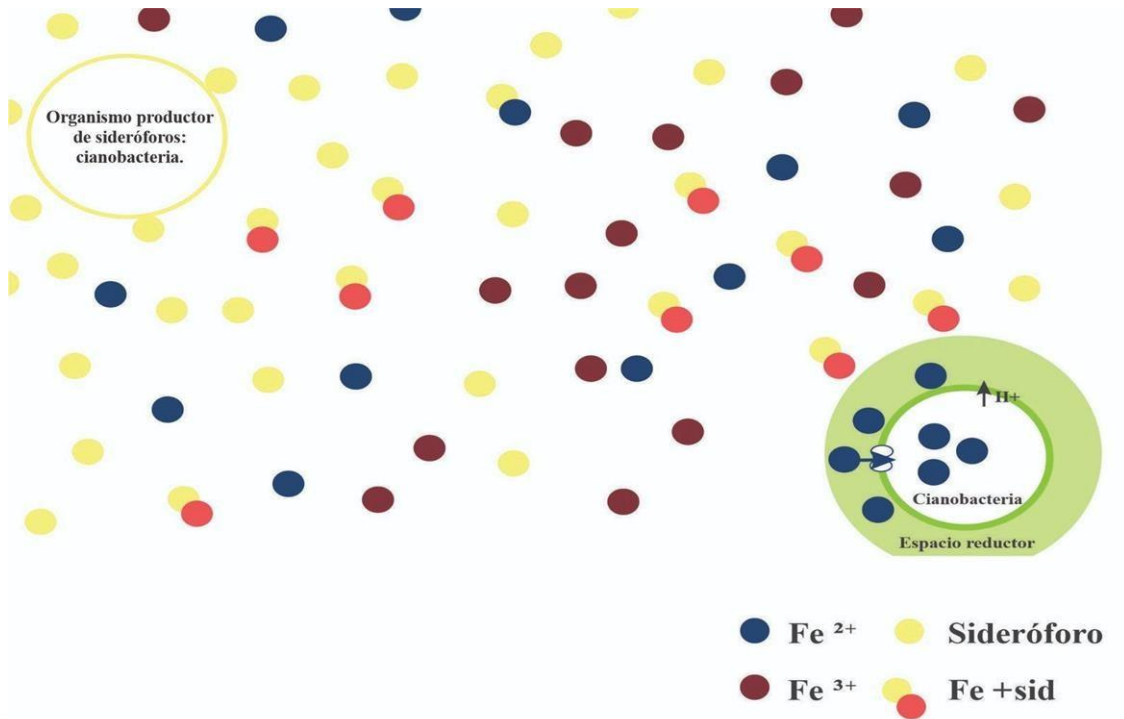


**Figura 1.** En este esquema se representan los estados iónicos del Fe dentro de la columna de agua. Además, se muestran los valores de potencial redox,  $\text{O}_2$  y pH en las capas más profundas y superficiales según lo que se postula en Wetzel, 1981.

En muchos medios naturales, el crecimiento del fitoplancton está limitado por la disponibilidad de Fe. Las cianobacterias son organismos que han desarrollado mecanismos eficaces para competir en la adquisición de Fe, por lo que presentan ventajas competitivas.

En el caso de las cianobacterias, el Fe es uno de los micronutrientes que tiene más altos requerimientos. Se conoce que las condiciones de anoxia en el hipolimnion promueven la proliferación de cianobacterias en aguas eutróficas al favorecer la liberación de  $\text{Fe}^{2+}$  (estado ferroso) y de P desde los sedimentos, así como su disponibilidad en la columna de agua. El  $\text{Fe}^{2+}$  permanece en estado reducido hasta que llega a aguas con mayor concentración de oxígeno, donde se oxida rápidamente a  $\text{Fe}^{3+}$  (estado férrico; Fig. 1). Por lo tanto, las cianobacterias deben migrar hacia aguas anóxicas para adquirir  $\text{Fe}^{2+}$  (Molot *et al.*, 2014). En aguas enriquecidas con P se pueden presentar condiciones de anoxia que favorecen la solubilidad de  $\text{Fe}^{2+}$ . Por otra parte, el  $\text{Fe}^{3+}$  es la forma más común que está presente en el medio acuático, pero este no se presenta tan soluble (Wetzel, 1981) (Fig. 1). Sin embargo, las cianobacterias presentan mecanismos de incorporación del  $\text{Fe}^{3+}$ , lo que les permiten competir favorablemente con otras microalgas eucariotas. Este metal es incorporado a las células en forma de  $\text{Fe}^{2+}$ , ya que de esta manera puede ser transportado a través de su membrana (Molot *et al.*, 2014) (Fig. 2). El  $\text{Fe}^{3+}$  puede cambiar a  $\text{Fe}^{2+}$  mediante fotorreducción, biorreducción y por medio de moléculas orgánicas quelantes de  $\text{Fe}^{3+}$ , denominadas sideróforos (Gress *et al.*, 2004; Hopkinson, 2009) (Fig. 2).

La variación en la concentración de Fe en la columna de agua, puede ser aprovechada por especies de cianobacterias con la capacidad de trasladarse a diversas profundidades (e.g., *M. aeruginosa*; Walsby & McAllister, 1987). Al respecto, se reporta que los cultivos con escasez de nutrientes suelen tener una flotabilidad reducida al disminuir el volumen de sus vesículas de gas y aumentar el contenido de carbohidratos, y, en consecuencia, es más probable que muestren una migración vertical ya que así aumentan la reserva de nutrientes. Por el contrario, con disponibilidad de nutrientes aumentan el volumen de sus vesículas de gas, metabolizan los carbohidratos de manera más eficiente y mantienen una mayor flotabilidad (Brookes & Ganf, 2001).



**Figura 2.** Esquema que representa la incorporación del Fe (posterior a su reducción a Fe<sup>2+</sup>) a las células según lo que se postula en Hopkinson, 2009.

## Disponibilidad de nutrientes en el ESR y su relación con el crecimiento de cianobacterias

En condiciones de hipereutrofia, como las presentes en el ESR, las concentraciones de P y N presentan valores superiores a los requeridos, (máximas de 1117 y 420  $\mu\text{g PT. L}^{-1}$  en las capas subsuperficiales y capas más profundas, respectivamente; y máximas de 570  $\mu\text{g}$  y 975  $\mu\text{g NID. L}^{-1}$  en las capas subsuperficiales y capas más profundas respectivamente, Tabla 1). Por lo tanto, en estas condiciones, el P y N no actuarían como factores limitantes para el crecimiento de cianobacterias, otros elementos podrían adquirir importancia como nutrientes reguladores. Un parámetro interesante a la hora de valorar riesgos de proliferaciones tóxicas es la concentración de Fe en los ambientes acuáticos (Forsgren *et al.*, 1992; Lukač, 1993; Xing *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016).

En el ESR, el Fe Total (FeT) en las capas sub-superficiales, presenta valores promedios bajos (120-140  $\mu\text{g. L}^{-1}$ ), mientras en capas profundas cercanas al sedimento (hipolimnion) se han registrado concentraciones de FeT hasta de 2600  $\mu\text{g. L}^{-1}$  (Tabla 1). Lo anterior se debería a la liberación de  $\text{Fe}^{+2}$  desde el sedimento a la columna de agua, proceso que es favorecido por condiciones de anoxia y pH bajos (ver Tabla 1 de Materiales y Métodos).

### **Factores biológicos que influyen en el crecimiento de *Microcystis* spp.**

La formación de colonias proporciona a *Microcystis* spp. muchas ventajas ecológicas, incluida la adaptación a diferentes intensidades de luz, el crecimiento con un suministro deficiente de nutrientes y protección contra factores causantes de estrés (Xiao *et al.*, 2018). Algunos trabajos han reportado que las poblaciones de *M. aeruginosa* conformadas por colonias de gran tamaño se ven favorecidas por alcanzar velocidades de flotación mayores, lo cual les permite desarrollar y mantener una gran biomasa cerca de la superficie de los lagos. Lo anterior resulta en la disminución de la disponibilidad de luz para poblaciones de otras especies con menor flotabilidad en capas más profundas. De esta manera se produce una exclusión competitiva y la dominancia de poblaciones de *M. aeruginosa* (Xiao *et al.*, 2018).

También la capacidad fotosintética de colonias de *Microcystis* spp. se ve menos afectada por la deficiencia de Fe que la forma unicelular, lo que indicaría que la morfología colonial mejora la fotoprotección y la aclimatación a condiciones de deficiencia de Fe (Li *et al.*, 2016).

### **Contenido de microcistinas y su relación con condiciones ambientales**

No todas las cepas de *M. aeruginosa* son productoras de MCs; estas diferencias se deben a la presencia o no de un grupo de genes que codifican la enzima microcistina sintetasa que la produce (Utkilen & Gjolme, 1995; Rastogi, 2014; Dai *et al.*, 2016). A su vez, la baja o alta producción de MCs se asocia principalmente a factores ambientales, tales como la concentración de N, P, Fe, intensidad de luz o temperatura (Amé *et al.* 2003, López Rodas *et al.*, 2012). Si bien la función que cumplen estos metabolitos tóxicos sigue siendo tema de investigación, algunos autores han aportado evidencias de que dichas funciones están relacionadas con la protección contra depredadores o para evitar la competencia de otras especies de fitoplancton o macrófitas (Pflugmacher, 2002; Jang *et al.*, 2007). Otros trabajos

proponen que son metabolitos secundarios sin función específica conocida (Babica *et al.* 2006).

Por otro lado, se demostró que la síntesis de MCs proporciona a las cepas tóxicas de *M. aeruginosa* una ventaja selectiva en condiciones de limitación de Fe al actuar como sideróforos intracelulares (Utkilen & Gjolme, 1995). Según estos autores, las MCs podrían actuar como un quelante intracelular que inactiva el  $Fe^{2+}$  celular libre y, la enzima sintetasa que las produce estar controlada por la cantidad de  $Fe^{2+}$  libre presente. Además, la estructura cíclica de las MCs muestra cierta semejanza con los sideróforos peptídicos producidos por otros organismos. Al respecto, hay evidencias de la estrecha relación entre la variación de Fe y la biosíntesis de MCs en *M. aeruginosa*, lo que sugiere que el Fe debe tenerse en cuenta durante el seguimiento de las floraciones de algas nocivas (Sevilla *et al.*, 2008; Alexova *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018). También Lukac y Aegerter (1993) y Lyck *et al.* (1996) demostraron que la falta de Fe aumenta la toxicidad de *M. aeruginosa*.

## **Hipótesis**

A pesar de la importancia ecológica y sanitaria de las floraciones de cianobacterias en los embalses de la Región Semiárida de la provincia de Córdoba, los estudios que se han realizado hasta el momento no permiten ver el crecimiento de dichas poblaciones a lo largo de una floración, ni los cambios fisiológicos de las células como la producción de MCs, ya que consisten en monitoreos mensuales de sus poblaciones y factores ambientales asociados. Este trabajo propuso poner a prueba mediante experimentos de microcosmos con poblaciones naturales de *Microcystis* spp., algunos factores que podrían ser los promotores de estas floraciones de cianobacterias en embalses de la Región Semiárida de la provincia de Córdoba y así ampliar y profundizar el conocimiento sobre el crecimiento de las poblaciones de cianobacterias y el contenido de MCs.

Las hipótesis propuestas en esta tesina son:

- 1.- El hierro es un factor promotor del crecimiento de poblaciones naturales de *Microcystis* spp. del ESR, cuando la temperatura, radiación y P se mantienen en los rangos óptimos para su desarrollo
- 2.- El hierro ejerce un efecto regulador negativo en el contenido de microcistinas.



## Objetivos

### Objetivos generales

- Contribuir al conocimiento sobre la regulación del crecimiento de poblaciones de *Microcystis* spp. y la contenido de microcistinas.
- Aportar herramientas para el estudio de la dinámica y predicción de las floraciones de cianobacterias.

### Objetivos particulares

- Diseñar experimentos con poblaciones naturales de *Microcystis* spp. que permitan controlar algunos factores ambientales como luz, temperatura y concentración de fósforo y hierro.
- Caracterizar el crecimiento de las poblaciones de *Microcystis* spp. y el contenido de microcistinas bajo diferentes concentraciones de hierro.

## Materiales y Métodos

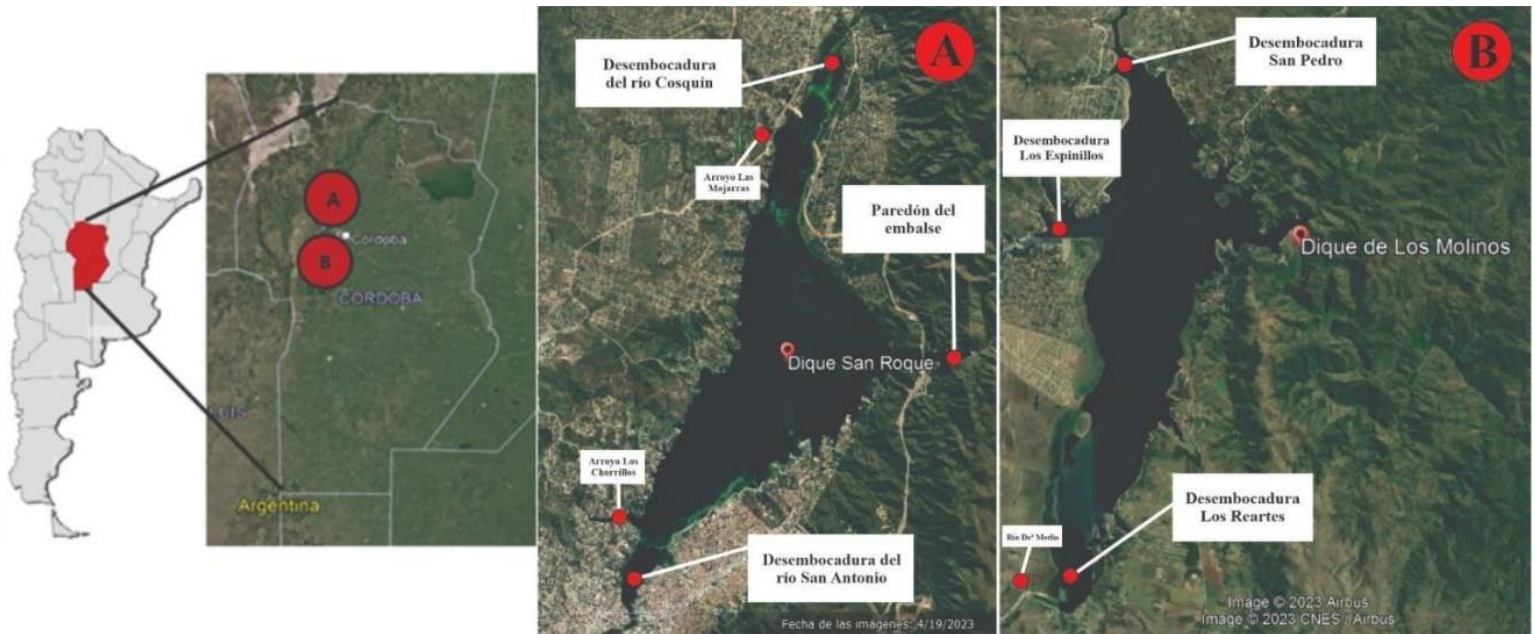
### Área de estudio

En este estudio se seleccionaron dos embalses situados en la Región Semiárida, Córdoba, Argentina, el Embalse San Roque (ESR) y el Embalse Los Molinos (ELM), (Fig. 3). Dichos embalses fueron seleccionados ya que presentan un estado de eutrofización avanzado y floraciones de cianobacterias frecuentes. El ESR presenta un alto nivel de deterioro en la calidad de sus aguas desde hace décadas y se ha definido como hipereutrófico desde el 2011 (Rodríguez & Ruiz, 2016), mientras que el ELM se considera que hasta el año 2007 presentó un estado mesotrófico con tendencia a la eutrofia y desde aproximadamente el año 2011 se encuentra en estado eutrófico (Bazán *et al*, 2014).

El ESR (Fig. 3 A) se encuentra ubicado en el Valle de Punilla aproximadamente a 40 km de la Ciudad de Córdoba (31°22'S 64°28'O). A nivel de cota de vertedero (35,3 m), la superficie del embalse es de 15 km<sup>2</sup>, con 201 hm<sup>3</sup> de volumen y una profundidad media de 13,4 m. Los cuatro tributarios principales que llegan al ESR son: río San Antonio, río Cosquín, arroyo Las

Mojarras y arroyo Los Chorrillos, siendo su único emisario el río Suquía. La cuenca hidrográfica abarca 1,750 km<sup>2</sup>.

El ELM (Fig. 3 B) se encuentra aproximadamente a 70 km de la Ciudad de Córdoba (31°50'S 64°32'O) en el Valle de Paravachasca. Almacena el agua de una cuenca hidrográfica de 980 km<sup>2</sup>. El reservorio tiene una superficie de 24,5 km<sup>2</sup> y un volumen de 399 hm<sup>3</sup>; la cota máxima es de 57 m. Se alimenta principalmente de las aguas procedentes de cuatro grandes ríos: San Pedro, Espinillos, del Medio y Los Reartes.



**Figura 3.** Localización de los embalses San Roque (A) y Los Molinos (B). Córdoba, Argentina. (Google Earth Pro, año 2023).

## **Diseño experimental y muestreo**

Se llevaron a cabo experimentos con poblaciones naturales de *Microcystis* spp. provenientes de los embalses San Roque (Figura 4) y Los Molinos (Figura 5), en las estaciones de otoño (marzo 2017) y verano (febrero 2018) respectivamente. Si bien la mayor proporción de especies de *Microcystis* de las muestras utilizadas en E1 y E2 correspondió a *M. aeruginosa*, para mayor precisión en este trabajo nos referimos a *Microcystis* spp.

Dada la dificultad para trabajar en campo con poblaciones naturales se utilizaron microcosmos, que son “sistemas cerrados”, en los cuales una parcela de agua es incubada en condiciones similares al ambiente natural. En este tipo de experimentos la biomasa de fitoplancton tiende a aumentar rápidamente y, por lo tanto, a menudo reproduce las condiciones de floración (Cao *et al.*, 2021). Estos dispositivos hacen posible llevar a cabo incubaciones de poblaciones de microalgas de una manera controlada, permitiendo la manipulación de algunas variables ambientales en su interior (Belzile *et al.* 2006, Halac *et al.* 2011). Para ello, se tomaron en cuenta los datos de variables ambientales y cuantificación de cianobacterias obtenidos de la actividad permanente “*Monitoreo del Embalse San Roque y Gestión de Información de Calidad de Aguas y Cianobacterias*” llevada a cabo por el Área de Limnología Aplicada y Calidad del Agua del INA-CIRSA desde 1999 hasta la actualidad (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas del embalse San Roque en primavera (Pri.), verano (Ver.) y otoño (Oto.) en el centro del embalse (para la subsuperficie y las capas más profundas de la columna de agua). Las mediciones mensuales obtenidas del período 1999-2018 se presentan como valores de la mediana, mínimos y máximos. Los datos fueron proporcionados por la actividad permanente “Monitoreo del Embalse San Roque y Gestión de Información de Calidad de Aguas y Cianobacterias” (INA-CIRSA).

Variables fisicoquímicas en <i>Primavera, Verano y Otoño</i>		Capa subsuperficial (0,5 m debajo de la superficie)			Capa más profunda (1 m por encima del fondo)		
		Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.
Temperatura del agua (°C)	<i>Pri.</i>	21,3	13,1	27,6	18,7	12,9	21,1
	<i>Ver.</i>	24,6	21,1	28,7	22,8	16,7	25,9
	<i>Oto.</i>	18,9	12,0	24,5	18,4	11,5	23,4
Conductividad ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	<i>Pri.</i>	272	194	492	267	103	494
	<i>Ver.</i>	213	128	335	180	76,6	329
	<i>Oto.</i>	178	100	338	178	108	336
pH	<i>Pri.</i>	8,2	6,5	9,8	7,6	6,1	9,2
	<i>Ver.</i>	8,4	6,8	9,7	7,2	6,1	8,5
	<i>Oto.</i>	7,6	6,0	9,2	7,6	6,1	8,5
Oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<i>Pri.</i>	9,3	2,8	15,3	4,7	0,0	11,3
	<i>Ver.</i>	8,4	4,4	16,7	1,0	0,0	9,6
	<i>Oto.</i>	8,0	3,7	22,3	6,7	0,0	11,1
Fósforo total ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<i>Pri.</i>	66	14	392	61	10	322
	<i>Ver.</i>	94	10	1117	127	30	420
	<i>Oto.</i>	74	35	240	76	27	756
Hierro total ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<i>Pri.</i>	120	$\leq 50$	830	160	$\leq 50$	1300
	<i>Ver.</i>	120	$\leq 50$	950	290	$\leq 50$	2600
	<i>Oto.</i>	140	$\leq 50$	310	180	$\leq 50$	1570
Nitrógeno inorgánico disuelto ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<i>Pri.</i>	435	143	849	532	146	1248
	<i>Ver.</i>	147	56	570	345	85	975
	<i>Oto.</i>	346	138	655	376	146	713



**Figura 4.** Foto tomada en el embalse San Roque, Córdoba, Argentina, en la cual se observan las floraciones de cianobacterias.



**Figura 5.** Foto del embalse Los Molinos, Córdoba, Argentina, en la cual se observan las floraciones de cianobacterias.

Los microcosmos se construyeron con bolsas de polietileno transparentes al espectro de radiación solar y fueron llenados con agua del ESR (Experimento 1: E1) y del ELM (Experimento 2: E2) (~1,2-2,5L), previamente filtrada (4-11 $\mu$ m de poro) y esterilizada mediante autoclave. Posteriormente se colocaron en un contenedor con agua corriente (Figura 6 y 7).

El diseño experimental y las condiciones no fueron iguales para los dos experimentos. En el E1 (Fig. 6) la temperatura y la radiación de luz no estuvieron controladas, sino en función de las condiciones de temperatura ambiente dentro del laboratorio (26-28 °C medida con la sonda

multiparamétrica) y de la luz natural (2500 lux medida con un luxómetro). Por otro lado, en el E2, los microcosmos se mantuvieron bajo condiciones de radiación y temperatura uniformes. Para ello se estableció un sistema controlado de radiación mediante un arreglo de tubos fluorescentes ( $43,53 \pm 3,17 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ ) conectado a un temporizador con un fotoperíodo 12 luz: 12 oscuridad (Fig. 7). La temperatura fue controlada mediante un calentador de agua sumergible (Aqua Zonic AZ Easy Heater) y establecida en  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

En ambos experimentos los microcosmos se agitaron a diario para evitar la aglomeración de las algas y se reorganizaron al azar para reducir al mínimo las diferencias de incidencia de luz.



**Figura 6.** Experimento 1. Sistema de microcosmos montado en el laboratorio del INA-CIRSA.

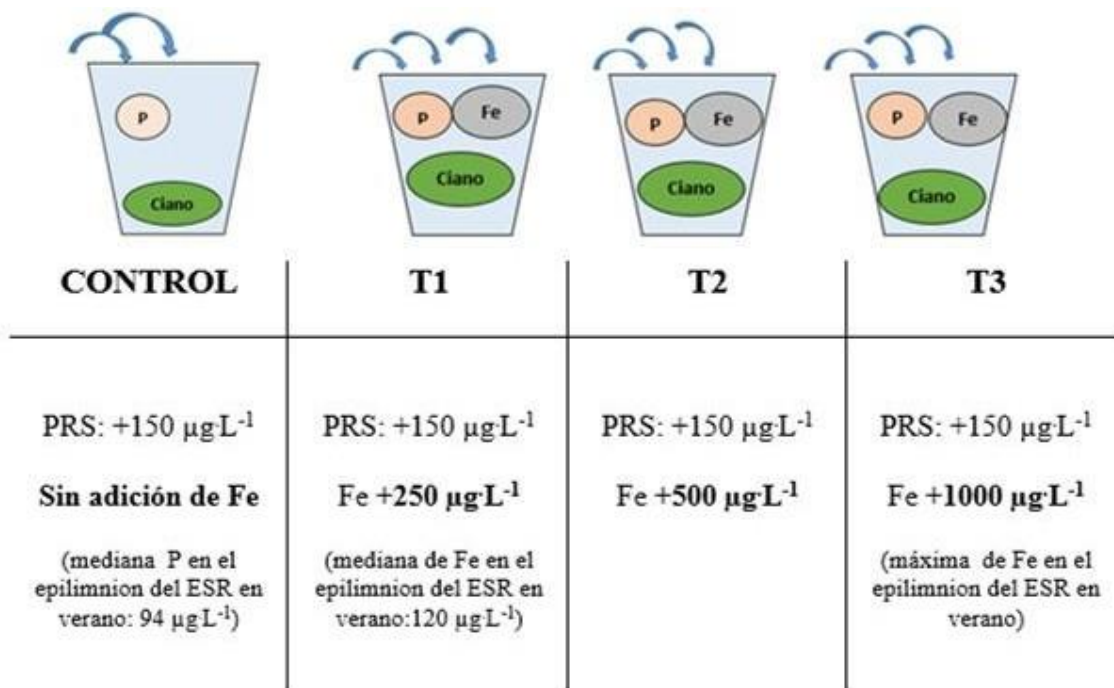


**Figura 7.** Experimento 2. Sistema de microcosmos montado en el laboratorio del INA-CIRSA.

El E1 se realizó en abril de 2017 con el fin de corroborar la concentración óptima de Fe para el crecimiento de *Microcystis* spp. La muestra fue extraída del ESR durante una floración en marzo de 2017 y estuvo compuesta en su mayor parte por especies de *Microcystis* (95,2%), mientras que otras especies de Dinophyceae, Diatomeae, Chlorophyceae y Cryptista también estuvieron presentes y representaron un bajo porcentaje de la comunidad fitoplanctónica total (Anexo 1). Se establecieron cuatro tratamientos: (a) Control, sin adición de Fe; (b) T1: +250  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (c) T2: +500  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (d) T3: +1000  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las tres concentraciones de Fe fueron establecidas en base a las condiciones naturales en el ESR y se seleccionaron considerando concentraciones por encima de la mediana (120  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y los valores máximos (950  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en la capa subsuperficial del ESR durante la temporada de verano (Tablas 1 y 2). Los tratamientos se realizaron por duplicado. Las densidades celulares iniciales para ambos experimentos se seleccionaron dentro del rango de floraciones naturales de *Microcystis* spp. reportadas históricamente en el ESR (Rodríguez & Ruiz, 2016). Durante el primer día experimental, cada microcosmos fue inoculado con una alícuota de *Microcystis* spp. y la abundancia celular inicial fue  $1.3 \pm 0.4 \times 10^5$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ . El período experimental tuvo una duración de 26 días e incluyó las etapas lag inicial y exponencial del crecimiento de algas.



**Tabla 2.** Diseño experimental del primer experimento. Se representan los microcosmos con los inóculos de P en todos los tratamientos y las distintas concentraciones de Fe en T1, T2 y T3.

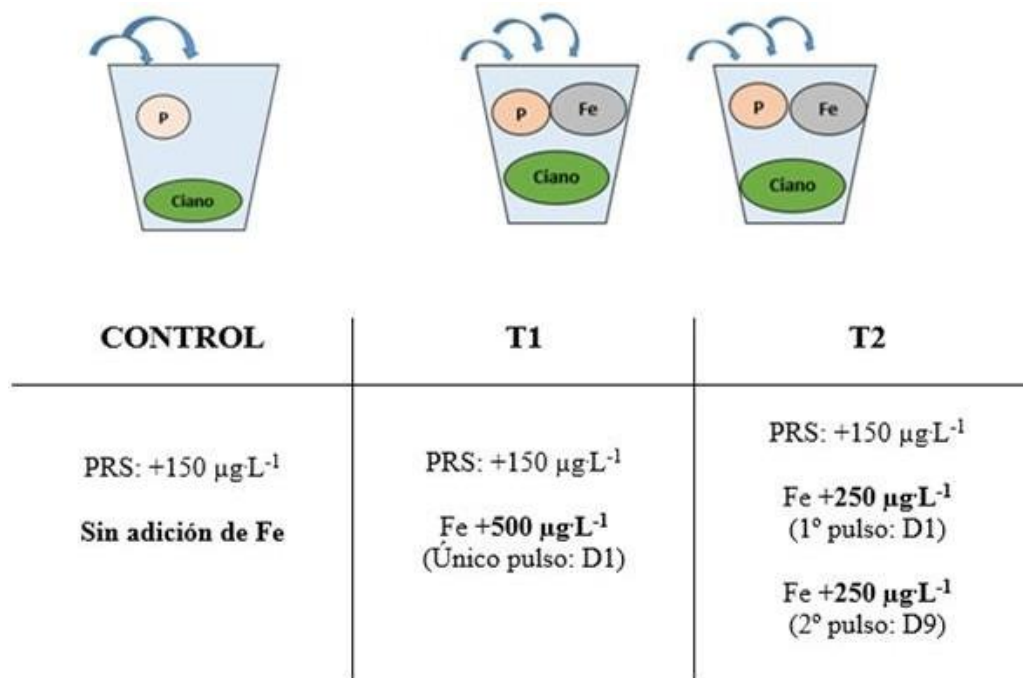


El segundo experimento se llevó a cabo en abril de 2018 para probar la respuesta del crecimiento de cianobacterias a diferentes modos de adición de Fe (uno o dos pulsos). La muestra de agua fue obtenida del ELM durante una floración de cianobacterias en febrero de 2018 y estuvo constituida en su mayoría por especies de *Microcystis* (97,3%); se identificaron otras especies de Cyanobacteria, Diatomae, Chlorophyceae, Zygnematophyceae y Cryptista, que contribuyeron a una baja proporción de la comunidad total de fitoplancton (Anexo 1).

El diseño experimental con dos pulsos de adición de Fe tuvo como objetivo reproducir el potencial aumento de Fe en capas profundas anóxicas de sistemas eutróficos y la consecuente migración descendente de colonias de cianobacterias. Por ejemplo, en las capas más profundas del ESR durante la temporada de verano se presentan medianas y máximos de Fe total de 290 y 2600  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 1). Por otro lado, la concentración total de

Fe se seleccionó en función a la más favorable para el crecimiento de cianobacterias en el primer experimento,  $500 \mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$ . De esta manera, los tratamientos establecidos fueron: (a) Control, sin adición de Fe; (b) Tratamiento con 1 pulso:  $+500 \mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  el día 1 (D1); Tratamiento con 2 pulsos: la misma cantidad dividida en 2,  $+250 \mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  en D1 (primer pulso) y  $+250 \mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  el día 9 (D9; segundo pulso; Tabla 3). El segundo pulso se fijó en el día 9 ya que se consideró próximo al inicio del crecimiento exponencial. Los tratamientos se realizaron por triplicado. En el primer día experimental, cada microcosmos fue inoculado con una alícuota de *Microcystis* spp. y la abundancia celular inicial fue de  $2,5 \pm 0,7 \times 10^4$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ , concentración representativa de inicio de floraciones de cianobacterias (Ruibal Conti *et al.*, 2005; Rodríguez & Ruiz, 2016) y observadas durante los eventos de floración de 2017 ( $3.0 \times 10^4 - 1.5 \times 10^5$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ ; INA-CIRSA, 2018). El período experimental tuvo una duración de 26 días e incluyó las etapas lag inicial y exponencial de crecimiento de algas.

**Tabla 3.** Diseño experimental del segundo experimento. Se representan los microcosmos con los inóculos de P en todos los tratamientos y los distintos pulsos de Fe en T1 y T2.



La solución de Fe se preparó utilizando  $\text{FeCl}_3 + \text{EDTA}$  para evitar su precipitación (Utkilen & Gjølme, 1995). Además, para evitar la limitación del P, se agregó  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a todos los

microcosmos para llegar a una concentración de  $100 \mu\text{g P} \cdot \text{L}^{-1}$ , según el valor de la mediana de P total en la capa subsuperficial de ERS durante el verano (Tabla 1).

La comparación entre E1 y E2 se muestra en la Tabla 4. En ambos experimentos las muestras de floraciones fueron mantenidas en el laboratorio bajo luz natural y temperatura ambiente durante 15 días previos al experimento. Las muestras fueron observadas para la identificación taxonómica y cuantificación de la composición de la comunidad de fitoplancton inmediatamente después de su colección, durante su aclimatación a las condiciones de laboratorio y el día previo al inicio de los experimentos en un microscopio óptico (Zeiss modelo D-7082, Alemania). Mediante dichas observaciones se pudo confirmar que las células de las colonias para ambos experimentos se encontraban en buen estado, y que la composición taxonómica no varió significativamente a lo largo del período de aclimatación.

**Tabla 4.** Diferencias en el diseño experimental entre los dos experimentos realizados. Se observa que en E2 se mejoraron las condiciones experimentales en el control de las variables con respecto a E1.

<b>Diseño Experimental</b>	<b>Primer Experimento</b>	<b>Segundo Experimento</b>
Intensidad de luz controlada	No	Sí
Temperatura controlada	No	Sí
Tratamientos	Diferentes concentraciones de Fe	Igual concentración en dos pulsos
Nº de tratamientos	4	3
Nº de réplicas	2	3

## **Determinación de parámetros fisicoquímicos y biológicos**

### **Variables fisicoquímicas**

Los parámetros fisicoquímicos de temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto se midieron *in situ* en cada microcosmos a lo largo del período experimental, utilizando una sonda multiparamétrica (YSI modelo 556 MPS). La toma de muestras se realizó después de homogeneizar el contenido de cada microcosmos, recolectando 190 mL en el E1 y 85 mL en el E2 con una jeringa, para determinar el fósforo reactivo soluble (PRS), hierro soluble (FeSol.), la abundancia celular y el contenido de MCs. Los muestreos se efectuaron en los días 1, 5, 8, 14 y 26 para E1 y en los días 1, 4, 8, 15 y 26 para E2.

### **Fósforo Reactivo Soluble y Hierro Soluble**

Las muestras para la determinación de fósforo reactivo soluble (PRS) y hierro soluble (FeSol.) fueron previamente filtradas por una membrana de acetato de celulosa millipore 0,45  $\mu\text{m}$  y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Las muestras para la determinación de FeSol., además se conservaron con  $\text{HNO}_3$  (0,1%; v/v), corroborando un  $\text{pH} < 2$ .

El contenido de PRS se determinó por medio del método del ácido ascórbico (APHA, 2012: 4500 P.E.); se agregó 4 mL de reactivo color a 25 mL de muestra, dejando reposar 10 min para el desarrollo del color (azul). Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700) a 880 nm.

La concentración de FeSol. se midió ajustando el volumen de cada muestra a 25 mL con agua Milli-Q y analizándola mediante Espectrometría de Absorción Atómica de llama (AAS), usando un Espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo AA 3110 (FCEFYN-UNC).

### **Variables biológicas**

#### **Tamaño de Colonias, Abundancia Celular y Biovolumen**

Para el recuento de las poblaciones de *Microcystis* spp., las muestras se conservaron con formol (0,01 %; v/v) y se mantuvieron en oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se observaron tres alícuotas de cada muestra (pseudorélicas) en el E1 y dos en el E2. Las alícuotas fueron homogeneizadas y dispuestas en cámaras de Fuchs–Rosenthal (Marienfeld, Alemania). La identificación taxonómica se llevó a cabo según Komárek & Anagnostidis, 1998 y luego se procedió a la cuantificación de las colonias de *Microcystis* spp., mediante microscopía óptica (Bausch &

Lomb, Estados Unidos y Zeiss modelo D-7082, Germany; INA-CIRSA) a un aumento de 25X. Dependiendo la cantidad de colonias encontradas se cuantificó la cámara completa o sólo una de las dos cuadrículas que la componen. En cada muestra se midió el alto y ancho de cada colonia y se calculó el área de las mismas de acuerdo a que se asemejaran a un círculo o un rectángulo. Además se midieron los diámetros de ~10 células y se calculó el área celular promedio, aplicando la fórmula de la superficie de un círculo. De esta manera, la abundancia celular fue estimada en base a las áreas de las colonias y de las células según la siguiente fórmula, expresada en  $\text{cél. mL}^{-1}$ :

$$Ab. Cel. (\text{cél. mL}^{-1}) = (\Sigma \text{áreas colonia} / \text{área célula}) / \text{volumen cámara cuantificado} \quad (1)$$

donde *Ab. Cel.* es la abundancia celular y  $\Sigma$  es la sumatoria de las áreas de las colonias.

A partir de los diámetros de las células que formaban las colonias se calculó el volumen de una esfera (teniendo en cuenta la morfología celular de la especie en estudio) (Hillebrand, 1999) y se calculó el promedio del volumen celular, según la siguiente fórmula:

$$Vol \text{cél.} = \bar{X} [ \frac{4}{3} (\pi r^3) ] \quad (2)$$

donde  $\frac{4}{3} (\pi r^3)$  representa el volumen de una esfera siendo  $r$  el radio de la esfera y  $\pi$  la constante matemática aproximadamente igual a 3,14159.

El biovolumen se estimó a partir del producto entre el valor de abundancia celular y el valor del volumen celular de la muestra correspondiente, el cual fue expresado en  $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ :

$$Biovolumen (\mu\text{m}^3. \text{mL}^{-1}) = \text{volumen celular} * Ab. Cel. \quad (3)$$

donde *Ab. Cel.* representa la abundancia celular.

Con la finalidad de comprobar el crecimiento de las poblaciones de *Microcystis* spp. a lo largo del experimento, se realizó el seguimiento midiendo la densidad óptica de las muestras *in vivo* (absorbancia a 750 nm que representa la cantidad de partículas o células en suspensión) correspondientes a cada tratamiento y día de muestreo. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700; INA-CIRSA) a 750 nm (Amaral *et al.*, 2014).

### **Determinación de MCs**

Las muestras para los análisis de MCs se tomaron como submuestras del volumen de muestra recolectado para el recuento de las células. Se separaron 2 mL y se almacenaron en tubos eppendorf a -20 °C.

La concentración total de MCs fue determinada por ensayos inmunoenzimáticos utilizando un kit ELISA indirecto por competición (Abraxis). Previo a la determinación, las muestras fueron mantenidas a -20°C y pretratadas en ciclos de congelamiento-descongelamiento durante tres días consecutivos para provocar la ruptura de las células y la liberación de las toxinas. Se realizó una primera filtración de las muestras utilizando filtros de nitrocelulosa con un poro de tamaño de 3 µm y luego con filtros con un poro de 0.45 µm para retener los detritos restantes (por ej., restos de células muertas). La curva de calibración fue determinada con un valor mínimo de 0,15 µg· L<sup>-1</sup> (límite de detección) y un valor máximo de 5 µg· L<sup>-1</sup>.

Considerando que las MCs son péptidos intracelulares y las células de cianobacterias no las excretan activamente, a partir de la concentración total de MCs, es posible calcular la cantidad promedio de MCs por célula (cuota celular de MCs). Así se calculó la cuota celular como:

$$\text{Cuota celular de MCs} = \text{Concentración de MCs} (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) / \text{Ab. Cel.} (\text{cél.} \cdot \text{L}^{-1}) \quad (4)$$

donde *Ab. Cel.* representa la abundancia celular.

## Análisis de datos

Los datos fueron expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) del duplicado o triplicado de tratamientos, para cada tratamiento de adición de Fe y control.

La tasa intrínseca de crecimiento ( $\mu$ ) de las poblaciones de cianobacterias fue calculada a partir de la abundancia celular según:

$$\mu (d^{-1}) = \frac{\ln(N_f / N_i)}{t_f - t_i} \quad (5)$$

donde  $N_f$  y  $N_i$  son la abundancia celular del último y del primer día respectivamente de la fase de crecimiento exponencial; siendo  $(t_f - t_i)$  la duración de esta fase en días.

Las tasas de decaimiento de PRS y de FeSol. a lo largo de los experimentos se determinaron calculando el promedio de las pendientes utilizando la ecuación de la recta de una regresión lineal.

Para establecer si las diferencias entre las variables fueron estadísticamente significativas a lo largo de todo el experimento entre los distintos tratamientos, se realizaron ANOVAs a una y dos vías, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0,05 para todas las comparaciones (Zar, 1984). Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey y Dunnett's para distinguir los tratamientos con efectos significativamente diferentes.

La normalidad de los datos se verificó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y D'Agostino & Pearson; la homocedasticidad se verificó con las pruebas de Bartlett's y Brown-Forsythe.

En los casos en los que los supuestos no se cumplieron, se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis para establecer si las diferencias entre las variables fueron estadísticamente significativas a lo largo de todo el experimento entre los distintos tratamientos, y en caso de que hubiera diferencias, el test a posteriori Dunn's de comparaciones múltiples.

En todos los casos, los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc).

## Resultados

### Experimento 1: Exposición de *Microcystis* spp. a diferentes concentraciones de Fe

#### Condiciones de experimentación

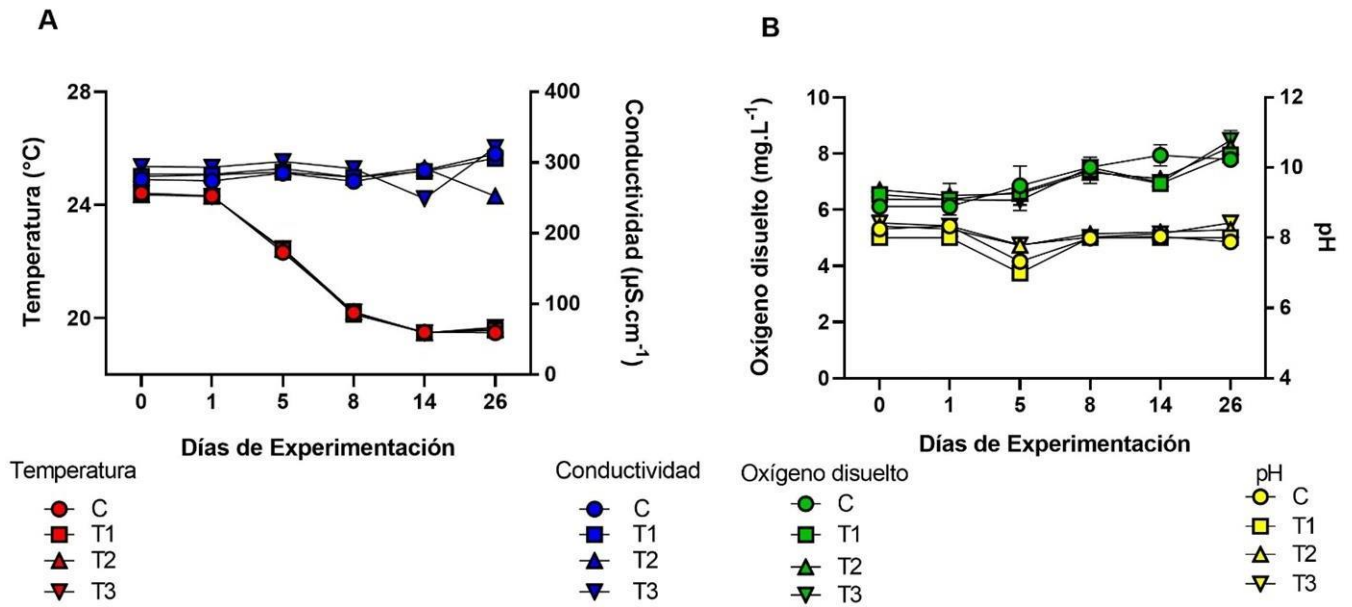
En la Figura 8-A se observa cómo disminuye progresivamente la temperatura desde el primer día del experimento de 24,4 a 19,5 °C manteniéndose constante en ese valor en los últimos días. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo de todo el experimento.

En la Figura 8-A se muestra la variación de la conductividad, donde se observa que hasta el día 8 la misma oscila en todos los tratamientos entre 280 y 290  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Posteriormente se observa un aumento progresivo hasta valores máximos de 321  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  en todos los tratamientos, a excepción de T2 que decae en el último día a 252  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo del experimento.

La concentración de oxígeno disuelto (Figura 8-B) muestra un leve aumento a lo largo del experimento, el cuál fue de  $\approx 6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $\approx 8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos durante todo el período experimental.

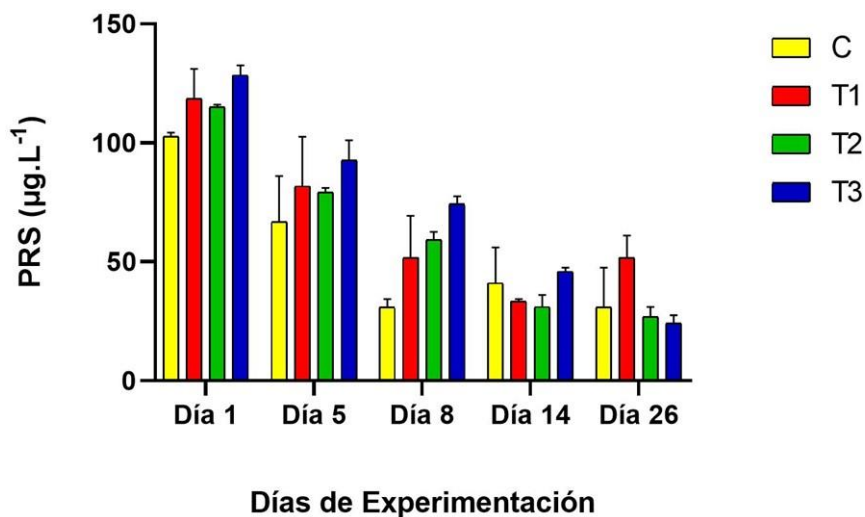
Los valores de pH se mantuvieron entre 7,6 y 8,3 durante todo el período experimental tanto para el control como para los tratamientos. No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo de los días (Figura 8-B).





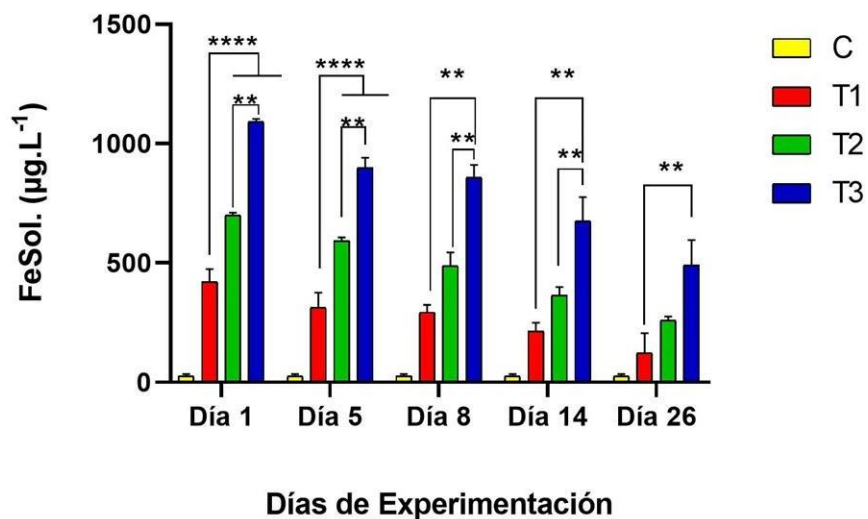
**Figura 8-** Variables fisicoquímicas medidas *in situ* en función de los días de experimentación. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. **A** Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y Conductividad ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). **B** Oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y pH.

La concentración de PRS ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) disminuyó a lo largo del experimento en los cuatro tratamientos (control, T1, T2 y T3) desde valores de  $\approx 126 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (1er día) a  $\approx 24 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (último día), sin diferencias significativas entre los mismos. En la Tabla 5 se puede ver que las tasas de decaimiento de PRS tampoco fueron significativamente diferentes entre los tratamientos.



**Figura 9- Fósforo Reactivo Soluble.** Concentración de PRS ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA a dos vías ( $p=0,4210$ ;  $F=1,085$ ;  $n=2$ ) (Anexo 2.1A).

Los tratamientos con diferentes concentraciones de Fe se evidencian a partir de las diferencias significativas que se observaron entre T1, T2 y T3 a lo largo de todo el experimento. Asimismo, se observa una disminución en la concentración de FeSol. ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) en todos los tratamientos desde el día 1 hasta el día 26 (Fig. 10). Al respecto, las tasas de decaimiento de Fe presentaron valores sin diferencias significativas (Tabla 5), lo que indica que la disminución de Fe se produjo a la misma velocidad en todos los tratamientos.

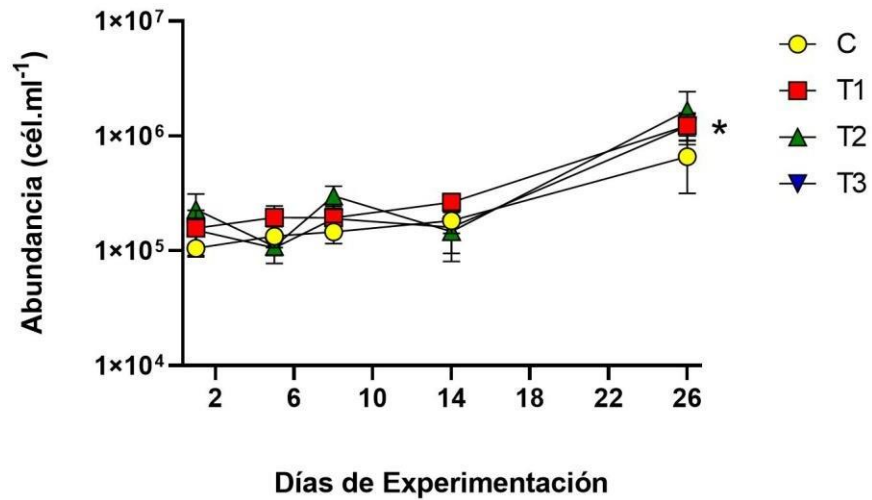


**Figura 10- Hierro Soluble.** Concentración de FeSol. ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA a dos vías ( $p=0,0024$ ;  $F=4,188$ ;  $n=2$ ) (Anexo 2.1B). El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos.

### Crecimiento y contenido de MCs de *Microcystis* spp.

Las curvas de crecimiento de las poblaciones de *Microcystis* spp. se muestran en base a la abundancia celular ( $\text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Durante los primeros 14 días no se produjo un aumento significativo de la abundancia celular, lo que indica que las poblaciones se encontraban en la fase lag de crecimiento. Desde el día 14 hasta el día 26 se observa un crecimiento de la población, por lo que se identifica a

esta etapa como la fase exponencial de crecimiento (Fig. 11). En el último día de experimentación se detecta diferencias significativas en la abundancia celular entre el control y T2 ( $p=0,049$ ;  $F=3,590$ ). Asimismo, las tasas de crecimiento de T2 y T3 son significativamente mayores al control (Tabla 5) (Anexo 2.1D).

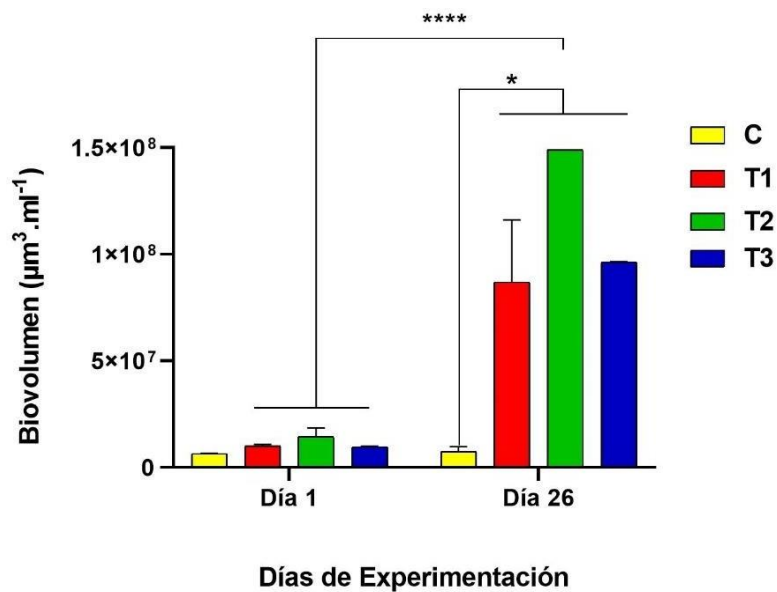


**Figura 11- Abundancia Celular (cél. mL<sup>-1</sup>).** Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de una vía por cada día de experimentación. El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos. (Anexo 2.1C).

**Tabla 5.** Tasas de crecimiento de *Microcystis* spp. (Anexo 2.1D) y tasas de decaimiento de FeSol y de PRS en microcosmos expuestos a diferentes tratamientos con Fe: Control (sin adición de Fe), T1 (250  $\mu\text{g Fe L}^{-1}$ ); T2 (500  $\mu\text{g Fe L}^{-1}$ ); T3 (1000  $\mu\text{g Fe L}^{-1}$ ) durante E1. La media y desviación estándar fueron calculadas con las réplicas de cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. (*n.d.* = no detectable).

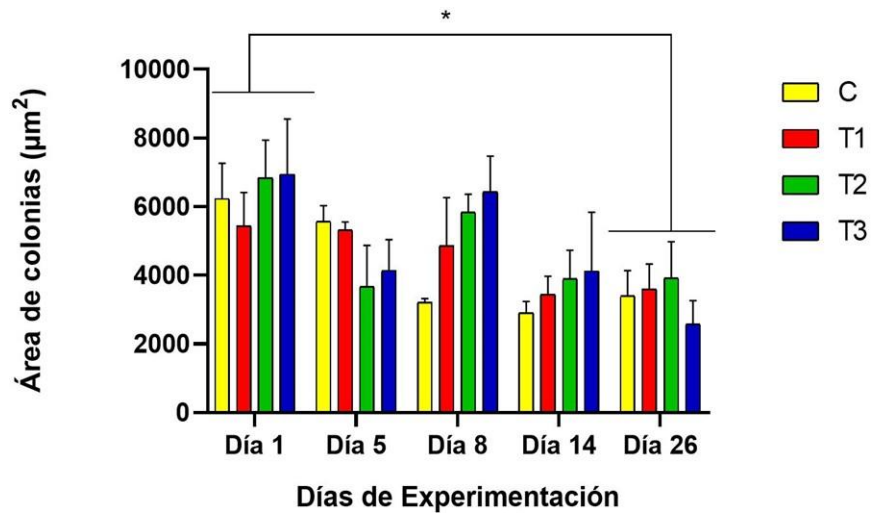
Tratamientos	Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) ( $\text{d}^{-1}$ )	Tasas de decaimiento FeSol. [( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) $\cdot$ $\text{d}^{-1}$ ]	Tasas de decaimiento PRS [( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) $\cdot$ $\text{d}^{-1}$ ]
<b>Control</b> (sin adición Fe)	0,12 $\pm$ 0,07 (a)	<i>n.d.</i>	-16,92 $\pm$ 4,6 (a) $r^2 = 0.70$
<b>T1</b> (250 $\mu\text{g Fe L}^{-1}$ )	0.12 $\pm$ 0.05 (a)	-69,6 $\pm$ 34,5 (a) $r^2 = 0.90$	-18,18 $\pm$ 4,0 (a) $r^2 = 0.70$
<b>T2</b> (500 $\mu\text{g Fe L}^{-1}$ )	0.26 $\pm$ 0.08 (b)	-111,1 $\pm$ 4,7 (a) $r^2 = 0.98$	-22,50 $\pm$ 1,90 (a) $r^2 = 0.95$
<b>T3</b> (1000 $\mu\text{g Fe L}^{-1}$ )	0.20 $\pm$ 0.03 (b)	-142,6 $\pm$ 34,9 (a) $r^2 = 0.96$	-25,50 $\pm$ 1,19 (a) $r^2 = 0.99$

El biovolumen ( $\mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ ) correspondiente a *Microcystis* spp. aumentó significativamente entre el primer y el último día del experimento en los tratamientos con adición de Fe (Fig. 12). En el último día los valores de biovolumen fueron significativamente más altos en los tratamientos con Fe en comparación al control ( $p=0,0116$ ;  $F=15,37$ ).



**Figura 12- Biovolumen ( $\mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ ).** Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos. (Anexo 2.1E).

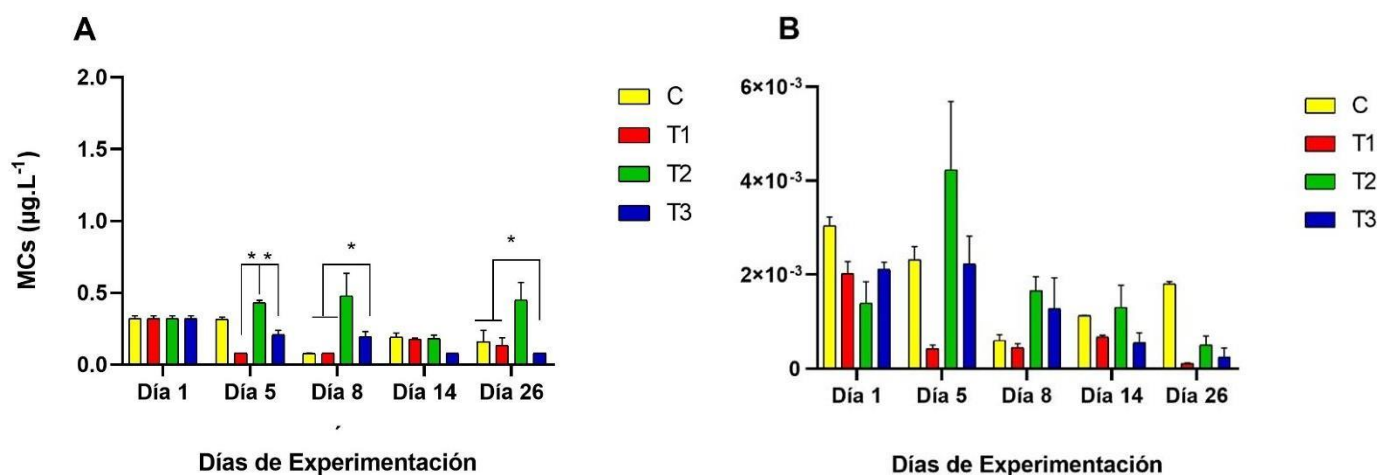
El área de las colonias ( $\mu\text{m}^2$ ) de *Microcystis* spp. fue disminuyendo a lo largo del período de experimentación en todos los tratamientos (Fig. 13), siendo estas diferencias significativas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.



**Figura 13- Tamaño de colonias ( $\mu\text{m}^2$ ).** Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos. (Anexo 2.1F).

Tanto la concentración como la cuota celular de MCs presentaron valores muy bajos ( $0,32 \pm 0,02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $0,30 \pm 0,02 \times 10^{-2} \text{pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ , respectivamente)

La concentración de MCs ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) se mantuvo en valores  $< 0,5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  durante todo el experimento (Fig. 14-A), que en comparación con concentraciones de MCs medidas en embalses de la región, se consideran muy bajas (valores medios  $0,75 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  y máximos de  $1,8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , Bistoni *et al.*, 2009). Se puede observar que el T2 presentó concentraciones significativamente mayores en varios días de muestreo durante el experimento. En relación a la cuota celular de MCs ( $\text{pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ ) disminuyó durante el experimento en todos sus tratamientos (Figura 14-B).



**Figura 14- Concentración de microcistinas ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Anexo 2.1G) y cuota celular de microcistinas ( $\text{pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ ) (Anexo 2.1H). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos.**

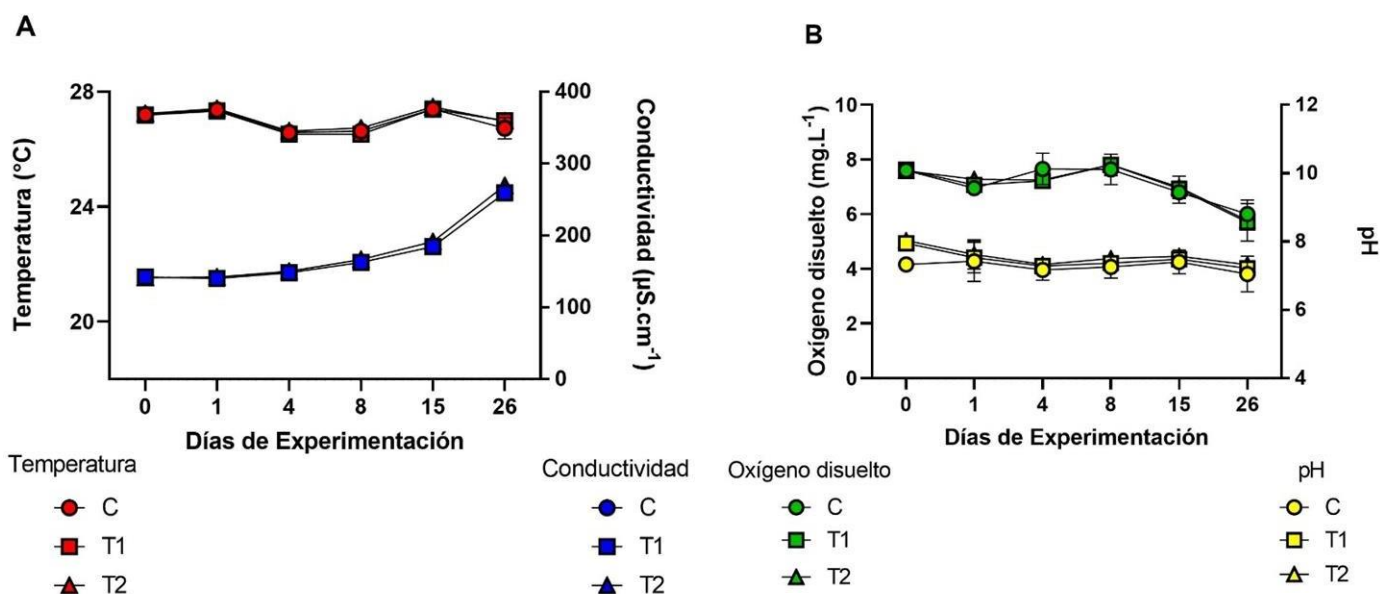


## Experimento 2: Exposición de *Microcystis* spp. a diferentes pulsos de Fe

### Condiciones de experimentación

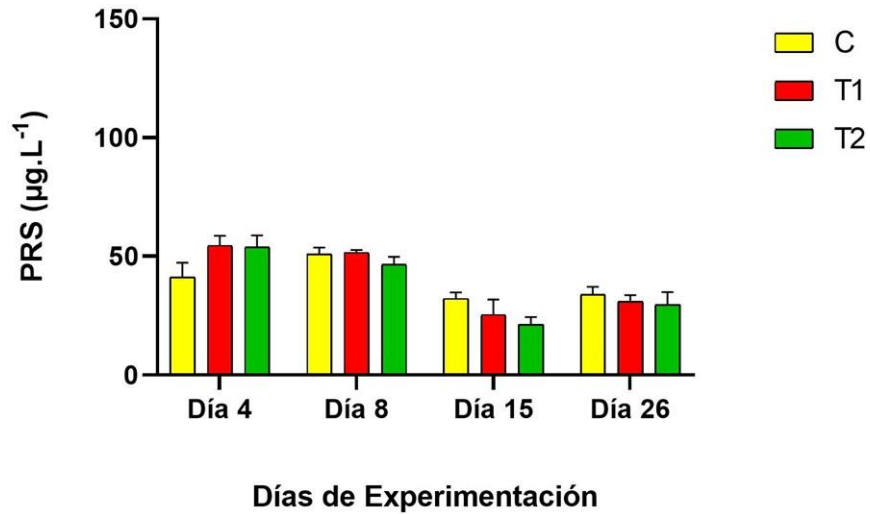
Las variables fisicoquímicas se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo de todo el experimento tanto para el control como para los tratamientos (Fig. 15).

En la Figura 15-A se puede observar que la temperatura osciló entre los 26,58 y 27,4 °C, por lo que no se registraron diferencias significativas a lo largo de los días, ni tampoco entre los tratamientos. Con respecto a la conductividad, los tratamientos mostraron un aumento progresivo desde 142  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  hasta 279  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  durante el transcurso de los días, sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 15-A). La concentración de oxígeno disuelto mostró un descenso desde el día 8 hasta el último día experimental, disminuyendo de  $\approx 7,5$  a 5,7  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . No hubo diferencias entre tratamientos (Figura 15-B). Los valores de pH (Figura 15-B) se mantuvieron entre 7 y 8 durante todo el período experimental, tanto para el control como para los tratamientos.



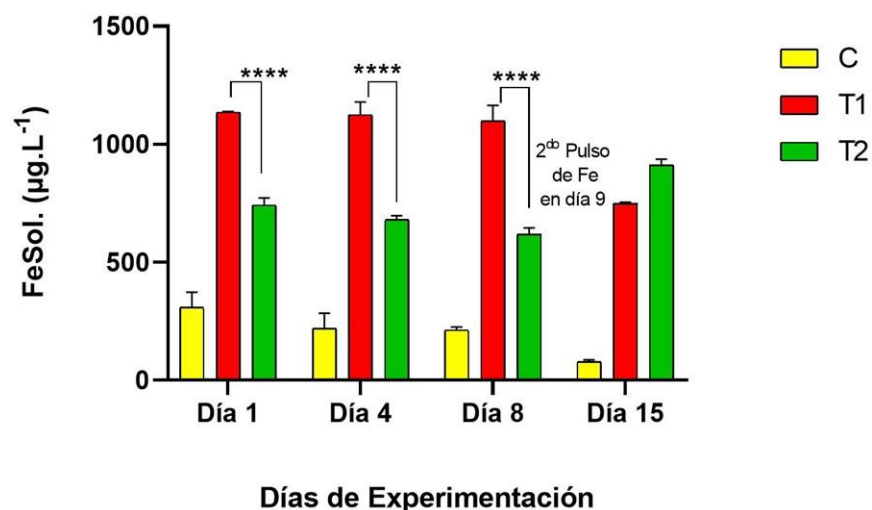
**Figura 15-**Variables fisicoquímicas medidas *in situ*. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. **A** Temperatura (°C) y Conductividad ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). **B** Oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y pH.

La concentración de PRS ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) disminuyó a lo largo del experimento en los tres tratamientos desde valores de  $\approx 58 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (D1) hasta  $\approx 30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (D26), sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 16). Además, las tasas de decaimiento tampoco fueron significativamente diferentes entre ellos (Tabla 6).



**Figura 16- Fósforo Reactivo Soluble.** Concentración de PRS ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA a dos vías ( $p=0,2157$ ;  $F=1,454$ ;  $n=3$ ) (Anexo 3.2A).

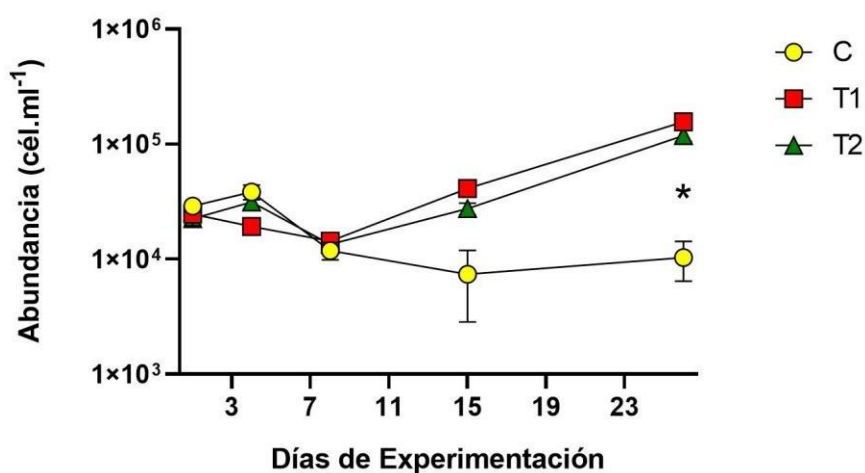
La concentración de FeSol. ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) disminuyó a lo largo del período experimental en todos los tratamientos, a excepción del T2 que en el D15 muestra un ascenso debido al segundo pulso aplicado el D9 de experimentación (Fig. 17). Se destaca que las determinaciones del D26 no se muestran debido a problemas de logística en su pretratamiento. Las tasas de decaimiento del FeSol. calculadas del D1 al D8 no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 6).



**Figura 17- Hierro Soluble.** Concentración de FeSol. ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA a dos vías ( $p < 0,0001$ ;  $F = 15,61$ ;  $n = 3$ ) (Anexo 3.2B). El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos.

### Crecimiento y contenido de MCs de *Microcystis* spp.

La abundancia celular de la población se mantuvo baja y constante los primeros días del experimento, aumentando significativamente en los tratamientos con adición de Fe en los días 15 y 26 del experimento, lo que indica que en T1 y T2 la población entró en fase exponencial a partir del día 15 ( $p < 0,0001$ ;  $F = 19,50$  para día 15 y  $p < 0,0001$ ;  $F = 19,16$  para día 26). No se observaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre los tratamientos con pulsos de Fe, sólo entre ellos y el control (Tabla 6) (Anexo 3.2D).



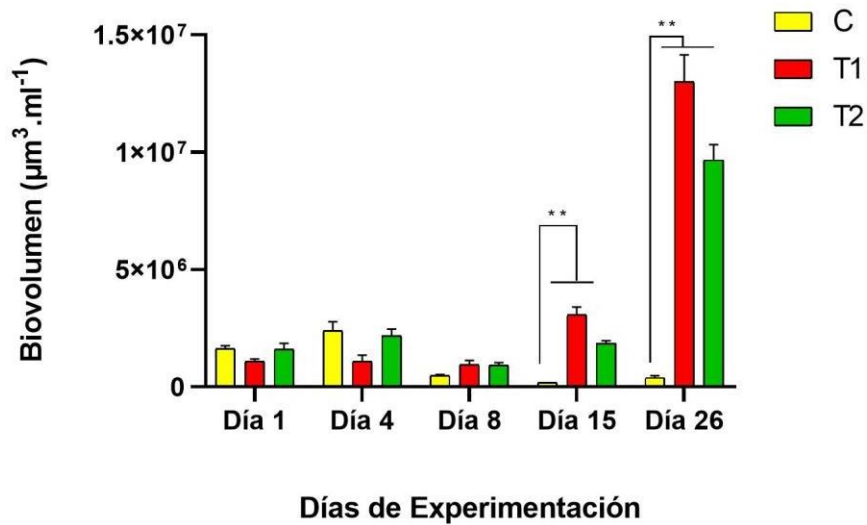
**Figura 18- Abundancia Celular (cél·mL<sup>-1</sup>).** Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de una vía por cada día de experimentación. El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos. (Anexo 3.2C).

**Tabla 6.** Tasas de crecimiento de *Microcystis* spp. (Anexo 3.2D) y tasas de decaimiento de FeSol. y PRS en microcosmos expuestos a diferentes tratamientos de Fe: Control (sin adición de Fe), T1 un pulso de 500  $\mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$ ; T2 dos pulsos de 250  $\mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  durante D1 y D9 respectivamente. La media y desviación estándar fueron calculadas con las réplicas de cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. \*Período considerado: día 1 al día 8, antes del segundo pulso de Fe en T2.

Tratamientos	Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) ( $\text{d}^{-1}$ )	Tasas de decaimiento FeSol. [( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) $\cdot \text{d}^{-1}$ ]	Tasas de decaimiento PRS [( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) $\cdot \text{d}^{-1}$ ]
<b>Control</b> (sin adición de Fe)	0.09 $\pm$ 0.02 (a)	<i>n.d.</i>	-5,05 $\pm$ 1.06 (a) $r^2 = 0.60$
<b>T1</b> (500 $\mu\text{gFe} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0.15 $\pm$ 0.03 (b)	-68,5 $\pm$ 4,9* (a) $r^2 = 0.86$	-8,71 $\pm$ 3,85 (a) $r^2 = 0.76$
<b>T2</b> (250 $\mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$ + 250 $\mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0.16 $\pm$ 0.03 (b)	-62 $\pm$ 4* (a) $r^2 = 0.84$	-12,34 $\pm$ 2,31 (a) $r^2 = 0.78$

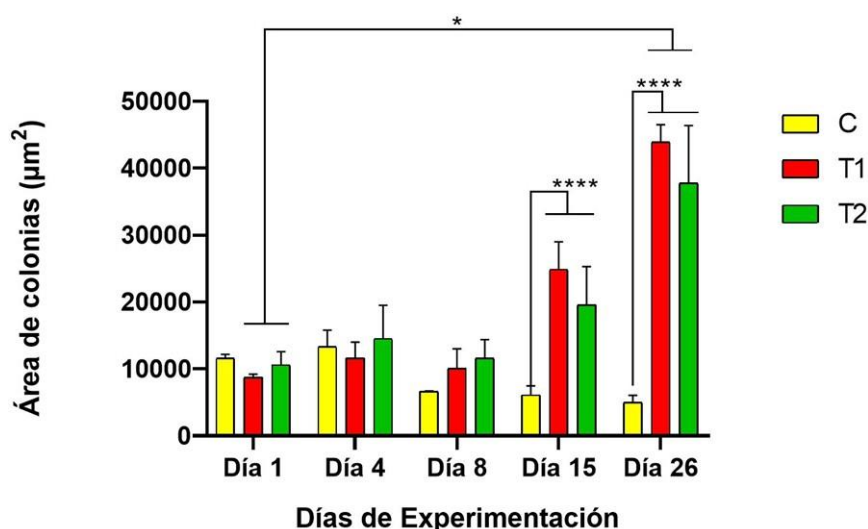
El biovolumen ( $\mu\text{m}^3\cdot\text{mL}^{-1}$ ) aumentó y presentó diferencias significativas entre el control y el T1 a partir de la fase exponencial de la curva de crecimiento (Fig. 19;  $p=0,0002$  para día 15 y  $p=0,0005$  para día 26 con análisis no paramétrico).

En ambos experimentos las diferencias observadas en el biovolumen fueron consecuencia del crecimiento en la abundancia celular de la fase exponencial de las poblaciones, ya que no hubo diferencias significativas en el volumen celular entre el control y los tratamientos con adición de Fe (Anexo 4).



**Figura 19- Biovolumen ( $\mu\text{m}^3\cdot\text{mL}^{-1}$ ).** Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos. (Anexo 3.2E).

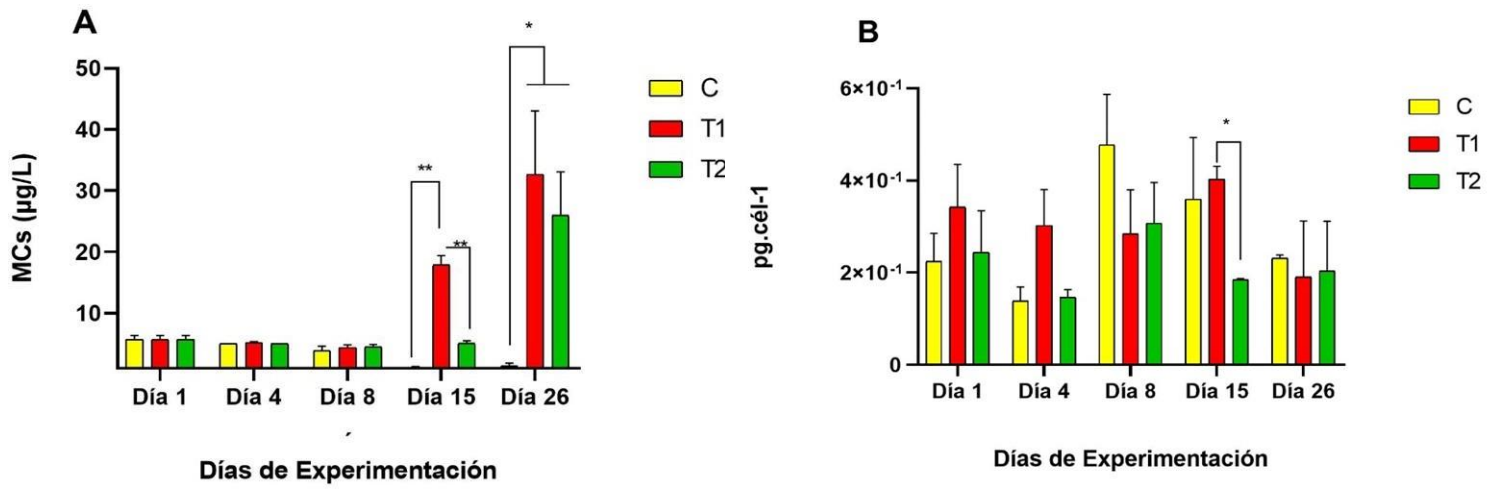
El área de las colonias ( $\mu\text{m}^2$ ) de *Microcystis* spp. aumentó significativamente a lo largo del período experimental (Fig. 20) y mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos a partir del día 15 ( $p < 0,0001$ ;  $F=23,95$  para día 15 y  $p < 0,0001$  con análisis no paramétrico para día 26).



**Figura 20- Tamaño de colonias ( $\mu\text{m}^2$ ).** Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos. (Anexo 3.2F).

La concentración de MCs ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) en los primeros días de experimentación corresponde a valores cuantificados en embalses de la región ( $\geq 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). En el día 15 se observó un aumento de MCs en T1, llegando a una concentración significativamente mayor al control y a T2. Por otro lado, en el último día se observaron concentraciones de MCs significativamente más altas en los tratamientos con adición de Fe en comparación al control ( $p=0,0020$ ;  $F=94,14$  para día 15 y  $p=0,0098$ ;  $F=31,27$  para día 26) (Fig. 21-A).

Con respecto a la cuota celular de MCs (Fig. 21-B) durante las primeras semanas del experimento, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que en el día 15 se muestran valores significativamente más altos en T1 en comparación a T2. En el último día las cuotas celulares de control y T1 disminuyen y no se observan diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 21-** Concentración de microcistinas ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Anexo 3.2G) cuota celular de microcistinas ( $\text{pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ ) (Anexo 3.2H). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. El \* indica diferencias significativas entre los tratamientos.



## Discusión

### Crecimiento de las poblaciones de *Microcystis* spp. bajo diferentes concentraciones y pulsos de Fe

#### Aumento de la abundancia celular bajo mayores concentraciones de Fe

Los experimentos realizados para comprobar el rol del Fe en el crecimiento de *Microcystis* spp. tuvieron distintas respuestas en las poblaciones; entre los resultados más importantes de este trabajo se destaca la promoción del crecimiento por parte de este nutriente según los resultados obtenidos de abundancia celular en ambos experimentos.

Las poblaciones de *Microcystis* spp. adicionadas con Fe alcanzaron una mayor abundancia de células al final del primer experimento que aquellas sin suministro de Fe (Figura 10). Además, las células suministradas con 500  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$  (T2) y 1000  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$  (T3) exhibieron una tasa de crecimiento significativamente más alta durante toda la fase exponencial en comparación a las células bajo control y bajo el tratamiento con 250  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$  (T1) (Tabla 5). Otros estudios informaron resultados similares donde observaron mayores tasas de crecimiento de cultivos puros de *M. aeruginosa* en condiciones de altas concentraciones de Fe en comparación con aquellas en condiciones de bajas concentraciones (Lukač, 1993; Xing *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016).

La concentración de FeSol. y PRS disminuyó a lo largo del experimento con los tres tratamientos de adición de Fe, pero las tasas de disminución no fueron significativamente diferentes entre ellos (Tabla 5). Esto indicaría que la disminución de PRS y FeSol está asociada con el consumo de estos elementos por parte de las células y al aumento en el crecimiento de las poblaciones de *Microcystis* spp.

Como las concentraciones de P en el ESR son concentraciones altas en verano (mediana de 94  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y máxima de 1117  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Tabla 1), en el diseño de estos experimentos se eligió una concentración que superara la ideal en el verano en las capas más superficiales. De acuerdo con los resultados y con los valores de Fe registrados en las capas subsuperficiales del ESR durante las estaciones con floraciones más frecuentes (verano:  $\leq 50$  a 950  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$  y otoño:  $\leq 50$  a 310  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Tabla 1), el Fe puede estar en una concentración no óptima para el crecimiento de *Microcystis* spp. la mayor parte del tiempo. Por lo anterior se postula que

podría ser un micro nutriente limitante en el verano y el otoño. En cambio, la mayor disponibilidad de Fe en las capas más profundas (2600 y 1570  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en verano y otoño respectivamente; Tabla 1) podría ser un recurso importante para el crecimiento de las poblaciones de cianobacterias ya que *Microcystis* spp. podría descender a capas más profundas para adquirir este nutriente (Molot *et al.*, 2014). Esto puede ser causado por la liberación de  $\text{Fe}^{2+}$  del sedimento a la columna de agua, proceso que se ve favorecido por las condiciones anóxicas presentes en la capa más profunda durante la mayor parte del año (valores de la mediana de oxígeno disuelto de 4,7 mg.  $\text{L}^{-1}$  en primavera, 1 mg.  $\text{L}^{-1}$  en verano y 6,7 mg.  $\text{L}^{-1}$  en otoño; Tabla 1).

En base al primer experimento se puede corroborar que el Fe es un factor promotor en el crecimiento de *Microcystis* spp. (por lo tanto en la posible formación de floraciones) en condiciones óptimas de luz, temperatura y P y que el rango óptimo de concentración para el crecimiento de esta especie se encuentra en valores entre 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Como se mencionó en la sección de resultados, durante la fase exponencial, las poblaciones de *Microcystis* spp. mostraron una tasa de crecimiento específica significativamente mayor en los grupos de tratamiento con adición de Fe en comparación con la del control lo que indicaría que el Fe promovió el crecimiento de las poblaciones. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento específica entre los tratamientos de adición de Fe. En conjunto con el crecimiento de la población, el FeSol. y PRS mostraron una disminución de sus concentraciones, como se observa en base a sus tasas de decaimiento. Las tasas de decaimiento de PRS medidas a lo largo del experimento no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de control y de Fe (Tabla 6). Estos resultados, junto con los observados en el primer experimento, confirmaron que el P fue consumido a tasas similares en todos los tratamientos, por lo que se considera que en este estudio el P no representó un factor diferencial de crecimiento entre los tratamientos (Amaral *et al.*, 2014). Asimismo, las tasas de disminución de FeSol. no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos con Fe lo que indicaría que este elemento fue consumido a tasas similares por las poblaciones expuestas a los diferentes tratamientos de adición de Fe (Fujii *et al.*, 2011).

A partir de los resultados del segundo experimento se pudo corroborar que *Microcystis* spp. responde de manera similar tanto a condiciones iniciales de disponibilidad de Fe menores a la

óptima ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como a concentraciones más altas ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), si después de un período hay nuevamente disponibilidad de Fe (*i.e.*,  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) por la ocurrencia de un segundo pulso. Se ha demostrado en otros trabajos que las colonias de *Microcystis* spp. se desplazan a profundidades donde la disponibilidad de Fe es mayor en comparación a las capas subsuperficiales (en el caso de *Microcystis aeruginosa*, los valores de las velocidades de sus colonias son de  $52 \pm 13 \text{ m}\cdot\text{día}^{-1}$ ; Walsby, 1987). De esta manera se podrían beneficiar con los “pulsos” de este micronutriente, lo que se reflejaría en un mayor crecimiento de sus poblaciones. Por lo tanto las especies de cianobacterias que tienen la posibilidad de migrar en la columna de agua tendrían ventajas ya que podrían bajar a tomar el Fe de las capas más profundas (Molot *et al.*, 2014) mientras que otras especies de cianobacterias que no tienen vesículas de gas no lo podrían hacer, como por ejemplo la mayoría de las especies del género *Coelosphaerium* (Cirés y Quesada, 2011).

En relación a pulsos de nutrientes, algunos trabajos comprobaron que, frente a diversos pulsos de P en un cierto período de tiempo, *Cylindrospermopsis* sp. y *Plankthothrix* sp. presentan tasas de crecimiento diferentes (Aubriot *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2014). Sin embargo, no se conocen estudios sobre pulsos de Fe, ya sea simulando variaciones a lo largo del tiempo o desplazamiento de las células a zonas de mayor concentración. Por lo anterior, el estudio de la respuesta de poblaciones naturales de *Microcystis* spp. ante diferentes escenarios de concentración y pulsos de Fe, es de gran importancia para entender la dinámica de las floraciones de esta especie en los sistemas naturales.

### **El tamaño de colonias en respuesta al aumento de Fe**

En este trabajo, el área de las colonias fue diferente en ambos experimentos, presentando un orden de magnitud mayor en el segundo experimento en comparación al primero. En el primer experimento, en el que la cepa se consideró poco toxigénica, el área de las colonias fue disminuyendo a lo largo de todo el período experimental presentando diferencias significativas entre el primer y el último día de experimentación. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Por otro lado, en el segundo experimento, en el cuál la cepa produjo altos niveles de toxinas, el tamaño de las colonias aumentó a lo largo de todo el experimento, observándose un aumento significativamente

diferente entre el primer y el último día de experimentación. A su vez, entre los tratamientos se encontraron diferencias a partir del día 15 (fase exponencial) donde el control presentó áreas de colonias significativamente menores en comparación a los tratamientos de adición de Fe. Lo anterior, podría sugerir que el Fe tuvo una influencia positiva en el tamaño de las colonias en el segundo experimento.

Por el contrario, otros autores observaron la desagregación de colonias en respuesta a la adición de N y P, ya sea juntos o por separado (Ma *et al.*, 2014). Asimismo, Zhu *et al.* (2016) reportan una disminución general en el tamaño de las colonias bajo concentraciones crecientes de nutrientes en sistemas naturales.

En relación a la formación de colonias, Yang & Kong (2013) observaron que es promovida por la adición de N y P, mientras que Ma *et al.*, (2021) postularon que las altas concentraciones de Fe inducen la secreción de polisacáridos extracelulares y la formación de las mismas en *Microcystis* spp.

### **Contenido de microcistinas a distintas concentraciones y pulsos de Fe**

En base a los resultados de este trabajo, en el primer experimento tanto las concentraciones como las cuotas celulares de MCs presentaron valores bajos durante todo el período experimental ( $0,32 \pm 0,02 \mu\text{g. L}^{-1}$ ;  $0,30 \pm 0,02 \times 10^{-2} \text{pg.cel}^{-1}$ , respectivamente), e inclusive en algunas muestras presentaron valores por debajo del límite de detección ( $<0,15 \mu\text{g. L}^{-1}$ ). Por el contrario, en cuanto a la toxicidad de las poblaciones del segundo experimento, se estimaron concentraciones y cuotas celulares de MCs altas ( $5,70 \pm 0,93 \mu\text{g. L}^{-1}$ ;  $0,22 \pm 0,06 \text{pg.cel}^{-1}$ , respectivamente), en concordancia con rangos de cuotas celulares de MCs observadas en poblaciones naturales de *Microcystis* spp. por otros autores (Buratti, 2017; Puddick, 2019).

Por lo anterior, se consideró a la cepa del primer experimento poco toxigénica, por lo que no se analizó la influencia del Fe sobre el contenido de MCs. Por otro lado, se demostró la toxicidad de la cepa del segundo experimento por lo cual se discuten a continuación sus resultados.

En el experimento 2, la mayor concentración de MCs observada en los últimos quince días de experimentación, podría deberse a la mayor cantidad de células. Lo anterior, se ve reflejado en las cuotas celulares de MCs que no presentaron diferencias significativas a lo largo del

experimento. Sin embargo, la cuota de MCs disminuyó en todos los tratamientos el día 26 (Figura 21-B). En particular, en el día 15 se observó que la cuota de MCs fue significativamente mayor en T1 que en T2. Lo anterior podría atribuirse a diferencias en la concentración de MCs, y no en abundancia celular (Figura 21- A y B). Aunque las diferencias en la concentración de Fe entre T1 y T2 no fueron tan pronunciadas en el día 15 (Figura 17), en el día 9, al agregar el segundo pulso de Fe en el T2, probablemente se generó una diferencia significativa de Fe entre los tratamientos lo que pudo haber sido causante de esta diferencia en las cuotas de MCs entre el T1 y el T2. Sin embargo, debido a la limitación de no haber podido medir las concentraciones todos los días del experimento tanto para las MCs como para el Fe, no se pudo comprobar de manera definitiva si esta diferencia fue causada por la adición del segundo pulso de Fe en el T2.

Otros trabajos, reportaron que cultivos de *M. aeruginosa* expuestos a niveles bajos de Fe mostraron una mayor concentración intracelular de MCs que las células con altas concentraciones de Fe (Sevilla *et al.*, 2008; Alexova *et al.*, 2011). En estos trabajos también se ha observado que las cepas productoras de MCs parecen permanecer viables durante períodos más prolongados en condiciones de bajas concentraciones de Fe. Lo anterior respaldaría la hipótesis de que las MCs pueden permitir que las células tóxicas absorban o almacenen Fe más eficientemente que las cepas no tóxicas (Utkilen & Gjolme, 1995; Sevilla *et al.*, 2008; Alexova *et al.*, 2011). En general, los resultados de este trabajo no mostraron diferencias significativas en las cuotas celulares de MCs y como se mencionó en el párrafo anterior, en el caso que sí se observaron (Día 15), las diferencias en la concentración de Fe entre T1 y T2 no fueron tan pronunciadas (Figura 19). Por lo tanto, las diferencias en la cuota de MCs observadas en este estudio no podrían asociarse directamente con el factor Fe.

Ceballos-Laita *et al.* (2017), demostraron que tanto una cepa de *M. aeruginosa* productora de MCs como una cepa que no las produce, crecen de manera similar en presencia de Fe (17  $\mu\text{M}$ ). Por otro lado, en condiciones de bajas concentraciones de Fe (0,05  $\mu\text{M}$ ), la cepa toxigénica crece ligeramente menos que en altas condiciones de Fe, mientras que la cepa que no produce MCs no presenta crecimiento. Esto sugiere que la unión de Fe a las MCs puede estar relacionada con una ventaja en la supervivencia para las colonias de esta especie.

Una hipótesis apoya la idea de que las MCs actuarían como quelantes de Fe intracelular (Utkilen & Gjølme, 1995) o como una molécula eliminadora de Fe extracelular (Ceballos-Laita *et al.*, 2017) y, como tal, la concentración de Fe en el agua regularía directamente la síntesis de MCs ya que las regiones que promueven que el gen *mcy* de *M. aeruginosa* sintetice las MCs, exhiben secuencias similares a las que regulan la captación de Fe (Martin-Luna *et al.*, 2006). Cuando la concentración de Fe en el agua es baja, las células sintetizarían más MCs (Sevilla *et al.*, 2008; Alexova, 2011) que a su vez actuarían como quelante de Fe, ya sea captando el Fe disponible y facilitando su absorción o almacenándolo dentro de la célula.

El Fe es uno de los nutrientes clave para el crecimiento de las algas debido a su importante papel en muchas funciones fisiológicas. Wang *et al.* (2018) establecieron diferentes tratamientos con Fe para investigar sus efectos sobre los índices fisiológicos y las expresiones genéticas de la biosíntesis de MCs en una cepa de *M. aeruginosa* productora de la toxina y propusieron una influencia indirecta del Fe en la biosíntesis de MCs. En contraste con los resultados de este trabajo, demostraron que la disminución de la capacidad fotosintética y la producción de energía por la limitación del Fe eventualmente causa la variación de las expresiones del gen *mcy* debido a la escasez de energía.

Entre otros factores que pudieran afectar el contenido de MCs, se conoce que el tamaño de las colonias se relaciona con la concentración de MCs durante una floración. Sabart *et al.*, (2013) reportaron que colonias de pequeño tamaño presentaban cuotas celulares de MCs altas. Además, indicaron que la distribución del tamaño de la colonia de una población de *Microcystis* spp. en respuesta a un evento de mezcla de la columna de agua podría ser una estrategia adaptativa que podría explicar su éxito ecológico en los ecosistemas de agua dulce, ya que demostraron que bajo condiciones de mezcla se provocaban cambios en la composición genotípica, el potencial tóxico y la distribución en el tamaño de las colonias, predominando las colonias más pequeñas. Estos cambios en el tamaño de las colonias podrían corresponder a una respuesta a las fluctuaciones ambientales que permita una mejor supervivencia y recolonización del cuerpo de agua después de un cambio en el ambiente, lo que podría significar una ventaja competitiva en condiciones ambientales desfavorables para las cianobacterias formadoras de colonias.

Como ya se mencionó anteriormente, el área de las colonias en las poblaciones del segundo experimento aumentó en todo el periodo experimental observándose diferencias significativas entre el primer y último día de experimentación, mientras que para las cuotas celulares de MCs no se observaron diferencias significativas entre el primer y último día en ninguno de los tratamientos. Lo anterior indicaría que nuestros resultados no confirman que las cuotas celulares de MCs se encuentren asociadas al tamaño de colonias.

## Conclusiones

Este trabajo contribuye al entendimiento de los factores que intervienen en la ocurrencia de floraciones de *Microcystis spp.* y su relación con la dinámica de los mismos en sistemas naturales.

Bajo las condiciones de experimentación de este trabajo se puede concluir que:

- 1) Según la variación de la abundancia celular observada, el Fe es un factor promotor del crecimiento de las poblaciones cuando la temperatura, radiación y P se mantienen en los rangos óptimos para su desarrollo.
- 2) Las concentraciones de Fe no influyen en el volumen celular ni el tamaño de colonias.
- 3) El rango óptimo de Fe para el crecimiento es de  $500 \mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $1000 \mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  bajo las condiciones puestas a prueba.
- 4) El crecimiento no es significativamente diferente cuando el Fe se suministra en diferentes pulsos (es decir,  $500 \mu\text{g Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  suministrados en un sólo pulso el primer día o en dos pulsos al inicio y a la mitad del experimento).
- 5) No se demuestra una relación clara entre el suministro de Fe y la cuota celular de MCs.

Por lo tanto, con respecto a las hipótesis propuestas en esta tesina:

1.- El hierro es un factor promotor del crecimiento de poblaciones naturales de *Microcystis spp.* del ESR, cuando la temperatura, radiación y P se mantienen en los rangos óptimos para su desarrollo. **No se rechaza.**

2.- El hierro provoca un efecto regulador negativo en el contenido de microcistinas. **Se rechaza.**

## Limitaciones del estudio y recomendaciones a futuro

- No fue posible realizar y/o repetir las determinaciones de las concentraciones de MCs y de FeSol. los 26 días que duraron ambos experimentos (ya que implicaba un costo muy alto) lo cual nos hubiese ayudado a obtener una mayor certeza entre la relación de estas dos variables.
- Otra limitación de este trabajo fue no haber podido medir tanto las fracciones de Fe (particulado y soluble) como las de MCs. Al disminuir el Fe no se sabe con certeza si las células lo incorporaron o pudo haber precipitado; esto lo hubiésemos sabido si se determinaban las fracciones de Fe. Por lo tanto, se recomienda diferenciar entre Fe soluble y particulado.
- En cuanto a la técnica de recuento de las colonias que se implementó se obtuvieron abundancias celulares con desviaciones altas, por lo que se podría intentar otro método de estimación para que tanto los valores de abundancia celular como de cuota celular de MCs que se obtengan sean más precisos.
- También se podría acompañar con estudios de biología molecular para mejorar la precisión y poder obtener resultados sobre la producción celular y no sólo sobre contenido celular de MCs.
- Se requieren más estudios donde se comparen diferentes lapsos de tiempo entre los pulsos de Fe, que permitan confirmar el efecto de los mismos sobre el crecimiento de *Microcystis* spp. A partir de esto, se podrían plantear diversos escenarios de concentración de Fe en sistemas naturales eutrofizados (*e.g.*, diferentes profundidades) y sus efectos en la dinámica de las poblaciones de *Microcystis* spp
- Este trabajo sugiere continuar con los estudios sobre el rol que cumplen los micronutrientes en el crecimiento de las cianobacterias, la formación de floraciones y la producción de MCs en poblaciones naturales para comprender el funcionamiento de los ambientes eutróficos y poder tomar medidas para mitigar la proliferación desmedida y sus consecuencias.



## Bibliografía

- Alexova R., Fujii M., Birch D., Cheng J., Waite T.D., Ferrari B.C., Neilan B.A. (2011) Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environ. Microbiol.* 13, 1064-1077.
- Amaral, V., Bonilla, S., & Aubriot, L. (2014). "Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations". *European journal of phycology*, 49(1), 134-141.
- Amé V., Díaz M., Wunderlin D. (2003). "Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque reservoir (Córdoba, Argentina): A field and chemometric study", *Environ Toxicol*, Vol. 18 No 3, Marzo, pp.192-201.
- APHA (American Public Health Association) (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington, D.C
- Aubriot, L., Bonilla, S., & Falkner, G. (2011). "Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations". *FEMS microbiology ecology*, 77(1), 1-16.
- Babica P., Blaha L., Marsalek B. (2006). *Exploring the natural role of microcystins - review of effects on photoautotrophic organisms*. *Journal of Phycology* 42(1): 9-20.
- Bazán, R., Larrosa, N., Bonansea, M., López, A., Busso, F., & Cosavella, A. (2014). *Programa de monitoreo de calidad de agua del Embalse Los Molinos, Córdoba - Argentina*. *Revista De La Facultad De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 1(2), 27-34.
- Belzile C., Demers S., Ferreyra GA., Schloss I., Nozais C., Lacoste K., Mostajir B., Roy S., Gosselin M., Pelletier E., Gianese SMF., Vernet M. (2006). "UV Effects on marine planktonic food webs: A synthesis of results from mesocosm studies", Vol. 82, Marzo, pp. 850-856.
- Bistoni, M. B., Pelliccioni, P., Butti, A., Ruiz, M., & Lerda, D. (2009). Efectos sobre la salud, en una población cercana al paredón del Dique San Roque, derivados del uso de agua contaminada con algas tóxicas. *Anuario Digital de Investigación Educativa*, (20).

- Bonansea, M., Bazán, R., Ferrero, S., Rodríguez, C., Ledesma, C., & Pinotti, L. (2018). Multivariate statistical analysis for estimating surface water quality in reservoirs. *International Journal of Hydrology Science and Technology*, 8(1), 52-68.
- Bonansea, M., Bazán, R., Germán, A., Ferral, A., Beltramone, G., Cossavella, A., & Pinotti, L. (2021). Assessing land use and land cover change in Los Molinos reservoir watershed and the effect on the reservoir water quality. *Journal of South American Earth Sciences*, 108, 103243.
- Brookes, J. D., & Ganf, G. G. (2001). Variations in the buoyancy response of *Microcystis aeruginosa* to nitrogen, phosphorus and light. *Journal of plankton research*, 23(12), 1399-1411.
- Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of toxicology*, 91, 1049-1130.
- Carvajal Cruz, G. E. (2011). *Ocurrencia de floraciones de cianobacterias tóxicas en cuerpos de agua dulce, Argentina* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Cao, Z., Li, P., & Li, Z. H. (2021). A latest review on the application of microcosm model in environmental research. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- Ceballos-Laita, L., Marcuello, C., Lostao, A., Calvo-Begueria, L., Velazquez-Campoy, A., Bes, M. T., ... & Peleato, M. L. (2017). Microcystin-LR binds iron, and iron promotes self-assembly. *Environmental Science & Technology*, 51(9), 4841-4850.
- Chorus I., Bartram J. (1999). "Toxic Cyanobacteria in water: A guide to the public health consequences, monitoring and management". Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- Cirés, Samuel & Quesada, Antonio. (2011). Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas.

Dai, R., Wang, P., Jia, P., Zhang, Y., Chu, X., & Wang, Y. (2016). A review on factors affecting microcystins production by algae in aquatic environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-7.

Forsgren, G. and Jansson, M. (1992). "The turnover of river-transported iron, phosphorus and organic carbon y Öre estuary, northern Sweden". *Hydrobiologia* 235/236: 585-596.

Fujii, M.; Rose, A.L.; David Waite, T. (2011). Iron uptake by toxic and nontoxic strains of *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 7068–7071.

Gress, C. D., Treble, R. G., Matz, C. J., & Weger, H. G. (2004). BIOLOGICAL AVAILABILITY OF IRON TO THE FRESHWATER CYANOBACTERIUM ANABAENA FLOS-AQUAE 1. *Journal of Phycology*, 40(5), 879-886.

Halac, S.R., Villafañe, V.E., Gonçalves, R.J. & Helbling, E.W. (2011). *Long-Term UVR Effects Upon Phytoplankton Natural Communities of Patagonian Coastal Waters*, Libro 2 de *Remote sensing of biomass: Principles and applications*. Intech Open Access Publishers, [ <http://www.intechweb.org>].

Halac, S. R., Bazán, R. D. V., Larrosa, N. B., Nadal, A. F., Ruibal-Conti, A. L., Rodriguez, M. I., ... & López, A. G. (2019). First report on negative association between cyanobacteria and fecal indicator bacteria at San Roque reservoir (Argentina): impact of environmental factors. *Journal of Freshwater Ecology*, 34(1), 273-291.

Halac, S., Mengo, L., Guerra, L., Lami, A., Musazzi, S., Loizeau, J. L., ... & Piovano, E. L. (2020). Paleolimnological reconstruction of the centennial eutrophication processes in a sub-tropical South American reservoir. *Journal of South American Earth Sciences*, 103, 102707.

Hillebrand, H., C. D. Duerselen, D. Kirschtel, U. Pollinger, and T. Zohary. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae.

Hopkinson, B.M., and Morel, F.M.M. (2009). The role of siderophores in iron acquisition by photosynthetic marine microorganisms. *Biometals* 22: 659-669.

Ibelings, B.W.; Mur, L.R.; Walsby, A.E. (1991) *Diurnal changes in buoyancy and vertical distribution in populations of Microcystis in two shallow lakes. J. Plankton Res., 13*, 419–436.

INA-CIRSA. Base de datos del monitoreo del Embalse San Roque, gestión de información de calidad de aguas y cianobacterias en la Región Semiárida. <https://www.ina.gov.ar/cirsa/index.php>

INA-CIRSA. Caracterización de la Calidad del Agua y Variables Meteorológicas Relacionadas con Eventos Extremos de Floraciones de Cianobacterias en el Embalse San Roque. (2018). Este documento está disponible en línea en: [https://www.ina.gov.ar/archivos/publicaciones/2018\\_Pussetto%20et%20al\\_Caracterizaci%C3%B3n%20Calidad%20Agua%20Eventos%20Extremos.pdf](https://www.ina.gov.ar/archivos/publicaciones/2018_Pussetto%20et%20al_Caracterizaci%C3%B3n%20Calidad%20Agua%20Eventos%20Extremos.pdf)

Jang, M.H., Jung J. M. and Takamura N. (2007). “*Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and infochemical concentrations*”. *Limnology and Oceanography* 52: 1454 – 1466.

Komárek, J., & Anagnostidis, K. (1998). Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1. *Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm. Science (USA)*.

Le Moal, M., Gascuel-Odoux, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., ... & Pinay, G. (2019). Eutrophication: a new wine in an old bottle? *Science of the total environment, 651*, 1-11.

Li, H., Murphy, T., Guo, J., Parr, T., & Nalewajko, C. (2009). Iron-stimulated growth and microcystin production of *Microcystis novacekii* UAM 250. *Limnologica, 39*(3), 255-259.

Li, Z. K., Dai, G. Z., Juneau, P., & Qiu, B. S. (2016). Capsular polysaccharides facilitate enhanced iron acquisition by the colonial cyanobacterium *Microcystis* sp. isolated from a freshwater lake. *Journal of phycology, 52*(1), 105-115.

Long, B. M., Jones, G. J., & Orr, P. T. (2001). Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(1), 278-283.

- López Rodas, V., Gonzalez, R., & Costas, E. (2012). “*Separation between toxin-producing and non-toxic clones of Microcystis aeruginosa using lectins*”. En *anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 78, No. 1, pp. 123-137). Farmacia, 9 y 11, Madrid, 00000, Spain: Real Academia Nacional Farmacia.
- Lukač, M., & Aegerter, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 31(3), 293-305.
- Lyck, S., Gjølme, N., & Utkilen, H. (1996). Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*, 35(sup6), 120-124.
- Ma, J., Brookes, J. D., Qin, B., Paerl, H. W., Gao, G., Wu, P., ... & Niu, H. (2014). Environmental factors controlling colony formation in blooms of the cyanobacteria *Microcystis* spp. in Lake Taihu, China. *Harmful algae*, 31, 136-142.
- Ma, X., Li, M., Jiang, E., Pan, B., & Gao, L. (2021). Humic acid inhibits colony formation of the cyanobacterium *Microcystis* at high level of iron. *Chemosphere*, 281, 130742.
- Martin-Luna, B., Sevilla, E., Hernandez, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2006). Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry*, 67(9), 876-881.
- MacIntyre H. & Cullen J. (2005) Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. En Andersen R. (ed). *Algal Culture Techniques*. Phycological Society of America, pp. 287-326.
- Mengo, L., Halac, S., Foray, G., Costamagna, I., & Piovano, E. (2022). A SEDIMENTARY RECORD OF THE ENVIROMENTAL EVOLUTION AND CHANGES IN TROPHIC STATE OF SAN ROQUE RESERVOIR (CÓRDOBA, ARGENTINA) DURING THE 20TH-21ST CENTURIES.
- Molot I.A., Watson S.B., Creed I.F., Trick C.G., McCabe S.K., Verschoor M.J., Sorichetti R.J., Powe C., Venkiteswaran J.J. & Schiff I. (2014). “*A novel model for cyanobacteria bloom formation: the critical role of anoxia and ferrous iron*”, *Freshw. Biol.*, Vol 59, Enero, pp.1323– 1340.

Pavlova V., S. Furnadzhieva, J. Rose, R. Andreeva, Zl. Bratanova, A. Nayak, (2010) “Effect of Temperature and Light Intensity on the Growth, Chlorophyll A Concentration and Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa*”.

Pflugmacher S. (2002). *Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems*. Environmental Toxicology 17: 407-413.

Puddick, J., Thomson-Laing, G., & Wood, S. A. (2019). Microcystins in New Zealand: a review of occurrence, congener diversity and cell quotas. *New Zealand Journal of Botany*, 57(2), 93-111.

Pussetto, N., Piovano, E. L., Rodriguez, M. I., Ruiz, M. A., & Halac, S. R. (2020). Modelo conceptual del funcionamiento del embalse San Roque: dinámica sedimentaria y geoquímica.

Rastogi, R. P., Sinha, R. P., & Incharoensakdi, A. (2014). The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13, 215-249.

Reynolds, C. S. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press.

Rodríguez, M.I. (2003). “*Estudio de la problemática de eutrofización en el Embalse San Roque (Córdoba)*”, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Córdoba (Argentina).

Rodríguez M.I. & Ruiz M. (2016). “*Limnology of the San Roque Reservoir*”, Cap. 2 de *The Environmental Handbook of Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Alemania.

Ruibal Conti, A.L., Guerrero, J.M. & Rigueira, J.M. (2005). “*Levels of microcystins in two Argentinean reservoirs used for water supply and recreation: differences in the implementation of safe levels*”, Environ. Toxicol., Vol. 20, enero, pp. 263–269.

Ruiz, M., Galanti, L., Ruibal, A.L., Rodriguez, M.I., Wunderlin, D.A. & Amé, M.V. (2013). *First Report of microcystins and anatoxin-a co-occurrence in San Roque reservoir (Córdoba, Argentina)*, Water Air Soil Pollut., Vol. 224, Mayo, pp. 1593-1610.

Sabart, M., Misson, B., Descroix, A., Duffaud, E., Combourieu, B., Salençon, M. J., & Latour, D. (2013). The importance of small colonies in sustaining *Microcystis* population exposed to mixing conditions: an exploration through colony size, genotypic composition and toxic potential. *Environmental microbiology reports*, 5(5), 747-756.

- Scarafia, M.E., Agnesse, A.M. & Cabrera, J.L. (1995). “*Microcystis aeruginosa*: Behaviour and toxic features in San Roque dam (Argentina)”. *Nat. toxins*, Vol. 3, Marzo, pp. 75-77.
- Schindler, D. W., Hecky, R. E., Findlay, D. L., Stainton, M. P., Parker, B. R., Paterson, M. J., ... & Kasian, S. (2008). Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), 11254-11258.
- Sevilla E., Martin-Luna B., Vela L., Bes M.T., Fillat M.F., Peleato M.L. (2008). Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa*. PCC7806. *Environ. Microbiol.* 10, 2476-2483.
- Utkilen, H., & Gjølme, N. (1992). Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Applied and environmental microbiology*, 58(4), 1321-1325.
- Utkilen, H., & Gjølme, N. I. N. A. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 797-800.
- Walsby, A. E., & McAllister, G. K. (1987). “*Buoyancy regulation by Microcystis in Lake Okaro*”. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21, 521-524.
- Wang, C., Wang, X., Wang, P., Chen, B., Hou, J., Qian, J., & Yang, Y. (2016). Effects of iron on growth, antioxidant enzyme activity, bound extracellular polymeric substances and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* FACHB-905. *Ecotoxicology and environmental safety*, 132, 231-239.
- Wang, X., Wang, P., Wang, C., Hu, B., Ren, L., & Yang, Y. (2018). Microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa*: Indirect regulation by iron variation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 942-952.
- Wetzel, R. (1981) *Limnología*. Ed. Omega, Barcelona, España.
- Wurtsbaugh, W. A., Paerl, H. W., & Dodds, W. K. (2019). Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 6(5), e1373.

- Xiao, Y., Gan, N., Liu, J., Zheng, L., & Song, L. (2012). Heterogeneity of buoyancy in response to light between two buoyant types of cyanobacterium *Microcystis*. *Hydrobiologia*, *679*, 297-311.
- Xiao, M., Li, M., & Reynolds, C. S. (2018). Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. *Biological Reviews*, *93*(3), 1399-1420.
- Xing, W.; Huang, W.; Li, D.; Liu, Y. (2007). Effects of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency, and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. *Curr. Microbiol.* 2007, *55*, 94–98.
- Yang, Z., & Kong, F. (2013). Abiotic factors in colony formation: effects of nutrition and light on extracellular polysaccharide production and cell aggregates of *Microcystis aeruginosa*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, *31*(4), 796-802.
- Zar, J. H. (1984). *Statistical Significance of Mutation Frequencies, and the Power of Statistical Testing, Using the Poisson Distribution*. *Biometrical Journal*, *26*(1), 83 – 88. doi:10.1002/bimj.4710260116.
- Zhu, W., Zhou, X., Chen, H., Gao, L., Xiao, M., & Li, M. (2016). High nutrient concentration and temperature alleviated formation of large colonies of *Microcystis*: evidence from field investigations and laboratory experiments. *Water research*, *101*, 167-175.



## ANEXO 1

### Caracterización de la comunidad fitoplanctónica durante las floraciones de *Microcystis* spp.

**Tabla Anexo 1.** Caracterización de la comunidad de fitoplancton recolectada durante una floración de *Microcystis* spp. para experimentos de microcosmos en marzo de 2017 (Muestra 2017) y febrero de 2018 (Muestra 2018).

Composición de fitoplancton en el centro del embalse		Abundancia celular (cél. L <sup>-1</sup> )	Contribución al total de la abundancia (%)
<b>Muestra 2017</b>			
Cyanobacteria	<i>Microcystis</i> spp.	3.0×10 <sup>7</sup>	95.2
Dynophyceae	<i>Ceratium furcoides</i>	1.2×10 <sup>6</sup>	3.81
Diatomeae	<i>Aulacoseira granulata</i>	1.0×10 <sup>5</sup>	0.32
	<i>Cyclotella</i> sp.	1.8×10 <sup>5</sup>	0.57
Chlorophyceae	<i>Monorraphydium</i> sp.	3.3×10 <sup>4</sup>	0.10
Cryptista	<i>Cryptomonas</i> sp.	2.0×10 <sup>3</sup>	0.006
<b>Muestra 2018</b>			
Cyanobacteria	<i>Microcystis</i> spp.	7.3×10 <sup>7</sup>	97.3
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	1.8×10 <sup>6</sup>	2.40
	<i>Dolichospermum</i> spp.	3.7×10 <sup>5</sup>	0.49
Diatomeae	<i>Cyclotella</i> sp.	8.5×10 <sup>3</sup>	0.01
	<i>Nitzschia</i> sp.	1.4×10 <sup>3</sup>	0.002
Chlorophyceae	<i>Pediastrum</i> sp.	3.4×10 <sup>4</sup>	0.04
Zygnematophyceae	<i>Staurastrum</i> sp.	4.2×10 <sup>3</sup>	0.005
Cryptista	<i>Chroomonas</i> sp.	2.5×10 <sup>4</sup>	0.05
	<i>Cryptomonas</i> sp.	1.4×10 <sup>3</sup>	0.002

## ANEXO 2

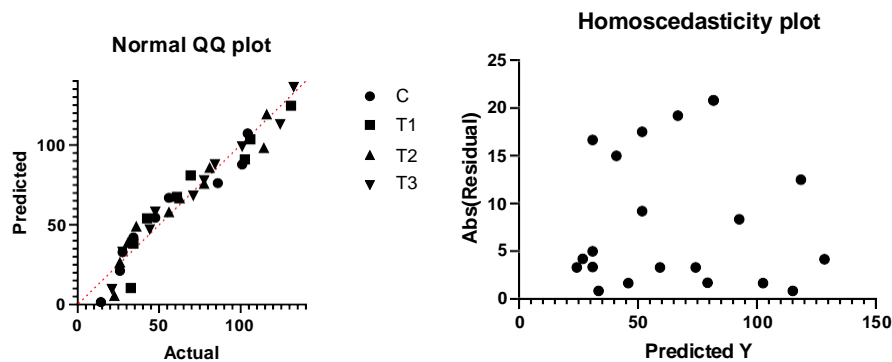
### Experimento 1. Comprobación de supuestos y ANOVA

#### Variables fisicoquímicas

#### Anexo 2.1A: Fósforo Reactivo Soluble

#### Comprobación de supuestos previo a ANOVA a dos vías

Shapiro-Wilk test				
W	0,9008	0,8823	0,9044	0,9521
P value	0,2237	0,1385	0,2447	0,6939
Passed normality test (alpha=0.05)?	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns	ns



Two-way ANOVA	Ordinary
Alpha	0,05

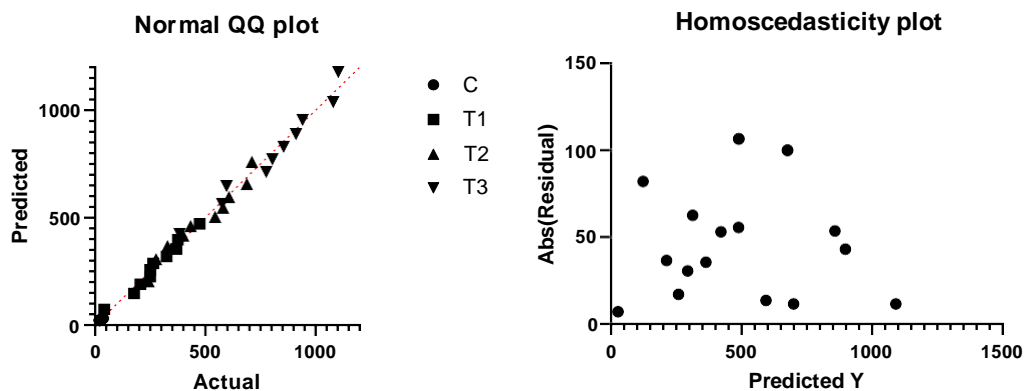
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	5,733	0,4210	ns	No
Días	81,38	<0,0001	****	Yes
Tratamiento	4,083	0,0504	ns	No
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	2648	12	220,7	F (12, 20) = 1,085
Días	37584	4	9396	F (4, 20) = 46,20
Tratamiento	1886	3	628,7	F (3, 20) = 3,091
Residual	4068	20	203,4	

## Tasa de decaimiento PRS

ANOVA summary	
F	2,982
P value	0,1593
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R square	0,6910

## Anexo 2.1B: Hierro Soluble

### Comprobación de supuestos previo a ANOVA a dos vías



<b>Two-way ANOVA</b>	Ordinary
Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	5,771	0,0024	**	Yes
Días	12,93	<0,0001	****	Yes
Tratamiento	79,00	<0,0001	****	Yes
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	236567	12	19714	F (12, 20) = 4,188
Días	529884	4	132471	F (4, 20) = 28,14
Tratamiento	3238462	3	1079487	F (3, 20) = 229,3
Residual	94153	20	4708	

## Tasa de decaimiento FeSol.

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0667
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. ( $P < 0.05$ )?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	4,571

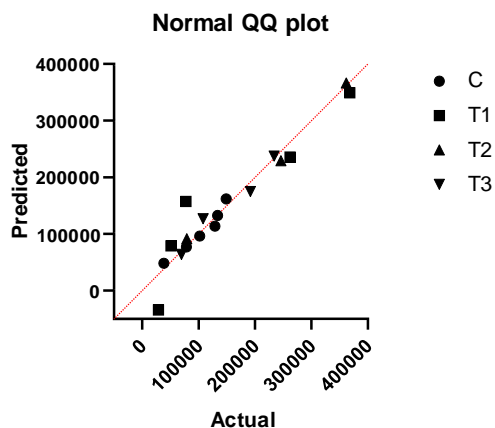
## Variables Biológicas

### Anexo 2.1C: Abundancia Celular

Comprobación de supuestos previo a ANOVA a una vía por cada día de experimentación

#### Día 1

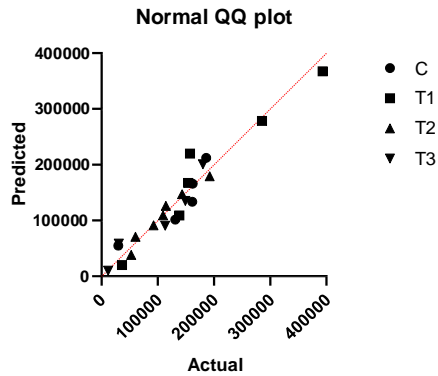
<b>Shapiro-Wilk test</b>				
W	0,9337	0,8527	0,9894	0,9454
P value	0,6092	0,2032	0,8026	0,6875
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns	ns



<b>ANOVA summary</b>	
F	0,9341
<b>P value</b>	<b>0,4502</b>
P value summary	ns
<b>Significant diff. among means (<math>P &lt; 0.05</math>)?</b>	<b>No</b>
R square	0,1668
<b>Brown-Forsythe test</b>	
F (DFn, DFd)	1,082 (3, 14)
<b>P value</b>	<b>0,3889</b>
P value summary	ns
<b>Are SDs significantly different (<math>P &lt; 0.05</math>)?</b>	<b>No</b>

*Día 5*

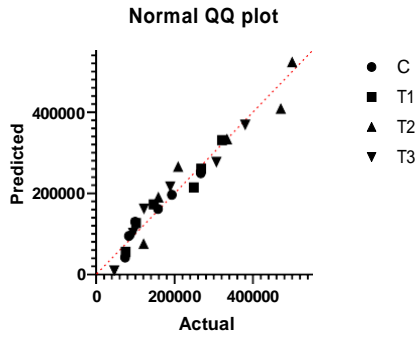
<b>Shapiro-Wilk test</b>				
W	0,8212	0,9305	0,9514	0,8787
P value	0,1194	0,5839	0,7424	0,2633
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns	ns



<b>ANOVA summary</b>	
F	1,557
<b>P value</b>	<b>0,2310</b>
P value summary	ns
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>
R square	0,1893
<b>Bartlett's test</b>	
Bartlett's statistic (corrected)	5,284
<b>P value</b>	<b>0,1521</b>
P value summary	ns
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>

*Día 8*

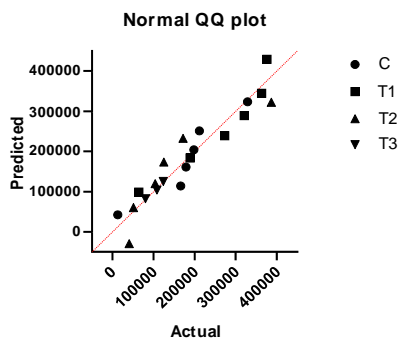
<b>Shapiro-Wilk test</b>				
W	0,9067	0,9233	0,8972	0,9319
P value	0,4150	0,5295	0,3577	0,5950
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns	ns



<b>ANOVA summary</b>	
F	1,734
<b>P value</b>	<b>0,1923</b>
P value summary	ns
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>
R square	0,2064
<b>Bartlett's test</b>	
Bartlett's statistic (corrected)	2,875
<b>P value</b>	<b>0,4113</b>
P value summary	ns
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>

*Día 14*

<b>Shapiro-Wilk test</b>				
W	0,9191	0,9026	0,8239	0,9758
P value	0,4989	0,3894	0,0954	0,7017
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns	ns

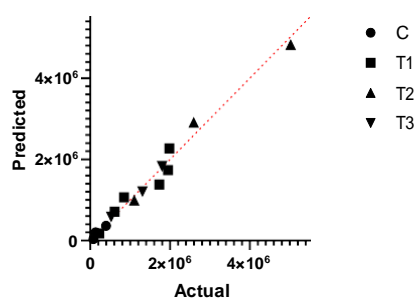


ANOVA summary	
F	1,832
<b>P value</b>	<b>0,1797</b>
P value summary	ns
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>
R square	0,2443
Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	0,6616 (3, 17)
<b>P value</b>	<b>0,5869</b>
P value summary	ns
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>

Día 26

Shapiro-Wilk test				
W	0,8770	0,8719	0,9812	0,9823
P value	0,3156	0,2340	0,7373	0,7451
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns	ns

Normal QQ plot



ANOVA summary	
F	3,590
<b>P value</b>	<b>0,0499</b>
P value summary	*
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>Yes</b>
R square	0,4947

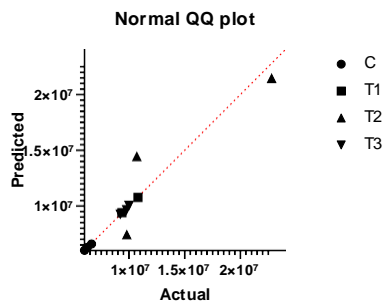
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
C vs. T1	-1021467	-3204861 to 1161928	No	ns
<b>C vs. T2</b>	-2700133	-5221300 to -178967	<b>Yes</b>	*
C vs. T3	-1007800	-3528967 to 1513367	No	ns
Brown-Forsythe test				
F (DFn, DFd)	2,366 (3, 11)			
<b>P value</b>	<b>0,1268</b>			
P value summary	ns			
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>			

### Anexo 2.1D: Tasas de Crecimiento

ANOVA summary				
F	15,47			
P value	<b>0,0249</b>			
P value summary	*			
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes			
R square	0,9393			
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. T1	-0,1850	-0,3760 to 0,006005	No	ns
<b>Control vs. T2</b>	<b>-0,2200</b>	<b>-0,4110 to -0,02899</b>	<b>Yes</b>	<b>*</b>
<b>Control vs. T3</b>	<b>-0,2750</b>	<b>-0,5089 to -0,04107</b>	<b>Yes</b>	<b>*</b>

### Anexo 2.1E: Biovolumen

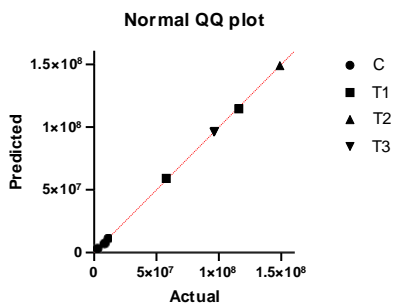
Día 1



ANOVA summary	
F	2,774
P value	<b>0,1105</b>
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	<b>No</b>
R square	0,5099
Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	1,048 (3, 8)
P value	0,4226
P value summary	ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	<b>No</b>



**Día 26**



ANOVA summary	
F	15,37
<b>P value</b>	<b>0,0116</b>
P value summary	*
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>Yes</b>
R square	0,9202

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
<b>C vs. T1</b>	-79496667	-156697875 to -2295458	<b>Yes</b>	*
<b>C vs. T2</b>	-141596667	-239249329 to -43944004	<b>Yes</b>	*
<b>C vs. T3</b>	-88946667	-166147875 to -11745458	<b>Yes</b>	*

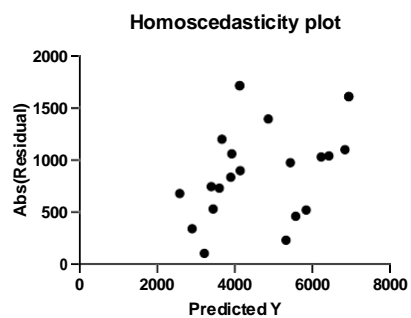
**ANOVA a dos vías para ver diferencias entre el *Día 1* y *Día 26***

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
<b>Día 1 - Día 26</b>				
<b>C</b>	-1023333	-28628780 to 26582113	No	ns
<b>T1</b>	-76820000	-112964014 to -40675986	<b>Yes</b>	***
<b>T2</b>	-134566667	-176302179 to -92831155	<b>Yes</b>	****
<b>T3</b>	-86680000	-119674819 to -53685181	<b>Yes</b>	****

## Anexo 2.1F: Tamaño de Colonias

### Comprobación de supuestos previo a ANOVA a dos vías

<b>Shapiro-Wilk test</b>				
W	0,8332	0,8401	0,8186	0,9145
P value	0,1469	0,1652	0,1140	0,4950
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns	ns



<b>Two-way ANOVA</b>	Ordinary			
Alpha	0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	19,76	0,5128	ns	No
Días	43,83	0,0017	**	Yes
Tratamiento	2,157	0,7409	ns	No

<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>95,00% CI of diff,</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>
Día 1 vs. Día 26	2988	961,0 to 5014	Yes	**

## Anexo 2.1G: Microcistinas

### Comprobación de supuestos

<b>Shapiro-Wilk test</b>				
W	0,9055	0,8513	0,8751	0,8957
P value	0,4413	0,1986	0,2879	0,3868
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns	ns

## ANOVA a dos vías

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	32,15	0,0043	**	Yes
Row Factor	15,98	0,0033	**	Yes
Column Factor	37,67	<0,0001	****	Yes
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	0,2450	12	0,02042	F (12, 20) = 3,775
Row Factor	0,1218	4	0,03044	F (4, 20) = 5,629
Column Factor	0,2870	3	0,09568	F (3, 20) = 17,69
Residual	0,1082	20	0,005409	

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
Día 5				
C vs. T1	0,2350	0,02916 to 0,4408	Yes	*
T1 vs. T2	-0,3515	-0,5573 to -0,1457	Yes	***
T2 vs. T3	0,2215	0,01566 to 0,4273	Yes	*
Día 8				
C vs. T2	-0,4020	-0,6078 to -0,1962	Yes	***
T1 vs. T2	-0,3995	-0,6053 to -0,1937	Yes	***
T2 vs. T3	0,2845	0,07866 to 0,4903	Yes	**
Día 26				
C vs. T2	-0,2910	-0,4968 to -0,08516	Yes	**
T1 vs. T2	-0,3175	-0,5233 to -0,1117	Yes	**
T2 vs. T3	0,3710	0,1652 to 0,5768	Yes	***

## Anexo 2.1H: Cuota Celular de Microcistinas

No se pudieron comprobar los supuestos de normalidad porque el  $n$  no alcanzó ( $n=2$ ).

ANOVA de una vía en los días de crecimiento exponencial (últimos dos días de experimentación)

Test no paramétrico al no cumplirse los supuestos

*Día 14*

<b>Kruskal-Wallis test</b>	
P value	0,1238
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. ( $P < 0.05$ )?	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	5,333

*Día 26*

<b>Kruskal-Wallis test</b>	
P value	0,1619
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. ( $P < 0.05$ )?	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	5,167

## ANEXO 3

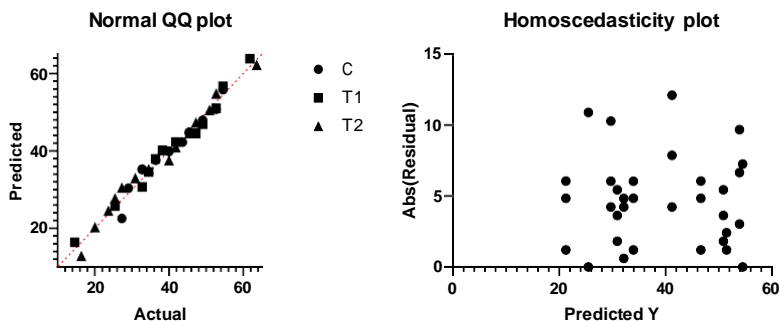
### Experimento 2. Comprobación de supuestos y ANOVA

Variables fisicoquímicas

#### Anexo 3.2A: Fósforo Reactivo Soluble

Comprobación de supuestos previo a ANOVA a dos vías

<b>Shapiro-Wilk test</b>			
W	0,9284	0,9741	0,9750
P value	0,2585	0,9138	0,9239
<b>Passed normality test (<math>\alpha=0.05</math>)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns



<b>Two-way ANOVA</b>	Ordinary
Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	8,956	0,2157	ns	No
Días	67,05	<0,0001	****	Yes
Tratamiento	0,8942	0,5658	ns	No
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	544,9	8	68,11	F (8, 30) = 1,454
Días	4079	4	1020	F (4, 30) = 21,76
Tratamiento	54,40	2	27,20	F (2, 30) = 0,5805
Residual	1406	30	46,85	

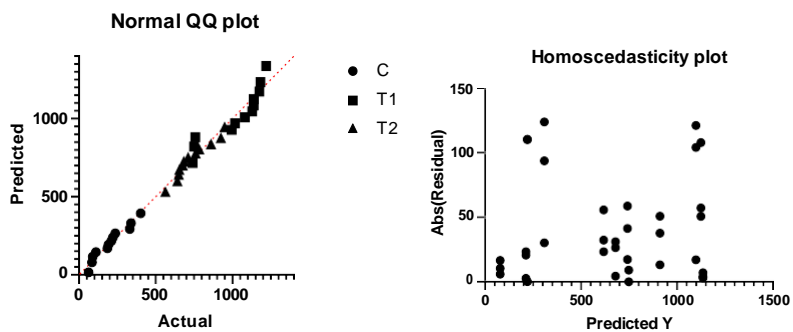
### Tasa de decaimiento PRS

Kruskal-Wallis test	
P value	0,2000
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	3,714

### Anexo 3.2B: Hierro Soluble

#### Comprobación de supuestos previo a ANOVA a dos vías

<b>D'Agostino &amp; Pearson test</b>			
K2	0,7857	2,436	1,120
P value	0,6751	0,2958	0,5713
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns



<b>Two-way ANOVA</b>	Ordinary
Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	8,924	<0,0001	****	Yes
Días	2,176	0,0010	***	Yes
Tratamiento	86,61	<0,0001	****	Yes
<b>ANOVA table</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
Interaction	429809	6	71635	F (6, 24) = 15,61
Días	104791	3	34930	F (3, 24) = 7,609
Tratamiento	4171496	2	2085748	F (2, 24) = 454,4
Residual	110170	24	4590	

### Tasa de decaimiento FeSol.

Kruskal-Wallis test	
P value	0,7429
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0,7143

## Variables Biológicas

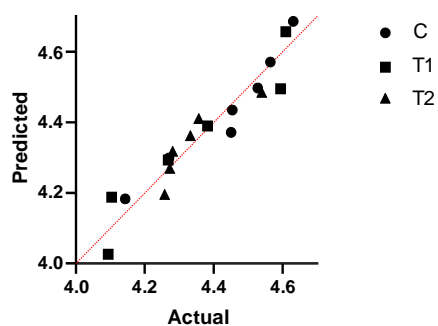
### Anexo 3.2C: Abundancia Celular

Comprobación de supuestos previo a ANOVA a una vía por cada día de experimentación

#### Día 1

Shapiro-Wilk test			
W	0,9235	0,8818	0,7972
P value	0,4973	0,2775	0,0555
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns

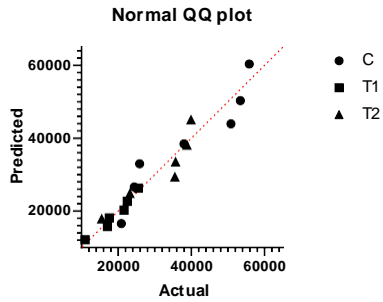
Normal QQ plot



ANOVA summary	
F	0,6304
<b>P value</b>	<b>0,5451</b>
P value summary	ns
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>
R square	0,07304
<b>Bartlett's test</b>	
Bartlett's statistic (corrected)	2,556
<b>P value</b>	<b>0,2786</b>
P value summary	ns
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>

#### Día 4

Shapiro-Wilk test			
W	0,8650	0,9595	0,8364
P value	0,1678	0,8158	0,1216
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns

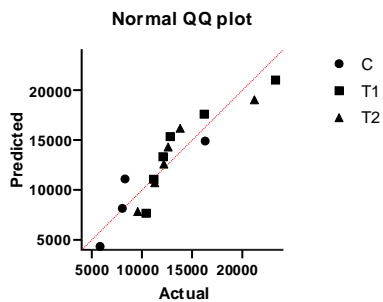


ANOVA summary	
F	4,957
<b>P value</b>	<b>0,0211</b>
P value summary	*
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>Yes</b>
R square	0,3826

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
<b>C vs. T1</b>	19240	3380 to 35101	<b>Yes</b>	*
<b>Bartlett's test</b>				
Bartlett's statistic (corrected)	4,855			
<b>P value</b>	<b>0,0883</b>			
P value summary	ns			
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>			

*Día 8*

Shapiro-Wilk test			
W	0,8296	0,8175	0,8205
P value	0,1667	0,0840	0,0891
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns



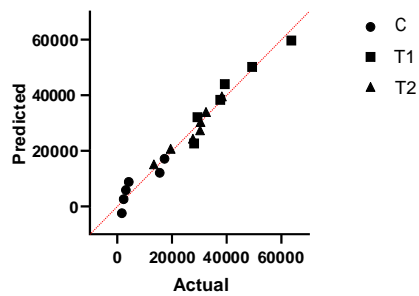


<b>ANOVA summary</b>	
F	1,416
<b>P value</b>	<b>0,2777</b>
P value summary	ns
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>
R square	0,1789
<b>Bartlett's test</b>	
Bartlett's statistic (corrected)	0,1421
<b>P value</b>	<b>0,9314</b>
P value summary	ns
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>

*Día 15*

<b>Shapiro-Wilk test</b>			
W	0,8744	0,9426	0,8739
P value	0,2444	0,6800	0,2005
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns

Normal QQ plot



<b>ANOVA summary</b>	
F	19,50
<b>P value</b>	<b>&lt;0,0001</b>
P value summary	****
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>Yes</b>
R square	0,7091

<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
<b>C vs. T1</b>	-0,9033	-1,301 to -0,5061	<b>Yes</b>	****
<b>C vs. T2</b>	-0,7228	-1,106 to -0,3401	<b>Yes</b>	***
<b>Brown-Forsythe test</b>				
F (DFn, DFd)	3,319 (2, 16)			
<b>P value</b>	<b>0,0623</b>			
P value summary	ns			
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>			

*Día 26*

<b>Shapiro-Wilk test</b>			
W	0,8929	0,9429	0,9693
<b>P value</b>	<b>0,3718</b>	<b>0,6824</b>	<b>0,8878</b>
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns

<b>ANOVA summary</b>	
F	19,16
<b>P value</b>	<b>&lt;0,0001</b>
P value summary	****
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>Yes</b>
R square	0,7324

<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
<b>C vs. T1</b>	-142879	-204845 to -80913	<b>Yes</b>	****
<b>C vs. T2</b>	-105329	-167295 to -43363	<b>Yes</b>	**
<b>Brown-Forsythe test</b>				
F (DFn, DFd)	2,249 (2, 14)			
<b>P value</b>	<b>0,1422</b>			
P value summary	ns			
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>			

### Anexo 3.2D: Tasas de Crecimiento

<b>ANOVA summary</b>				
F		7,977		
<b>P value</b>		<b>0,0204</b>		
P value summary		*		
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>		<b>Yes</b>		
R square		0,7267		
<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
<b>Control vs. T1</b>	-0,06000	-0,1148 to -0,005240	<b>Yes</b>	*
<b>Control vs. T2</b>	-0,06333	-0,1181 to -0,008574	<b>Yes</b>	*

### Anexo 3.2E: Biovolumen

Comprobación de supuestos previo a ANOVA a una vía en los días de fase exponencial (últimos dos días de experimentación)

*Día 15*

Test no paramétrico al no cumplirse los supuestos:

<b>Kruskal-Wallis test</b>	
<b>P value</b>	<b>0,0002</b>
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	9,846

<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Mean rank diff,</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>
<b>C vs. T1</b>	<b>-8,000</b>	<b>Yes</b>	<b>**</b>

*Día 26*

Test no paramétrico al no cumplirse los supuestos:

<b>Kruskal-Wallis test</b>	
<b>P value</b>	<b>0,0005</b>
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
<b>Do the medians vary signif. (P &lt; 0.05)?</b>	<b>Yes</b>
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	9,302

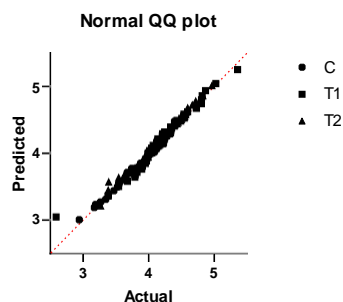
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary
C vs. T1	-7,750	Yes	**

### Anexo 3.2F: Tamaño de Colonias

Comprobación de supuestos previo a ANOVA a una vía en los días de crecimiento exponencial (últimos dos días de experimentación)

Día 15

Shapiro-Wilk test			
W	0,9662	0,9665	0,9789
P value	0,3307	0,1345	0,2509
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns



ANOVA summary	
F	23,95
<b>P value</b>	<b>&lt;0,0001</b>
P value summary	****
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	<b>Yes</b>
R square	0,2293
<b>Bartlett's test</b>	
Bartlett's statistic (corrected)	3,917
<b>P value</b>	<b>0,1411</b>
P value summary	ns
<b>Are SDs significantly different (P &lt; 0.05)?</b>	<b>No</b>

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
C vs. T1	-0,5535	-0,7615 to -0,3455	<b>Yes</b>	****
C vs. T2	-0,5165	-0,7129 to -0,3200	<b>Yes</b>	****

*Día 26*

**Test no paramétrico al no cumplirse el supuesto de normalidad**

<b>Kruskal-Wallis test</b>			
<b>P value</b>		<b>&lt;0,0001</b>	
Exact or approximate P value?		Approximate	
P value summary		****	
<b>Do the medians vary signif. (P &lt; 0.05)?</b>		<b>Yes</b>	
Number of groups		3	
Kruskal-Wallis statistic		83,63	
<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	Mean rank diff,	Significant?	Summary
<b>C vs. T1</b>	-87,16	<b>Yes</b>	****
<b>C vs. T2</b>	-82,60	<b>Yes</b>	****

**ANOVA a dos vías para ver diferencia en los días**

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	
Interaction	34,24	0,0008	***	
Días	37,04	<0,0001	****	
Tratamiento	19,31	0,0002	***	
<b>Tukey's multiple comparisons test</b>		<b>Mean Diff,</b>	<b>95,00% CI of diff,</b>	<b>Significant?</b>
Día 1:T1 vs. Día 26:T1		-35160	-55289 to -15031	Yes
Día 1:T2 vs. Día 26:T2		-27165	-47294 to -7036	Yes

**Anexo 3.2G: Microcistinas**

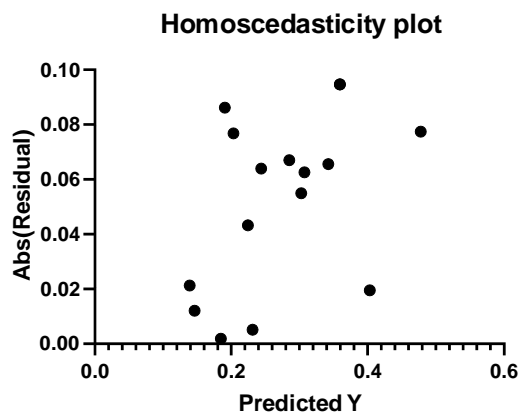
**ANOVA a dos vías**

<b>Two-way ANOVA</b>	<b>Ordinary</b>				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	33,31	0,0028	**	Yes	
Row Factor	37,25	0,0002	***	Yes	
Column Factor	17,58	0,0011	**	Yes	
<b>Tukey's multiple comparisons test</b>		<b>Mean Diff,</b>	<b>95,00% CI of diff,</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>
Día 15					
C vs. T1		-16,86	-28,96 to -4,757	Yes	**
T1 vs. T2		12,82	0,7122 to 24,92	Yes	*
Día 26					
C vs. T1		-31,31	-43,41 to -19,20	Yes	****
C vs. T2		-24,60	-36,70 to -12,49	Yes	***

### Anexo 3.2H: Cuota Celular de Microcistinas

#### Comprobación de supuestos

Shapiro-Wilk test			
W	0,9414	0,9811	0,9738
P value	0,6758	0,9406	0,8991
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
P value summary	ns	ns	ns



#### ANOVA a dos vías

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	29,32	0,1234	ns	No
Row Factor	31,03	0,0183	*	Yes
Column Factor	11,68	0,0730	ns	No
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	0,1070	8	0,01337	F (8, 15) = 1,966
Row Factor	0,1132	4	0,02829	F (4, 15) = 4,160
Column Factor	0,04260	2	0,02130	F (2, 15) = 3,132
Residual	0,1020	15	0,006802	

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
<b>Día 15</b>				
C vs. T1	-0,04370	-0,2579 to 0,1705	No	ns
C vs. T2	0,1747	-0,03954 to 0,3889	No	ns
<b>T1 vs. T2</b>	<b>0,2184</b>	<b>0,004166 to 0,4326</b>	<b>Yes</b>	<b>*</b>

## ANEXO 4

### Volúmenes celulares en el Experimento 1

Se midieron los volúmenes del primer y último día de experimentación.

Día de Experimentación	Tratamientos	Promedio Volumen ( $\mu\text{m}^3$ )
1	Control	60,72373397 $\pm$ 3,047753416
	T1	63,19643837 $\pm$ 0,8300709836
	T2	63,02552949 $\pm$ 2,73372111
	T3	63,94292356 $\pm$ 2,828428109
26	Control	71,66742452 $\pm$ 11,42200423
	T1	75,68079212 $\pm$ 1,560088402
	T2	74,95204308 $\pm$ 8,360975831
	T3	70,09138598 $\pm$ 1,547190754

### Volúmenes celulares en el Experimento 2

Días de Experimentación	Tratamientos	Promedio Volumen ( $\mu\text{m}^3$ )
1	Control	63,11620406 $\pm$ 7,355781219
	T1	64,87354106 $\pm$ 0,7039138722
	T2	65,87413061 $\pm$ 0,7111334387
4	Control	64,87354106 $\pm$ 0,7039138722
	T1	60,98247716 $\pm$ 2,026248689
	T2	62,96334043 $\pm$ 4,827612383
8	Control	61,07225752 $\pm$ 6,079740599
	T1	60,05208143 $\pm$ 3,342026961
	T2	61,93266782 $\pm$ 0,6824761799
15	Control	61,43374322 $\pm$ 2,560626013
	T1	68,38058349 $\pm$ 7,020726517
	T2	67,6581745 $\pm$ 1,614508536
26	Control	65,19600429 $\pm$ 1,887878449
	T1	70,49070694 $\pm$ 3,389513199
	T2	72,2494628 $\pm$ 3,300157985