

La importancia de usar el biovolumen en estudios de fitoplancton y monitoreo ambiental de cianobacterias

SYLVIA BONILLA^{1,✉} & INÉS O'FARRELL²

¹ Grupo de Ecología y Fisiología de Fitoplancton. Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay. ² Departamento de Ecología, Genética y Evolución, IEGEBA (UBA-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina.

RESUMEN. La biomasa del fitoplancton es una variable que se usa en estudios de ecología y en monitoreos de floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas. El bioindicador de la biomasa puede ser desde general e indirecto, como la concentración de la clorofila *a*, a específico y cuasi-directo, como el biovolumen. Basadas en búsquedas bibliográficas y en los resultados de una encuesta dirigida a científicos y técnicos de América Latina, discutimos la importancia de usar el biovolumen como la variable más apropiada para estimar la biomasa, el costo que tiene cuantificar el fitoplancton utilizando diferentes unidades de recuento y las implicancias en la interpretación de los resultados. Las unidades de cuantificación utilizadas para reportar el fitoplancton fueron el individuo, la célula y el biovolumen. El individuo representa la unidad biológica natural del organismo (células, cenobios, colonias o filamentos) y varía ampliamente en tamaño. Por lo tanto, el fitoplancton reportado en individuos por unidad de volumen puede llevar a errores de interpretación conceptuales, de los cuales el más grave es subestimar la biomasa de las floraciones. Las células tienen grandes variaciones en su tamaño, por lo que su abundancia puede correlacionarse pobremente con el biovolumen o con la concentración de la clorofila *a*. Recomendamos usar el biovolumen como indicador de biomasa para el fitoplancton en general, y de forma imperativa para el monitoreo de cianobacterias.

[Palabras clave: América Latina, recuento, biomasa, ecología, limnología, métodos]

ABSTRACT. The importance of using biovolume in phytoplankton studies and cyanobacterial monitoring. Phytoplankton biomass is a variable used in ecological studies and in monitoring potentially toxic cyanobacterial blooms. Biomass indicators of this community range from general and indirect, such as chlorophyll *a* concentrations, to specific and quasi-direct measures such as biovolume. Based on the results of a survey addressed to Latin American scientists and technicians as well as a bibliographic search, we discuss the relevance of using biovolume as the most appropriate indicator of biomass, the effort of quantifying phytoplankton using different counting units and the implications for interpretation of the results. Individuals, cells and biovolume were the quantitative units used to report phytoplankton. The individual represents the natural biological unit of the organism (cells, coenobia, colonies or filaments) and has a wide size range. We strongly advise that the phytoplankton reported as individuals per unit volume can lead to conceptual misinterpretation, such as the underestimation of the biomass of blooms. As cells have a large variation in their sizes, it poorly correlates with biovolume or chlorophyll *a* concentration. Considering all these aspects is crucial when selecting quantitative bioindicators to monitor potentially toxic cyanobacteria. We strongly recommend the use of biovolume as a biomass indicator for phytoplankton in general and consider it imperative for monitoring cyanobacteria.

[Keywords: Latin America, counting, biomass, ecology, limnology, methods]

PROBLEMÁTICA

La cuantificación de los organismos es un aspecto clave en los estudios ecológicos para interpretar la dinámica y la estructura del fitoplancton y los factores ambientales que lo condicionan. Dado que el fitoplancton está compuesto por especies que varían en tamaño (hasta 7 órdenes de magnitud) y en niveles de organización (i.e., unicelular, cenobio, colonial y filamentos) (Reynolds 1994; Bonilla and Pick 2017), la selección de la variable cuantitativa a

reportar es central para obtener información válida y debe ser seleccionada con cuidado según los objetivos del estudio. El biovolumen es el estimador más preciso de biomasa fresca, una variable relevante para los estudios de ecología acuática (Saccà 2017), pero imperativa para el monitoreo ambiental de cianobacterias potencialmente tóxicas (Chorus and Welker 2021). Su cálculo se basa en asignar formas geométricas sencillas a los organismos (células o individuos) (Hillebrand et al. 1999) y luego

Editor asociado: Fernando Unrein

Recibido: 3 de Febrero de 2023

Aceptado: 27 de Abril de 2023

✉ sbon@fcien.edu.uy

multiplicar la abundancia de los mismos, obtenida del recuento, por el volumen calculado (generalmente expresado en μm^3) (Tabla 1). Dicho cálculo puede ser engorroso, insueme tiempo y depende de la disponibilidad de microscopios con altos aumentos, reglillas calibradas y cámaras de fotos con programas para analizar las imágenes (Saccà 2017). Las limitaciones más importantes para los limnólogos de muchas regiones de América Latina siguen siendo el reducido número de técnicos e investigadores, la falta de equipamiento científico apropiado y la barrera del lenguaje (Ramírez and Gutiérrez-Fonseca 2020), que limita las consultas a bibliografía de referencia (en su gran mayoría, en inglés). Estos aspectos repercuten de forma negativa en la incorporación de nuevos métodos o en la posibilidad de enmendar prácticas erróneas, como, por ejemplo, el uso de redes de plancton para recolectar muestras para recuentos.

Las cianobacterias planctónicas pueden crecer y acumularse formando floraciones como consecuencia de temperaturas elevadas, enriquecimiento de nitrógeno y fósforo o condiciones hidráulicas particulares (e.g., tiempo de residencia y niveles hídricos bajos) (Bonilla and Pick 2017; Huisman et al. 2018). Estos organismos producen toxinas peligrosas para el ser humano, lo cual limita o impide los distintos usos del recurso hídrico y ocasiona cambios en las tramas tróficas y la biodiversidad del ecosistema acuático (Carmichael and Boyer 2016; Svirčev et al. 2019). A fin del siglo pasado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó una primera compilación del impacto global de las cianobacterias; en ella estableció niveles guía (NG) y de alerta (NA) del agua para consumo humano (a potabilizar) y de recreación utilizando valores umbrales de abundancia de células y biovolumen de cianobacterias, concentración de la clorofila *a* fitoplanctónica y concentración de una toxina (microcistina-LR)

(Chorus and Bartram 1999). Recientemente, Chorus y Welker (2021) actualizaron dicho trabajo y resaltaron la importancia de utilizar el biovolumen como el mejor estimador de la biomasa para evaluar la peligrosidad de exposición a cianotoxinas, ya que los NA se basan en la relación biomasa-toxina.

En este trabajo recalcamos el valor de usar el biovolumen como variable indicadora de la biomasa fitoplanctónica, y su importancia para estudios ecológicos y en monitoreos de cianobacterias. Buscamos que aquellos limnólogos y técnicos de América Latina que aún no incorporaron el uso de esta variable encuentren argumentos convincentes para comenzar a utilizarla de ahora en adelante.

Aproximación utilizada

Realizamos un relevamiento de publicaciones científicas en Google Académico y Scielo (del 2000 al 2019) de estudios en sistemas acuáticos de América Latina, en los que se cuantificó el fitoplancton límnic utilizando células o individuos como indicadores cuantitativos. Además, elaboramos una encuesta con cuatro preguntas y dirigida en forma anónima a investigadores latinoamericanos para evaluar el tiempo invertido en procesar muestras de fitoplancton (muestra biodiversa, de floración de cianobacterias o de una planta potabilizadora) como indicador de los costos de horas de trabajo técnico altamente calificado. En dicha encuesta también se recabó la percepción subjetiva de los investigadores sobre el valor de las variables (i.e., células, individuos y biovolumen) (alta, media, baja o nula según que: permite establecer niveles de riesgo, suficiente para analizar la estructura y la dinámica del fitoplancton en relación con las variables ambientales; suficiente para reportar riesgo potencial de exposición a cianobacterias; útil solo como paso intermedio para calcular biomasa; ninguna de las anteriores).

Tabla 1. Pasos a seguir para el cálculo del biovolumen. De izquierda a derecha: según el organismo se elige la forma geométrica más próxima (esfera, ovoide, cilindro, etc.), se toman las medidas lineales requeridas, se calcula el volumen (en este caso el volumen celular) y se lo multiplica por la abundancia para obtener el biovolumen.

Table 1. Steps to follow in biovolume calculation. From left to right: selection of the closest geometric shape (sphere, ovoid, cylinder, etc.), measurement of the required dimensions, volume calculation (cell volume in this case) and multiplication by abundance to obtain the biovolume.

Organismo	Forma geométrica	Medidas lineales (μm)	Volumen de la célula (μm^3)	Abundancia (células/L)	Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\text{L}$)
<i>Dolichospermum planctonicum</i>	Célula: esfera $\pi/6 * d^3$	Diámetro celular (d): 8	268	500	134000

EVALUACIÓN Y RECOMENDACIONES

La importancia de seleccionar adecuadamente la variable de cuantificación y sus implicancias

En la búsqueda bibliográfica se encontraron 42 publicaciones científicas realizadas en la región por científicos latinoamericanos, en las cuales la unidad para reportar el fitoplancton fue individuos (64%) o células (29%). Los estudios se realizaron en diversos tipos de ambientes límnicos como lagos (45% del total), embalses (26%), lagunas (17%) y ríos (12%) en la Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, México, Nicaragua y Venezuela. Del total de esos artículos, 12 se referían en particular a floraciones de cianobacterias, toxinas o monitoreo ambiental, en las que el 75% reportó los valores en individuos por litro y el 25% en células por litro. Se registró un estudio de evaluación en planta de tratamiento en el que también se expresaron los resultados en individuos por litro. Estos resultados evidencian que se continúa usando el individuo como unidad para reportar la abundancia del fitoplancton. Esta unidad no permite distinguir el tamaño de los organismos, ya que existen diferencias de varios órdenes de magnitud entre individuos que sean células muy pequeñas e individuos que sean colonias de cientos o miles de células. Dadas las enormes diferencias de tamaño entre los organismos del fitoplancton, la comparación y evaluación de la comunidad se debe basar en un indicador que represente la biomasa. En un trabajo de revisión sobre los monitoreos de floraciones de cianobacterias en América Latina, Aguilera et al. (2023) encontraron que el 89% de los trabajos reportaban las floraciones en células, mientras que el 11% restante

utilizaba individuos, e hicieron un llamado de atención sobre la necesidad de eliminar el uso de individuos como unidad de cuantificación. Para ejemplificar las limitaciones y los errores en la toma de decisiones que pueden resultar de expresar el fitoplancton en individuos por unidad de volumen, en la Tabla 2 incluimos un ejercicio simple. Al estudiar una comunidad con organismos que difieren en sus tamaños, se debe elegir con atención la variable de comparación. En el ejercicio planteado, usar el dato de la abundancia (5800 individuos/L) de *Cryptomonas minuta*, una criptofita de pequeño tamaño, puede dar una idea falsa de que este organismo tiene una contribución alta a la estructura de la comunidad. En un ejemplo análogo, si estudiáramos la estructura de una comunidad de autótrofos en un bosque basándonos solo en la abundancia de los individuos, podríamos concluir que está dominado por musgos. Claramente, las consecuencias pueden ser muy diferentes si se evalúa el cuerpo de agua según los datos expresados en individuos/L o en biovolumen (mm^3/L) (Tabla 2), ya que la proporción de los organismos en términos de biomasa en el total de la comunidad cambia (en varios órdenes de magnitud) y, por ende, pueden afectar las decisiones de gestión del recurso hídrico o la interpretación ecológica. En el caso de los organismos coloniales —en particular, las grandes cianobacterias como *Microcystis* spp.—, el mucílago (o vaina mucilaginoso) que envuelve a las células puede representar una fracción relevante de la biomasa. El biovolumen del individuo considerando el mucílago (ejemplo en Tabla 2) puede ser varios órdenes de magnitud superior al calculado solo en base a las células. El biovolumen calculado a partir del

Tabla 2. Ejercicio con una situación hipotética para discutir la enorme diferencia entre reportar el análisis de la muestra en individuos o en biomasa (biovolumen) por unidad de volumen (litros). Se indica el volumen específico del individuo en su nivel de organización. CYA: cianobacterias, CLO: clorofitas, CRY: criptofitas. ¿Usted diría que el fitoplancton está dominado por cianobacterias o por criptofitas?

Table 2. Exercise with a hypothetical situation to discuss the huge difference between reporting the results of the counts in individuals or in biomass (biovolume) per volume unit (litres). The specific volume of the individual at each level of organization is indicated. CYA: cyanobacteria, CLO: chlorophytes, CRY: cryptophytes. Would you say that phytoplankton is dominated by cyanobacteria or cryptophytes?

Nivel de organización	Volumen específico del individuo (μm^3)	Especies (Grupo)	Individuos/L	Biovolumen (mm^3/L)
Unicelular	1.37	<i>Cyanobium</i> sp. (CYA)	350	4.8×10^4
Colonial	7.73×10^5	<i>Microcystis aeruginosa</i> (CYA)	350	271.0
Colonial	2100	<i>Scenedesmus acutus</i> (CLO)	950	2.0
Unicelular	500	<i>Cryptomonas minuta</i> (CRY)	5800	2.9
Unicelular	340	<i>Navicula</i> sp. (DIA)	1200	0.4
TOTAL			8650	275.9

área ocupada por mucílago se debe considerar según los objetivos del trabajo; por ejemplo, en estudios de ecología de la comunidad de fitoplancton o de depredación en los que el tamaño de todo el individuo es clave por su palatabilidad. Para monitoreos ambientales o calibraciones de imágenes satelitales —en los que interesa la toxicidad potencial de los organismos—, se debe usar solo el biovolumen celular (i.e., sumatoria de las células, sin el mucílago). Esto permite realizar cálculos de cuota de toxina o de pigmentos por unidad de biomasa.

Cuarenta y cinco investigadores de diversos países de América Latina (Argentina, Uruguay, Brasil, México, Colombia, Ecuador y Chile) respondieron en forma anónima las preguntas referidas al esfuerzo de recuento (Figura 1). La cuantificación de una muestra diversa de fitoplancton es la que lleva más tiempo de procesar (promedios=104, 80 y 35 minutos, para fitoplancton, floración y muestra de planta de potabilización, respectivamente). El cálculo de biovolumen insume entre 2.5 y 3 veces más tiempo que el recuento a nivel de individuos, y entre 1.25 y 1.5 veces más que el recuento de las células (Figura 1). El

factor tiempo puede ser una limitante, ya que implica horas de trabajo técnico muy calificado siendo que la capacitación de técnicos e investigadores es costosa y lleva muchos años (Edler and Elbrächter 2010). Si bien hay grandes diferencias en el número de técnicos y equipamiento adecuado para procesar muestras de fitoplancton entre los países de América Latina —lo que refleja disparidades económicas—, existe una baja inversión en ciencia y tecnología en todo el continente (Ciocca and Delgado 2017).

La percepción del valor de las categorías cuantificadas claramente ubicó al biovolumen como la más relevante en la encuesta realizada (Figura 2); ésta permite analizar la estructura de la comunidad con relación a las variables ambientales y establecer niveles de riesgo con mayor verosimilitud, en particular, en el caso de floraciones de cianobacterias (Chorus and Welker 2021). En la mayoría de las respuestas, la variable individuos se entendió correctamente como un paso intermedio para calcular el biovolumen (Figura 2). La cuantificación de células se interpretó en forma más dispar, para el análisis y la toma de decisiones, y se destacan 11 respuestas que adjudican al

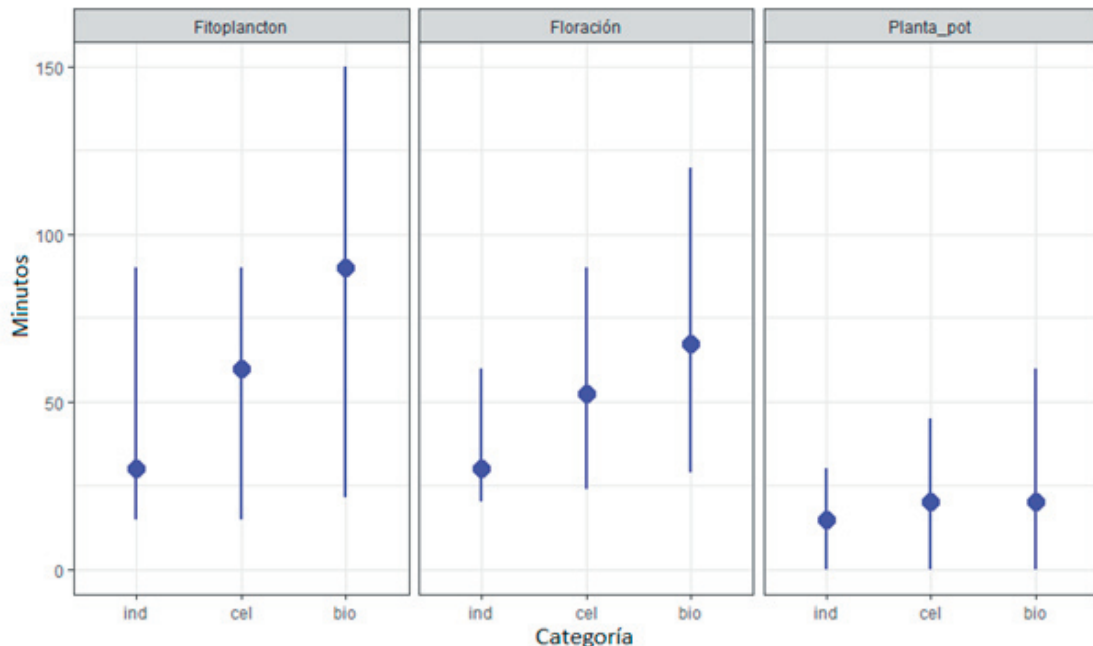


Figura 1. Resultados de la encuesta dirigida a técnicos e investigadores. Tiempo invertido (en minutos) para cuantificar muestras de fitoplancton biodiverso dominado por cianobacterias (floración) y muestra de agua en una planta potabilizadora (Planta_pot), para cada categoría: ind (individuos), cel (células) y bio (biovolumen). Mediana (círculo) y cuantiles 0.25/0.75 (línea vertical).

Figure 1. Results of the survey addressed to technicians and researchers. Time invested (in minutes) to quantify biodiverse phytoplankton samples, dominated by cyanobacteria (bloom) and a sample from a water treatment plant (Planta_pot), for each category: ind (individuals), cel (cells) and bio (biovolume). Median (circle) and quantiles 0.25/0.75 (vertical line).

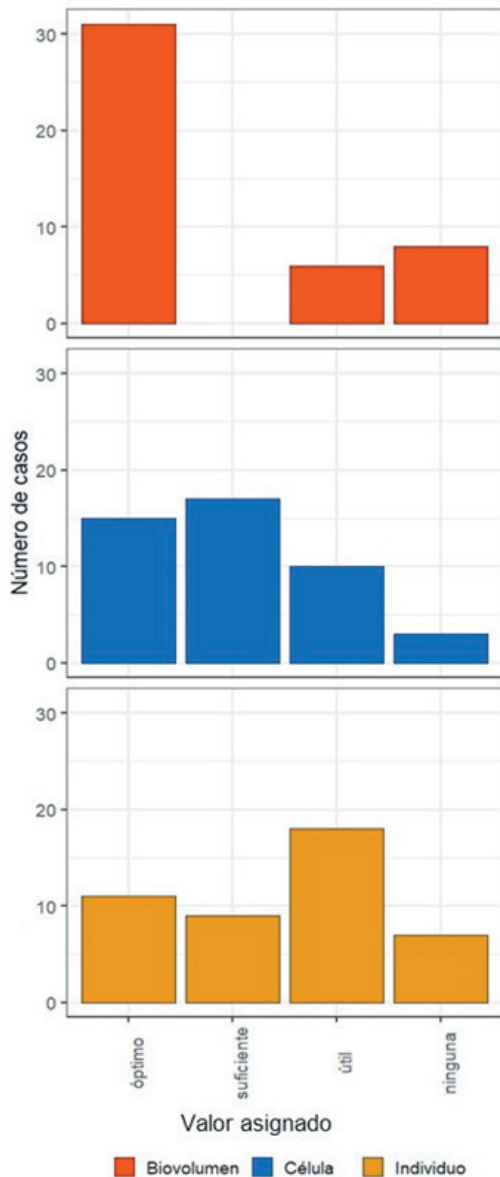


Figura 2. Percepción del valor asignado a la información obtenida en cada categoría de recuento (arriba: biovolumen, centro: célula, abajo: individuo). Óptimo: permite establecer niveles de riesgo (monitoreo de cianobacterias) y analizar la estructura y dinámica de la comunidad fitoplanctónica en relación con las variables ambientales; suficiente: permite reportar riesgo potencial de exposición a cianobacterias tóxicas; útil: solo usado como paso intermedio para calcular biomasa (biovolumen) y ninguna (no tiene ningún valor).

Figure 2. Perception of the value assigned to the information obtained in each counting category (top: biovolume, middle: cell, bottom: individual). Optimal (óptimo): allows establishing risk levels (monitoring of cyanobacteria) and analyzing the structure and dynamics of the phytoplankton community in relation to environmental variables; Sufficient (suficiente): allows reporting potential risk of exposure to toxic cyanobacteria; Useful (útil): only used as an intermediate step to calculate biomass (biovolume) and none (ninguna): it has no value.

individuo un valor erróneo como variable útil en análisis ecológicos o en situaciones de riesgo para la salud (Figura 2). Si bien los resultados indicaron la preponderancia del uso del biovolumen, aún existen percepciones erróneas en cuanto a células e individuos; se las debería corregir o interpretar de forma correcta en las prácticas de los laboratorios que procesen muestras de fitoplancton.

El método de Utermöhl, indicado para cuantificar el fitoplancton y estimar después el biovolumen, se basa en la sedimentación de los organismos, a partir de una muestra cuantitativa, en una cámara de sedimentación (Sournia 1978; Alveal et al. 1995; Bonilla et al. 2016; O'Farrell 2022). El recuento se realiza luego en microscopio invertido, y es uno de los métodos más usados para muestras naturales de fitoplancton (Edler and Elbrächter 2010). El volumen de las cámaras de sedimentación a utilizar depende inversamente de la abundancia de organismos en la muestra, pero también de la turbidez inorgánica (e.g., limo o arcilla) que puede dificultar la visibilidad de los organismos. En sistemas acuáticos eutróficos a hipereutróficos o con floraciones de cianobacterias, se puede cuantificar con cámaras rectangulares de 1 mL (llamadas Sedwick-Rafter) bajo microscopio óptico directo a bajas magnificaciones (Sournia 1978).

Para el cálculo del biovolumen, existen varios trabajos que sugieren la forma más apropiada para géneros fitoplanctónicos (Hillebrand et al. 1999; Sun and Liu 2003; Mohan et al. 2021) y programas que facilitan estos cálculos (Zohary et al. 2016; Borics et al. 2021). Este último es un programa *online*, de acceso libre, con una base de datos para más de 3000 taxa de microalgas y cianobacterias (Borics et al. 2021) (freshwater-ecology.com:3838/3D_Algae/). Todos estos aspectos metodológicos cobran relevancia particular en los monitoreos de cianobacterias potencialmente tóxicas.

La importancia del uso de la biomasa en el monitoreo ambiental de cianobacterias potencialmente tóxicas

Los niveles de alerta propuestos por la OMS se derivan de cocientes generales entre las concentraciones de microcistinas y los biovolúmenes de cianobacterias de una amplia variedad de ecosistemas (Chorus and Welker 2021). Se recomienda realizar una evaluación periódica de las relaciones entre la concentración de toxinas y el biovolumen

en los cuerpos de agua a monitorear, ya que estas pueden variar con el tiempo (Sitoki et al. 2012). Los cocientes biovolumen/microcistina constituyen una aproximación conservadora para establecer valores recomendables generales para otras toxinas (e.g., cilindrospermopsinas, saxitoxinas y anatoxinas) que no cuentan con información suficiente, dado que sus concentraciones en los cuerpos de agua son típicamente inferiores a las de las microcistina (Chorus and Welker 2021).

En el caso que se quiera adaptar los NA de la OMS a circunstancias locales o nacionales que utilizan recuentos de células como bioindicador para el monitoreo de cianobacterias, es importante calibrar los mismos de acuerdo al análisis de las cuotas celulares de toxinas (concentración de toxina por célula) utilizando las especies y cepas autóctonas (Chorus and Welker 2021). La variación del tamaño celular de las cianobacterias influirá en sesgar la información de peligrosidad potencial al expresar los resultados como toxinas/célula en lugar de

toxina/biovolumen. Por ejemplo, una floración con la misma abundancia de células pero de especies con diámetros celulares diferentes —y por lo tanto, volúmenes celulares diferentes (*Aphanocapsa delicatissima*: 0.52 μm^3 , *Microcystis aeruginosa* 65.44 μm^3 , *Dolichospermum circinale*: 268 μm^3)—, desarrollarán biomasa cuyos biovolúmenes totales diferirán en hasta cuatro órdenes de magnitud, con diferentes consecuencias para el ecosistema y la salud humana (Huisman et al. 2018). Algunos países de América Latina (e.g., Brasil, Uruguay y Perú) cuentan con reglamentaciones ambientales para monitorear el biovolumen o la abundancia (células) de cianobacterias (Aguilera et al. 2023). Sin embargo, en el caso de Brasil, la reglamentación fue modificada en 2011 (Ministério da Saúde Portaria N^o-2.914, 12/12/2011: tinyurl.com/bddfkex) con el objetivo de simplificar el método, eliminando el uso del biovolumen y dejando solo el uso de la abundancia (recuento celular) de cianobacterias como variable indicadora. Esto lleva lamentablemente a restringir el valor de la información obtenida y va a contracorriente de lo sugerido con claridad

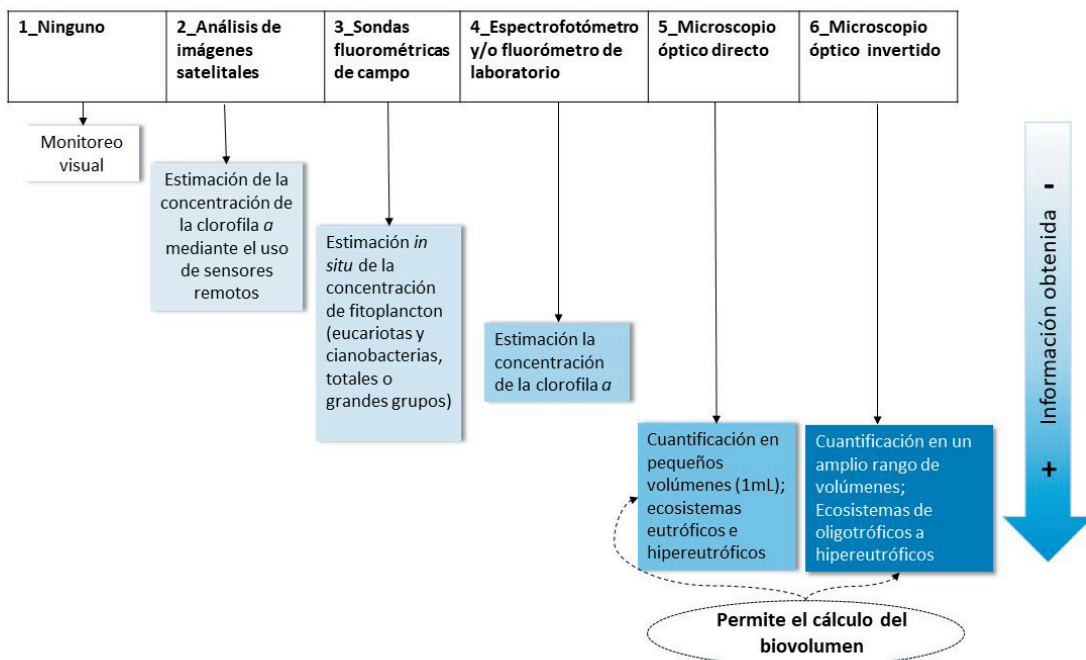


Figura 3. Esquema que resume los diferentes métodos de rutina para los estudios de fitoplancton y de monitoreo de cianobacterias, ordenados de menor a mayor información obtenida de la variable biomasa. Las últimas dos categorías incluyen la posibilidad de calcular el biovolumen. Los métodos responden a 6 categorías de equipamiento posible (desde ninguno: 1).

Figure 3. Diagram summarizing the different routine methods for phytoplankton studies and cyanobacteria monitoring, ordered from those providing least to most information obtained about biomass. The last two categories include the possibility of biovolume calculation. The methods respond to 6 categories of potential equipment (from none: 1).

en la última modificación de las guías de la OMS (Chorus and Welker 2021).

Para alertar, predecir o mitigar el impacto de las floraciones se requiere un abordaje integral que contemple tanto los múltiples aspectos ecológicos y toxicológicos en cada ambiente en particular como las posibilidades técnicas y de recursos humanos para monitorear estos eventos (Almuhtaram et al. 2021). Es importante entonces considerar el uso de otros métodos válidos en forma alternativa o complementaria al recuento en microscopio, según las posibilidades de cada laboratorio (Figura 3). Los métodos indirectos de cuantificación de la biomasa de fitoplancton por lo general se basan en mediciones de pigmentos. Históricamente, el más común ha sido la cuantificación espectrofotométrica o fluorométrica de la clorofila-*a* en extractos orgánicos (Lorenzen 1967; Nusch 1980; Ritchie 2006), pero se debe realizar una observación previa de la muestra para corroborar la dominancia de cianobacterias (Chorus and Welker 2021). Alternativas más recientes son la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* y pigmentos marcadores de las cianobacterias, como la ficocianina, que se miden con sondas sumergibles o fluorómetros de mano (Zamyadi et al. 2016; Cremella et al. 2018) (Figura 3). La fluorescencia *in vivo* es de medición instantánea y se puede obtener un gran número de datos con alta frecuencia (en boyas con sondas acopladas), lo que puede facilitar la toma de decisiones ante incrementos de cianobacterias (Ahn et al. 2007). Más recientemente, el uso de sensores remotos se ha extendido como herramienta de monitoreo para cuerpos de agua límnicos afectados por floraciones de cianobacterias, utilizando algoritmos para estimar la concentración de la clorofila *a* y la ficocianina a partir del análisis de imágenes satelitales (Mishra and Mishra 2014; Maciel et al. 2022; Pamula et al. 2023; Zabaleta et al. 2023). Otros métodos en desarrollo incluyen aplicaciones para teléfonos inteligentes, basadas en niveles de color del agua (Mitroi et al. 2020), o incluso el monitoreo visual involucrando a la población en monitoreos participativos (Bazán et al. 2020; Nabout et al. 2022).

Recomendaciones finales

Los estudios de la ecología del fitoplancton y los monitoreos de cianobacterias deben estar basados sobre el uso del biovolumen como la 'mejor' variable indicadora de biomasa de estos organismos (Figura 3). El individuo, como unidad de cuantificación para reportar abundancia de fitoplancton, lleva a resultados erróneos que pueden tener consecuencias graves para la salud humana y animal en el caso del monitoreo de cianobacterias. Esta variable se debe usar como paso intermedio para calcular el biovolumen en monitoreos ambientales. El individuo se puede utilizar como variable de respuesta solo en objetivos particulares, como, por ejemplo, en estudios ecológicos de depredación, de dispersión de especies o en toxicología.

La falta de personal técnico o de equipamiento adecuado en laboratorios que procesan muestras de fitoplancton no debe impedir buscar alternativas para estimar la biomasa de la comunidad, en particular en el caso de los monitoreos ambientales (Figura 3). Los métodos indirectos se usan como complemento de las cuantificaciones de las muestras en el microscopio, y constituyen un primer nivel de análisis para tomar luego la decisión de analizar muestras al microscopio, o también se pueden emplear como alternativa en caso de no contar con equipamiento para determinar el biovolumen. Algunos de estos métodos tienen bajos costos, por lo que se pueden utilizar aun en situaciones de ausencia de infraestructura, de equipamiento o de personal técnico altamente capacitado. Esperamos que este trabajo sea un llamado de atención para los técnicos e investigadores de América Latina que trabajan con fitoplancton a la hora de elegir el método de cuantificación, entendiendo las limitaciones y la calidad de la información obtenida en cada caso. Siendo un continente tan heterogéneo, pero que enfrenta muchas problemáticas ambientales similares, esperamos que este trabajo contribuya a la reflexión y la búsqueda de criterios unificados para asegurar información de fitoplancton comparable y de calidad.

REFERENCIAS

- Aguilera, A., V. Almanza, S. Haakonsson, H. Palacio, G. A. Benitez Rodas, M. U. G. Barros, J. Capelo-Neto, R. Urrutia, L. Aubriot, and S. Bonilla. 2023. Cyanobacterial bloom monitoring and assessment in Latin America. *Harmful Algae* 125:102429. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102429>.
- Ahn, C., S. Joung, S. Yoon, and H. Oh. 2007. Alternative alert system for cyanobacterial bloom, using phycocyanin as a level determinant. *The Journal of Microbiology* 45:98-104.

- Almuhtaram, H., F. A. Kibuye, S. Ajjampur, C. M. Glover, R. Hofmann, V. Gaget, C. Owen, E. C. Wert, and A. Zamyadi. 2021. State of knowledge on early warning tools for cyanobacteria detection. *Ecological Indicators* 133:108442. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108442>.
- Alveal, K., M. E. Ferrario, E. C. Oliveira, and E. Sar. 1995. Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción.
- Bazán, R., A. M. Cossavella, H. Calvimonte, J. D. Lozada, C. M. G. Rodríguez, G. Carnicelli, A. Casas, J. Greta, G. Calamuchita, and E. A. Storni. 2020. El aporte de la ciencia ciudadana para generar un monitoreo visual de cianobacterias en el embalse Los Molinos, Córdoba, Argentina. *Innotec* 21:109-131. <https://doi.org/10.26461/21.01>.
- Bonilla, S., A. Fabre, and L. De León. 2016. Fitoplancton. Pp. 129-168 en R. Arocena (ed.). Principios y métodos de limnología: ejemplos de Uruguay. Primera edición. DIRAC, Montevideo.
- Bonilla, S., and F. R. Pick. 2017. Freshwater bloom-forming cyanobacteria and anthropogenic change. e-lecture. *Limnology and Oceanography* 7:1-62. <https://doi.org/10.1002/loe2.10006>.
- Borics, G., V. Lerf, E. T-Krasznai, I. Stankovi, L. Pickó, V. Béres, and G. Várbró. 2021. Biovolume and surface area calculations for microalgae, using realistic 3D models. *Science of the Total Environment* 773:145538. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145538>.
- Carmichael, W. W., and G. L. Boyer. 2016. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful Algae* 54:194-212. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.002>.
- Chorus, I., and J. Bartram. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. *En* I. Chorus and J. Bartram (eds.). Primera edición. WHO, E and FN Spon, London. <https://doi.org/10.4324/9780203478073>.
- Chorus, I., and M. Welker. 2021. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. Pp. 859 *en* I. Chorus and M. Welker (eds.). 1st edition. CRC Press, on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH, Boca Raton (Florida). <https://doi.org/10.1201/9781003081449-1>.
- Ciocca, D. R., and G. Delgado. 2017. The reality of scientific research in Latin America; an insider's perspective. *Cell Stress and Chaperones* 22:847-852. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0815-8>.
- Cremella, B., Y. Huot, and S. Bonilla. 2018. Interpretation of total phytoplankton and cyanobacteria fluorescence from cross-calibrated fluorometers, including sensitivity to turbidity and colored dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography: Methods* 16:881-894. <https://doi.org/10.1002/lom3.10290>.
- Edler, L., and M. Elbrächter. 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. Pp. 13-20 *en* B. Karlson, C. Cusack and E. Bresnan (eds.). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. (IOC Manuals and Guides, no. 55), UNESCO, Paris.
- Hillebrand, H., C.-D. Dürselen, D. Kirschtel, U. Pollingher, and T. Zohary. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35:403-424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>.
- Huisman, J., G. A. Codd, H. W. Paerl, B. W. Ibelings, J. M. H. Verspagen, and P. M. Visser. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16:471-483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>.
- Lorenzen, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12:343-346. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>.
- Maciel, F. P., S. Haakonsson, S. Bonilla, L. Ponce de León, and F. Pedocchi. 2022. Remote sensing of chlorophyll-a for monitoring cyanobacteria in a highly turbid estuary, an implementation with Sentinel 2. *Geocarto International*. <https://doi.org/doi.org/10.1080/10106049.2022.2160017>.
- Mishra, S., and D. R. Mishra. 2014. A novel remote sensing algorithm to quantify phycocyanin in cyanobacterial algal blooms. *Environmental Research Letters* 9. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/11/114003>.
- Mitroi, V., K. C. Ahi, P. Y. Bulot, F. Tra, J. F. Deroubaix, M. K. Ahoutou, C. Quiblier, M. Koné, J. C. Kalpy, and J. F. Humbert. 2020. Can participatory approaches strengthen the monitoring of cyanobacterial blooms in developing countries? Results from a pilot study conducted in the Lagoon Aghien (Ivory Coast). *PLoS ONE*. 15:1-18 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238832>.
- Mohan, J., J. Saros, and J. R. Stone. 2021. On the matter of phytoplankton: A novel method using 3D computer models to calculate biovolume of microorganisms. *Limnology and Oceanography: Methods* 19:331-339. <https://doi.org/10.1002/lom3.10426>.
- Nabout, J. C., A. C. M. David, J. F. Felipe, K. B. Machado, L. Carvalho, and H. F. da Cunha. 2022. Can people detect the loss of water quality? A field experiment to evaluate the correlation between visual perception and water eutrophication degree. *Acta Limnologica Brasiliensia* 34. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2921>.
- Nusch, E. A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol* 14:14-36.
- O'Farrell, I. 2022. Floraciones de cianobacterias. Pp. 163-170 *en* A. Giorgi, E. Domínguez and N. Gómez (eds.). Técnicas de monitoreo para ecosistemas fluviales de la Argentina. REM_AQUA- CONICET, Buenos Aires.
- Pamula, A. S. P., H. Gholizadeh, M. J. Krzmarzick, W. E. Mausbach, and D. J. Lampert. 2023. A remote sensing tool for near real-time monitoring of harmful algal blooms and turbidity in reservoirs. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*. <https://doi.org/10.1111/1752-1688.13121>.
- Ramírez, A., and P. E. Gutiérrez-Fonseca. 2020. Freshwater research in Latin America: current research topics, challenges, and opportunities. *Revista de Biología Tropical* 68:1-10. <https://doi.org/10.15517/rbt.v68iS2.44328>.
- Reynolds, C. S. 1994. The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia* 289:9-21. <https://doi.org/10.1007/BF00007405>.

- Ritchie, R. J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research* 89:27-41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>.
- Saccà, A. 2017. Methods for the estimation of the biovolume of microorganisms: A critical review. *Limnology and Oceanography: Methods* 15:337-348. <https://doi.org/10.1002/lom3.10162>.
- Sitoki, L., R. Kurmayer, and E. Rott. 2012. Spatial variation of phytoplankton composition, biovolume, and resulting microcystin concentrations in the Nyanza Gulf (Lake Victoria, Kenya). *Hydrobiologia* 691:109-122. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1062-8>.
- Sournia, A. 1978. *Phytoplankton Manual*. Monographs on oceanographic methodology. UNESCO, Paris.
- Sun, J., and D. Liu. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25:1331-1346. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>.
- Svirčev, Z., D. Lalić, G. Bojadžija Savić, N. Tokodi, D. Drobac Backović, L. Chen, J. Meriluoto, and G. A. Codd. 2019. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Archives of Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>.
- Zabaleta, B., S. Haakonsson, M. Achkar, and L. Aubriot. 2023. High-frequency zones of phytoplankton blooms in the Río de la Plata Estuary associated with El Niño-Southern Oscillation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 286:108342. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2023.108342>.
- Zamyadi, A., F. Choo, G. Gayle Newcombe, S. Richard, and R. K. Henderson. 2016. A review of monitoring technologies for real-time management of cyanobacteria: recent advances and future direction. *Trends in Analytical Chemistry* 85(4):83-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.023>.
- Zohary, T., M. Shneor, and K. D. Hambright. 2016. PlanktoMetrix - a computerized system to support microscope counts and measurements of plankton. *Inland Waters* 6:131-135. <https://doi.org/10.5268/IW-6.2.965>.