



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE *MICROCYSTIS*
***AERUGINOSA* Y DE LA PRODUCCIÓN DE**
MICROCYSTINA EN CULTIVO DE LABORATORIO

Melina Celeste Crettaz Minaglia
(Leda Giannuzzi / Darío Andrinolo)

2018

Dedicada a mi mamá.

Contenidos

Resumen	5
Introducción.....	9
Generalidades de las cianobacterias y cianotoxinas	9
<i>Microcystis aeruginosa</i> y microcistinas	14
Factores de crecimiento de cianobacterias, en especial <i>M. aeruginosa</i> , y de producción de microcistinas	20
Temperatura	20
Nutrientes.....	21
Irradiación.....	23
Modelos matemáticos.....	26
Remoción de microcistinas en agua	32
Microorganismos con potencial para remover microcistinas.....	34
Planteo del problema	37
Hipótesis.....	38
Hipótesis principales	38
Objetivos.....	38
Objetivo general	38
Objetivos específicos.....	38
Materiales y métodos.....	40
Cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	40
Aclimatación del cultivo	41
Diseño experimental de la cinética de crecimiento y la producción de microcistina-LR.....	42
Determinaciones en el estudio cinético de los cultivos	43
Determinación de la densidad óptica	43
Recuento celular	44
Determinación de clorofila-a	44
Determinación de microcistina-LR.....	45
Modelado matemático de los datos experimentales	46
Estimación de los parámetros cinéticos de la curva de crecimiento de <i>M. aeruginosa</i>	46
Efecto de la temperatura sobre la tasa específica de crecimiento y la duración de la fase de latencia.....	49
Modelado de la producción de clorofila-a	52
Cálculo del cuota (Q_{clo-a})	53
Modelado de la producción de microcistina-LR.....	53
Cálculo del cuota (Q_{clo-a} y Q_{MC}).....	54
Modelo superficie-respuesta	54
Toma de muestras ambientales para aislamiento del ensamble de microorganismos heterótrofos con potencial remoción de MC-LR	55

Aclimatación y aislamiento de bacterias con potencial de remoción de microcistina-LR	56
Extracción de microcistina [D-Leu ¹]- LR	58
Ensayo de remoción de microcistina-LR	59
Identificación.....	60
Análisis estadístico	61
Resultados y discusión.....	61
Efecto de la temperatura de incubación sobre la cinética de crecimiento, la producción de clorofila-a y de microcistina-LR en un cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	61
Efecto de la temperatura de incubación en la cinética de crecimiento de <i>M. aeruginosa</i>	61
Efecto de la temperatura de crecimiento de <i>M. aeruginosa</i> sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la fase de latencia (LPD).....	65
Efectos de la temperatura en la producción de clorofila-a	69
Efectos de la temperatura sobre el valor de $Q_{\text{clo-a}}$	72
Efectos de la temperatura en la producción de microcistinas en el cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	72
Efectos de la temperatura sobre el parámetro Q_{MC}	76
Efectos de diferentes factores sobre el crecimiento de <i>M. aeruginosa</i>	78
Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre la cinética de crecimiento de <i>M. aeruginosa</i>	78
Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre la producción de clorofila-a.....	92
Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre los valores de $Q_{\text{clo-a}}$	101
Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre la producción de microcistina-LR.....	107
Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre Q_{MC}	117
Interacciones de la temperatura, la irradiación y la relación N:P sobre el crecimiento y la producción de clorofila-a y microcistinas.....	123
Correlación entre los factores y los parámetros de crecimiento, la producción de clorofila-a y microcistina-LR	130
Vinculación de la velocidad de crecimiento y la producción de microcistina-LR	130
Caracterización de la floración en el Río de La Plata.....	132
Aclimatación y aislamiento de bacterias con potencial de remoción de microcistina-LR	133
Remoción de microcistina-LR.....	135
Consortio de microorganismos del Río de La Plata	135
Microorganismos del Río de La Plata.....	137
Conclusiones.....	141
Financiamiento	142
Agradecimientos.....	142
Referencias	143
Anexos.....	169

Resumen

Las floraciones de cianobacterias pueden encontrarse en lagos, lagunas, ríos y arroyos de todo el mundo. Actualmente, es posible observar que su ocurrencia es cada vez más frecuente durante todo el año siendo una de sus causas la eutrofización. En Argentina, también se han registrado en casi todas las provincias, siendo *Microcystis aeruginosa* una de las más frecuentemente reportada. En este sentido, existe gran preocupación por el fenómeno de las floraciones de cianobacterias dado los múltiples efectos ambientales y sanitarios que ocasionan, siendo la producción de cianotoxinas uno de los aspectos más relevantes. Si bien existen diversos estudios sobre *M. aeruginosa* y la producción de microcistinas (MCs), no existen estudios que aborden integralmente y con herramientas matemáticas los efectos de la temperatura, irradiación y relación de nutrientes sobre el crecimiento y producción de MCs de una cepa autóctona de esta especie.

En este marco, el objetivo de la presente Tesis Doctoral fue estudiar la influencia de los factores temperatura, irradiación y relación de nutrientes (N:P) sobre el crecimiento, producción de clorofila-a (clo-a) y microcistina-LR (MC-LR) de *M. aeruginosa* cepa CAAT 2005-3, autóctona y de ambiente templado (Pila, Buenos Aires), en condiciones de laboratorio utilizando modelos matemáticos. Además, estudiar el potencial de remoción de MC-LR de los microorganismos autóctonos del Río de La Plata. Se realizó un diseño factorial combinando 3 niveles de temperatura (26, 30, 36°C), irradiación (30, 50, 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y relación N:P (10, 100, 150). Los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo por duplicado con un inoculo de $9\cdot 10^5$ - $1\cdot 10^6$ $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\text{D.O.}_{740\text{nm}} \approx 0,1$). En cada ensayo se determinó periódicamente el número de células, el contenido de clo-a y de MC-LR. Los datos obtenidos de recuento fueron modelados utilizando la ecuación de Gompertz y se calcularon los parámetros velocidad de crecimiento (μ), duración de la fase de latencia (LPD) y máxima densidad de población (MPD). Se utilizó un modelo secundario tipo Arrhenius para evaluar los efectos de la temperatura en μ y LPD y el modelo de Ratwosky para determinar las temperaturas óptima, máxima y mínima de crecimiento. La producción de clo-a se modeló utilizando un modelo lineal, se calculó el tiempo de duplicación medio (t_m) y el cuota ($Q_{\text{clo-a}}$) de clo-a por célula. La producción de MC-LR se modeló utilizando un modelo dinámico que incluye al modelo de Gompertz, se calculó el cuota (Q_{MC}) de MC-LR por célula y clo-a. Para evaluar el efecto de todos los factores sobre los parámetros se utilizó un modelo de superficie de respuesta y

correlación lineal (r). Finalmente, para conocer el grado de vinculación entre el crecimiento y producción de MC-LR se utilizó un modelo lineal.

Los modelos propuestos y utilizados para modelar los datos se ajustaron a los datos experimentales con buenos coeficientes de determinación. Se observó que la temperatura y la irradiación producen incrementos en los valores de μ ($0,20-0,38 \text{ d}^{-1}$ a 26° y $0,22-0,36 \text{ d}^{-1}$ a 30°), sin embargo, a máxima temperatura, la intensidad de irradiación no tiene efectos significativos ($p < 0,05$) sobre los valores de μ ($0,17-0,31 \text{ d}^{-1}$ a 36°C). De modo similar, la temperatura y la irradiación también afectaron los valores de MPD observándose los valores máximos ($7,19-7,44 \text{ cél.mL}^{-1}$ a 26°C ; $6,58-6,72 \text{ cél.mL}^{-1}$ a 30°C y $6,33-6,50 \text{ cél.mL}^{-1}$ a 36°C) a irradiación $50 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Los valores de LPD se encontraron afectados por la temperatura y la relación N:P observándose menores valores en condiciones de exceso de nitrógeno y aumento de la temperatura. Los valores de energías de activación de μ fueron mayores en el dominio de temperaturas más bajas ($83,08 \pm 0,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$) y menores en el dominio de temperaturas más altas ($13,30 \pm 0,81 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Por el contrario, los valores de energías de activación de LPD fueron menores a temperaturas más bajas ($50,32 \pm 0,19 \text{ kJ.mol}^{-1}$) y mayores a temperaturas más altas ($149,91 \pm 1,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$). El modelo modificado de Ratkowsky permitió calcular las temperaturas cardinales ($T_{\text{min}} = 8,58 \pm 2,34$, $T_{\text{max}} = 45,04 \pm 1,35$ and $T_{\text{óptima}} = 33,39 \pm 0,55$) para esta cepa. Respecto a la producción de clo-a, los valores de $td_{\text{clo-a}}$ fueron menores a baja irradiación y temperatura ($2,90-3,41 \text{ d}$ a 26°C y $2,90-3,87 \text{ d}$ a 30°C , a $30 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A 36°C , los valores de $td_{\text{clo-a}}$ fueron menores a alta irradiación ($2,73-4,75 \text{ d}$ a $70 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) aunque se obtuvieron las menores producciones de clo-a (en $\mu\text{g.L}^{-1}$) posiblemente debido a la fotoinhibición. Las energías de activación del parámetro clo-a fueron mayores a mayores intensidades de irradiación. Por otro lado, la producción de MC-LR se incrementó al disminuir la temperatura, a una relación N:P 10 y a baja intensidad de irradiación ($30 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A partir de los parámetros obtenidos de los modelos utilizados, se aplicó un modelo secundario de superficie respuesta y se observó que a 30 y $50 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ los valores de μ máximos ocurrieron a 30°C independientemente de la relación N:P y, de modo contrario, los valores de máximos de p ocurren a $< 30^\circ\text{C}$ reduciéndose hacia 36°C . A $70 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, si bien es similar la relación de μ y p son similares, se observa que en este último parámetro hay un efecto de la relación de nutrientes reduciéndose hacia la N:P 100. Sin embargo, el modelo lineal mostró que la producción de MC-LR por célula se

incrementa al incrementarse μ . Estas observaciones permiten no rechazar la hipótesis que afirma que la producción de microcistina es un proceso acoplado a la velocidad de crecimiento de *M. aeruginosa*.

En todas las irradiaciones, la LPD aumentó de N:P 150 hacia N:P 10 y de 36 a 26°C y la MPD disminuyó hacia las temperaturas más elevadas, de modo independiente a la relación N:P. En los valores de k_0 de clo-a a 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, disminuyeron hacia las temperaturas más elevadas de modo independiente a la relación N:P, a diferencia de la irradiación 50 y 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, en donde se observan efectos de la relación N:P, incrementándose hacia las temperaturas y relación N:P más bajas. El d_M disminuyó al incrementarse la temperatura sin efectos de la relación N:P a 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y al incrementarse la relación N:P y la temperatura a 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y presentó los menores valores a 30°C y relación N:P 10 a 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La irradiación presentó un $r=0,70$ con μ ; la temperatura, $r=-0,90$ con la MPD y la relación N:P, $r=0,60$ con LPD. En el caso de los parámetros de producción de clo-a, k_0 y de MC-LR, p y d_M , y , presentaron $r < 0,2$ con los factores estudiados. Esto permite rechazar la hipótesis que afirma que los parámetros de la curva de crecimiento de *M. aeruginosa*, de la producción de clo-a y MCs correlacionan positivamente con los factores temperatura, relación N:P e irradiación.

Por otra parte, en 2014, se aisló un consorcio de microorganismos del Río de La Plata con capacidad para remover MC-LR en ensayos de laboratorio, alcanzando una reducción del 99,4% con una concentración inicial de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en 7 días con un tiempo de remoción medio de $0,948\pm 0,05$ d. De allí, se aisló la bacteria RLP-10 con capacidad de remover el 79,5% de MC-LR con un tiempo de remoción medio de $3,06\pm 0,07$ d. Esta bacteria fue purificada, se aisló su ADN y se secuenció. Esta secuencia fue comparada y la cepa mostró un 99% de similitud con varias cepas de *Achromobacter xylosoxidans*. La bacteria RLP10 fue designada como cepa LG1 y depositada en *GenBank* bajo el número MF959519. Esto permiten no rechazar la hipótesis planteada de que las bacterias provenientes de florecimientos cianobacterianos remueven MC-LR en condiciones de laboratorio.

Este es el primer trabajo en donde, además de modelar la curva completa de crecimiento de *M. aeruginosa* de una cepa nativa argentina de ambiente templado, se modeló la producción de sus metabolitos (clo-a y MC-LR) evaluando los efectos de los principales factores que determinan la

formación de floraciones cianobacterianas de esta especie en el ambiente natural. Si bien el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral fue en condiciones de laboratorio, este es el primer acercamiento global al comportamiento de una cepa nativa frente al conjunto de factores ambientales (temperatura, irradiación y relación N:P). Asimismo, debido a la generación de gran cantidad de datos dentro del diseño experimental propuesto, se pudieron utilizar diversas herramientas matemáticas como los modelos primarios y secundarios que, finalmente, permiten el desarrollo de un *Software* como herramienta de alerta temprana que puede ser utilizada en la toma de decisiones frente a la problemática ambiental de las floraciones cianobacterianas.

También, se logró aislar un consorcio de microorganismos autóctonos del Río de La Plata y la bacteria *A. xylooxidans* cepa LG1 con capacidad de bioremove MC-LR. Este es el primer reporte de microorganismos aislados del Río de La Plata así como el primer reporte de la capacidad de *A. xylooxidans* para remover MC-LR. Esto representa un avance importante en métodos biológicos de tratamiento de aguas contaminadas con la toxina, por ello, es fundamental continuar y profundizar los estudios sobre la utilización de microorganismos.

Introducción

Generalidades de las cianobacterias y cianotoxinas

Las Cyanobacteria, Cyanophyta o Cyanoprokaryota son bacterias Gram negativas, que realizan fotosíntesis oxigénica (Quesada y col., 2006) y respiran en el mismo sistema de membranas (Vermaas, 2001). Contienen clorofila-a (clo-a), el pigmento universal de organismos fotosintéticos que exhibe picos de absorción en el azul (~430 nm) y en el rojo (~665 nm) (Plastino y Mansilla, 2004) (**Figura 1**). Además, poseen ficobiliproteínas que son proteínas que presentan cromóforos (ficobilinas): allofococianinas (absorbancia máxima, $A_{max} = 650$ nm), ficocianina ($A_{max} = 620$ nm) –azul- y ficoeritrina ($A_{max} = 565$ nm)- rojo (Plastino y Mansilla, 2004) (**Figura 1**). Se encuentran en ficobilisomas, en la superficie de los tilacoides. Son pigmentos accesorios a la clo-a con capacidad de absorber energía, pero también funcionan como reservas de nitrógeno. La proporción de estos pigmentos puede verse alterada y así aumentar la absorción de la luz en el espectro visible. Las ficobiliproteínas solo se encuentran en las cianobacterias y dos grupos de algas eucariotas (criptofitas y rodofitas) y un grupo de dinoflagelados (Falkowski y col., 2004). Por otra parte, los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides; se dividen en carotenos (sin oxígeno) y xantófilas (con oxígeno) y son liposolubles. Absorben longitudes de onda corta, en la región 400 a 560 nm exhibiendo colores amarillo, anaranjado y rojo (Plastino y Mansilla, 2004) (**Figura 1**). Tanto las cianobacterias como las algas eucariotas poseen carotenoides en común pero también hay otros que son exclusivos de las cianobacterias (carotenoides glicosídicos) (Francis y col., 1970) y cumplen, principalmente, una función de protección para las altas intensidades lumínicas, actuando como antioxidantes al desviar el flujo de electrones en exceso evitando que dañen los fotosistemas (Edge y col., 1997). Otros pueden cumplir funciones protectoras a bajas temperaturas (Várkonyi y col., 2002) o actuar como pigmentos accesorios de la clo-a (Hirschberg y Chamovitz, 1994).

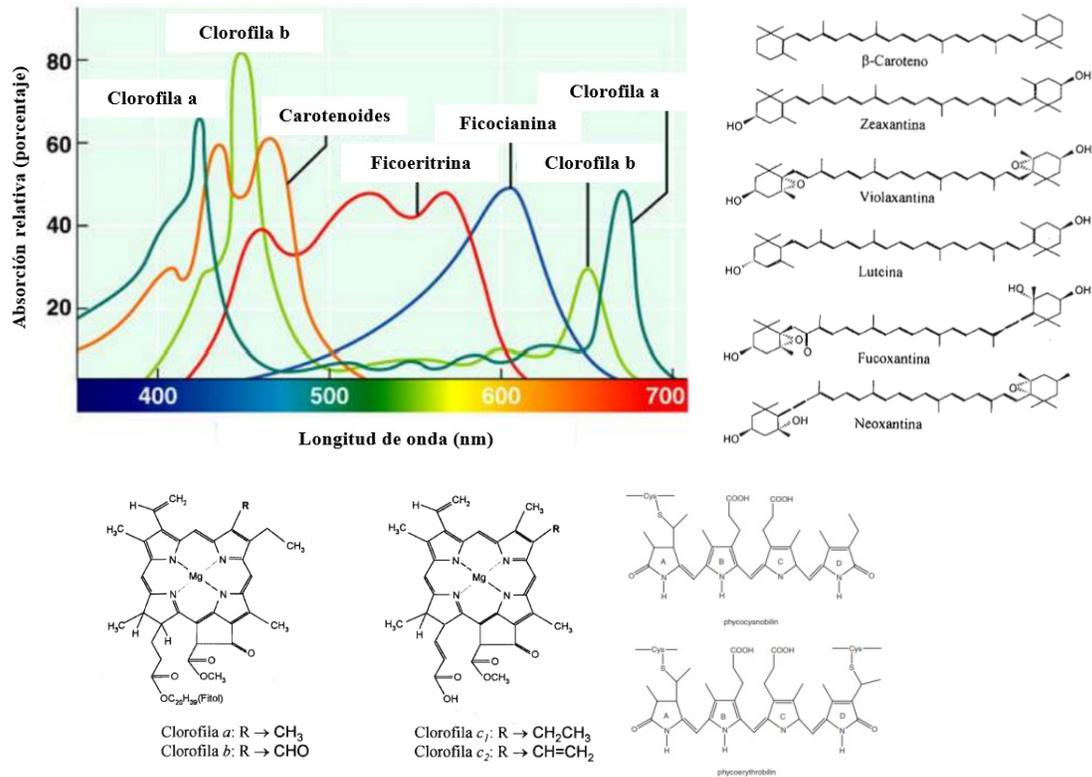


Figura 1. Espectros de absorción de los pigmentos de las cianobacterias y estructuras moleculares de los pigmentos. Modificado de Blankenship (2014).

Estructuralmente, como se observa en la **Figura 2**, las cianobacterias poseen una membrana citoplasmática que separa el citoplasma del periplasma, este sistema de membranas está implicado en la respiración, pero no en la fotosíntesis y tiene carotenoides. Las membranas tilacoides contienen clorofila a y tienen la función de catalizar el transporte de fotosíntesis y el transporte de electrones respiratorios. Los tilacoides tienen forma de vaso y se encuentran en pares; un par de membranas envuelve al siguiente par, como un conjunto de muñecas rusas. El espacio entre un par de membranas tilacoides es el lumen tilacoide, en el que los protones se depositan en el transporte fotosintético y respiratorio del electrón. El gradiente de protones resultante a través de las membranas se utiliza para la síntesis de ATP.

En el citoplasma, además de los pigmentos en los tilacoides, se encuentran sustancias de reserva como gránulos de poliglucano, polímeros de glucosa similares al glicógeno y gránulos de cianoficina, polímeros de ácido aspártico y arginina que funcionan como reserva de nitrógeno (Bold y Wynne, 1985; Graham y Wilcox, 2000).

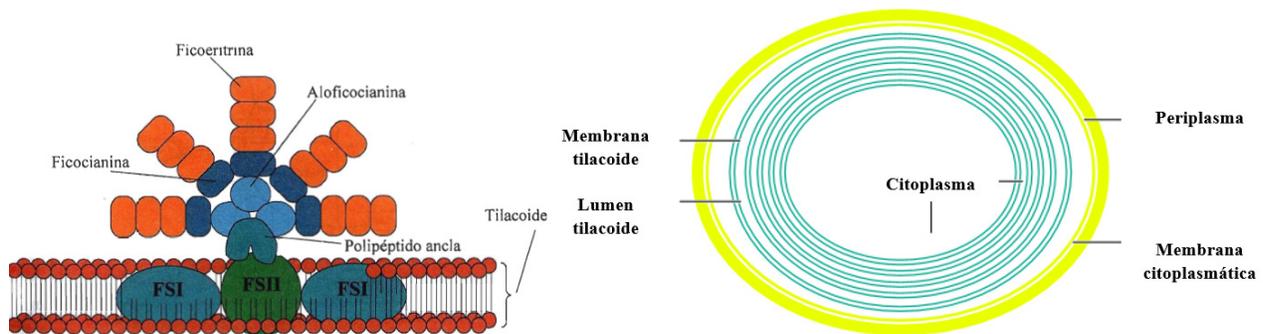


Figura 2. Esquema de membranas y compartimientos en una célula de cianobacterias; corte transversal y pigmentos fotosintéticos. Tomado de Vermaas (2001).

Las cianobacterias poseen flexibilidad fisiológica y morfológica que permite el establecimiento de sus poblaciones (Aubriot y col., 2009) y les ofrece ventajas frente a otras poblaciones del fitoplancton. En condiciones de poca irradiación (alrededor de $30 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pueden mantener una tasa de crecimiento relativamente mayor que el resto de organismos fitoplanctónicos (Chorus y Bartram, 1999). Además, pueden regular su flotabilidad mediante vesículas de gas y así colocarse en la columna de agua a aquellas profundidades donde la disponibilidad de nutrientes y luz es la adecuada (Walsby y Hayes, 1989). Asimismo, presentan bajos requerimientos (en general, por debajo de los límites de cuantificación de los métodos espectrofotométricos, $0,006 \text{ mg.L}^{-1}$) de nitrógeno y poseen gránulos de reserva de fosfatos en su citoplasma (Vela y col., 2007).

La mayoría de las células se presentan en forma libre y habitan principalmente ambientes acuáticos de agua dulce y salada, aunque algunas también habitan el ecosistema terrestre (Aguilera y Echenique, 2017). En el ambiente acuático pueden colonizar tanto la zona planctónica como bentónica. Generalmente son unicelulares aunque pueden encontrarse formas coloniales cubiertas por una capa mucilaginosa o formando filamentos (Canter-Lund y Lund, 1995; Quesada y col., 2006) y su tamaño puede variar entre $0,5$ y $40 \mu\text{m}$.

A nivel taxonómico, se incluyen 3 órdenes que albergan la gran diversidad morfológica y fisiológica:

- Chroococcales: formas unicelulares y coloniales envueltas en una capa mucilaginosa; su reproducción es por fisión binaria o múltiple, beocitos o exosporas; la división celular es en uno, dos, tres o más planos (Vidal y Pérez, 2009). Ejemplos: *Microcystis aeruginosa*, *Aphanocapsa delicatissima*, *Merismopedia tenuissima*.
- Oscillatoriales: filamentosas sin células diferenciadas, filamentos uniseriados y sin ramificaciones; división celular en un plano perpendicular al eje del tricoma; y con o sin necridios (Vidal y Pérez, 2009). Ejemplos: *Planktothrix agardii*, *Pseudoanabaena mucicola*, *Cylindrospermopsis raciborskii*.
- Nostocales: filamentosas con células diferenciadas, uniseriado o multiseriado. Estas células diferenciadas incluyen los heterocistos que permiten la fijación de nitrógeno atmosférico y los acinetes que son células de resistencia, de mayor tamaño que las vegetativas, que se forman cuando las condiciones ambientales no son favorables (Arocena y Conde, 1999). Tienen división celular en un plano perpendicular al eje del tricoma, reproducción por hormogonios o hormocitos y tricomas isopolares o heteropolares, sin o con ramificaciones falsas o verdaderas (Vidal y Pérez, 2009). Ejemplos: *Dolichospermum planctonicum*, *D. spiroides*, *Nodularia spumigena*.

A nivel ecológico, las cianobacterias son productores primarios de los sistemas acuáticos, a través de la fotosíntesis, siendo muchas veces la comunidad principal en todo el ecosistema para esta función (Bonilla y Aubriot, 2009), es decir, que el carbono orgánico y la energía producida durante la fotosíntesis son transferidos a otros organismos a través de las redes alimentarias.

Las cianobacterias son organismos muy importantes porque se cree que han sido responsables de la atmósfera oxidante hacia el Precámbrico temprano hace 3000-3500 millones de años (Graham y Wilcox, 2000; Papineau y col, 2005). Esto es debido a la combinación poco frecuente de vías metabólicas que puede ser responsable de la resistencia evolutiva de las cianobacterias y su capacidad para prosperar bajo una amplia gama de condiciones (Vermaas, 2001).

Muchas cianobacterias son formadoras de floraciones en cuerpos de agua. En Argentina, se han detectado floraciones de cianobacterias en casi todas las provincias (**Figura 3**) siendo *Microcystis* y *Dolichospermum* los géneros dominantes en un 60% seguido por *Planktothrix/Oscillatoria* (14%),

Chroococcus y *Pseudoanabaena* (8%), *Aphanizomenon* (7%) y *Cylindrospermopsis* (4%) (Ministerio de Salud, 2016).

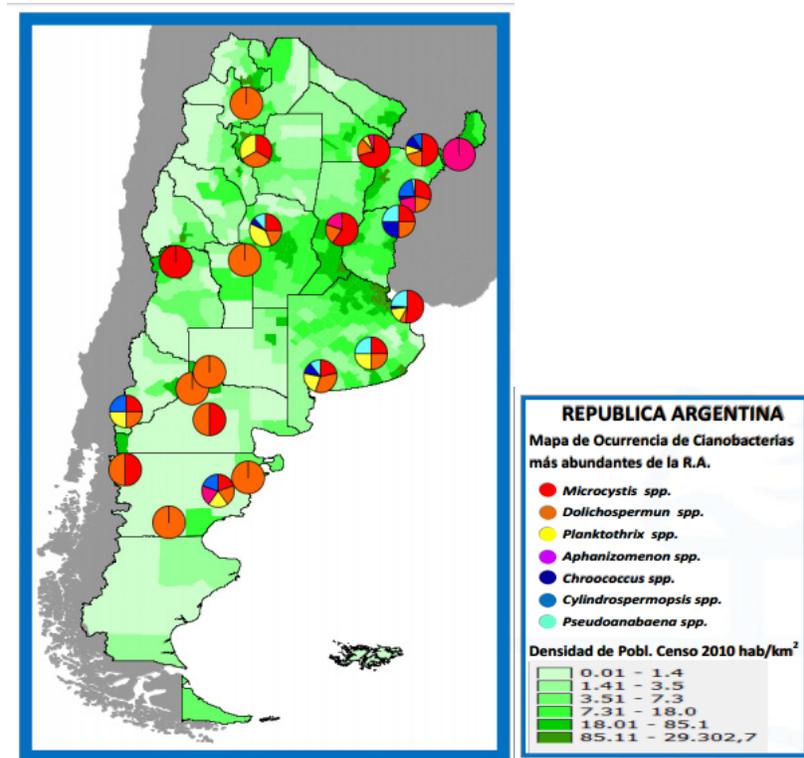


Figura 3. Distribución geográfica de la ocurrencia de cianobacterias en Argentina. Sitio web Ministerio de Salud, Dirección de Determinantes de Salud (2016)

Mientras algunas especies generan perjuicios ambientales y sanitarios, otras ofrecen múltiples usos industriales y farmacéuticos que incluyen compuestos con propiedades antimicrobianas y antibacterianas, suplementos dietarios, biofertilizantes, biocombustibles (Aguilera y Echenique, 2011).

Otro aspecto importante es que las cianobacterias pueden generar una serie de compuestos denominados cianotoxinas. Estas son metabolitos secundarios bioactivos de una composición química variable (Solter y Beasley, 2013) de las que se desconoce su función biológica. Son producidas por diversos organismos que habitan los sistemas de agua dulce y salada. Vela y col., (2007) las clasifican según sus efectos en:

- Dermatotoxinas: se destacan lyngbyatoxina A y aplysiatoxina producidas por cianobacterias marinas como *Lyngbya* y *Oscillatoria*.
- Neurotoxinas: ejercen su efecto sobre el sistema neuromuscular y se pueden mencionar la anatoxina-a y anatoxina-a(s) producidas por *Anabaena*, *Microcystis* y *Oscillatoria*. También se destaca la saxitoxina que es producida principalmente por dinoflagelados marinos, pero se ha visto que la producen cianobacterias como *Aphanizomenon flosaquae*, *Anabaena circinalis* y *Planktothrix*.
- Hepatotoxinas: hay tres familias principales de cianotoxinas que afectan al hígado:
 - a) Microcistina: es la más conocida y es producida por varios géneros de cianobacterias como *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* y *Oscillatoria*.
 - b) Nodularina: producida por la especie *Nodularia spumigena* especialmente en aguas saladas.
 - c) Cilindropermopsina: es producida principalmente por *Cylindropermopsis raciborskii* y *Aphanizomenon ovalisporum*.

Las primeras intoxicaciones de poblaciones humanas por consumo de agua contaminada con cepas tóxicas de cianobacterias fueron descritas en Australia, Inglaterra, China y África del Sur (OMS, 2003). Además de sus efectos directos, es sabido que las cianotoxinas pueden bioacumularse y biomagnificarse a través de las redes alimentarias (Watanabe y col., 1992; Laurén-Määttä y col., 1997; Kotak y col., 1996; Thstrup y col., 1999; Ibelings y col., 2005). En este sentido, además del reconocido riesgo de contaminación humana a través del agua, existe un riesgo en relación al consumo de alimentos.

Además de las cianotoxinas, las cianobacterias pueden producir geosmina (trans-1, 10-dimetiltrans-9-decalol) y MIB (2-metilisoborneol) que son compuestos que causan olor y sabor al agua potable, si bien no son tóxicos (Freitas y col., 2008).

Microcystis aeruginosa y microcistinas

El género *Microcystis* es el más frecuente formador de floraciones cianobacterianas (Reynolds y Walsby, 1975), se destacan especialmente las especies *M. aeruginosa* y *viridis*, y pueden producir hepatotoxinas y dermatotoxinas (ver los apartados **Generalidades de cianobacterias y cianotoxinas**). La especie *M. aeruginosa* (**Figura 4**) es una cianobacteria del orden Chroococcal que forma colonias irregulares que

pueden medir 352 μm en promedio de largo (min: 55,0; máx: 650) y 402 μm de ancho (min: 55,0; máx: 725) (Vidal y col. 2009). Las células son esféricas a hemiesféricas, de tamaños promedio de 4,9 μm (min: 3,0; máx: 7,0), luego de la división celular (Vidal y col., 2009). La reproducción es por fisión binaria en tres planos perpendiculares (Aguilera y Echenique, 2011). Posee en su citoplasma vesículas de gas (o aerótopos) que le permiten regular la flotabilidad (Vela y col., 2007). La capa de material extracelular que rodea a las células (mucílago o vaina mucilaginoso) está compuesta principalmente de polisacáridos (Amemiya y Nakamura, 1986; Amemiya y col., 1990) que contienen glucosa, manosa, fructosa, xilosa, galactosa y ramnosa.

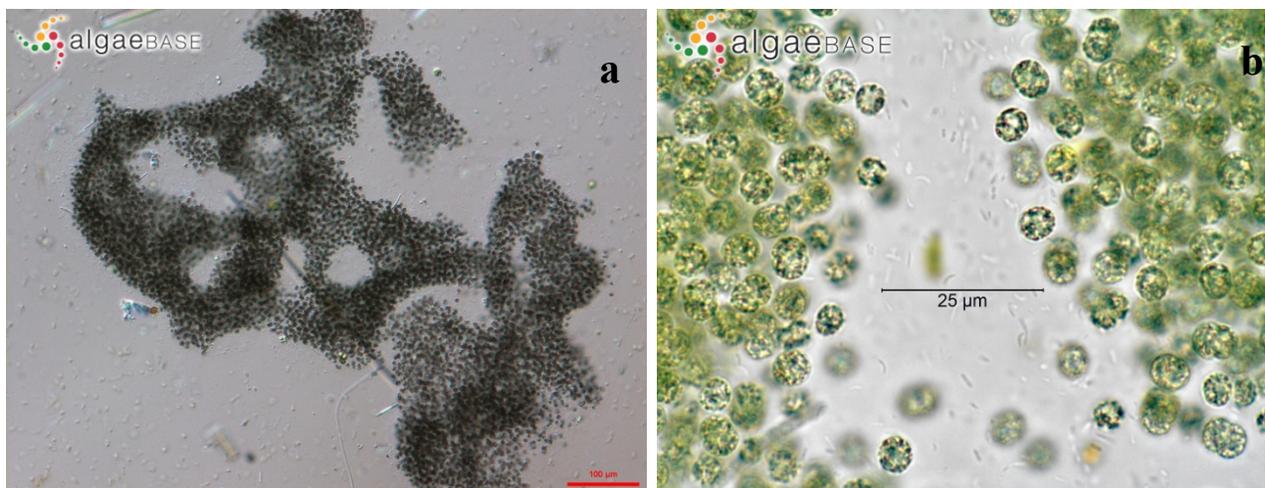


Figura 4. Colonias de *Microcystis aeruginosa*. a) Bremerton, Washington, EE. UU.; Lago Kitsap, 100x, DIC. 12 de octubre de 2008. Karl Bruun. © Karl Bruun. b) Células individuales, imagen BF. Stanwick Lakes Northamptonshire, Reino Unido. 03 de agosto de 2006. © CFCarter.

Microcystis aeruginosa forma floraciones de tipo acumulativas superficiales, visibles a simple vista. Se han reportado florecimientos durante todo el año y en particular en verano. *M. aeruginosa* posee muy pocos depredadores que ingieren sólo colonias pequeñas (Vidal y col., 2009). La distribución y abundancia de *M. aeruginosa* son, en gran medida, afectadas por factores como temperatura, irradiación y disponibilidad de nutrientes actuando sinérgicamente con otros factores físicos y químicos (Cao y col., 2006; Joehnk y col., 2008; Yang y col., 2012). Según las ecoestrategias de Reynolds y col. (2002),

Microcystis se encuentra dentro del grupo S. Este grupo se caracteriza por poder vivir bajo condiciones de severa caída del abastecimiento externo de nutrientes (toleran el estrés), presentar baja relación superficie/volumen, baja actividad metabólica y sensibilidad a las limitaciones de la temperatura más que a las de la irradiación. Si bien en ambientes naturales suelen crecer rápidamente, en condiciones de laboratorio lo hacen más lentamente e, incluso, muchas cianobacterias no pueden ser cultivadas (Gerloff y col., 1950). Al respecto, en Canabaeus (1929) se encuentra el primer reporte de cultivo exitoso de *M. aeruginosa*.

Diversos estudios han resaltado la importancia de los ensambles de bacterias y sus interacciones con *M. aeruginosa* en la dinámica de las floraciones (Xing y col., 2007; Limei y col., 2009; Shen y col., 2011; Dziallas y Grossart, 2011a y b, 2012; Geng y col., 2013; Wang y col., 2015). Debido a que los mucilagos varían entre especies de *Microcystis* (Amemiya y col., 1988; Komárek, 1991) existe una alta especificidad cepa-ensamble (Limei y col., 2009). *Microcystis* sp contiene numerosas bacterias en su mucílago (Hoppe, 1981), principalmente del grupo Sphingomonadales (Limei y col., 2009), y muchas de estas se pierden, así como los compuestos que producen (Wang y col., 2015). Tanto las bacterias como los compuestos que producen se encuentran involucrados en la conformación de las colonias típicas halladas en la naturaleza y que se pierden irreversiblemente en laboratorio (Geng y col., 2013), como los miembros de Archae (Dziallas y Grossart, 2011^a). Además, las cianotoxinas podrían tener un papel importante en la formación de los agregados celulares.

Las microcistinas (MCs) (**Figura 5**) son un grupo de heptapéptidos cíclicos tóxicos de bajo peso molecular (Moreno y col., 2003) y tienen en común un α -aminoácido denominado ADDA (3 - amino - 9 - metoxi - 10 - fenil - 2,6,8 - trimetil - deca - 4,6 - ácido dienoico) de carácter hidrofóbico, responsable en gran medida de las características tóxicas de la molécula (Andrinolo y Sedan, 2017). Son producidas por varios géneros de cianobacterias de agua dulce siendo la principal productora *Microcystis* (Codd y col., 1997). Se localizan en un 90% en el interior de las cianobacterias que las producen (Vela y col., 2007). Young y col. (2005) en un estudio de inmunolocalización con partículas de oro en células de *Microcystis*

detectaron que las MCs estaban asociadas a los tilacoides (69%), nucleoplasma (19%) y a la periferia de los gránulos de polifosfato (3%).

De las 100 variantes de MCs, difieren en las posiciones de los aminoácidos X e Y, la MC-LR (aminoácidos leucina (X) y arginina (Y)) es la más comúnmente hallada (Merel y col., 2013; Niedermeyer, 2013) las cianobacterias usualmente producen una mezcla de diferentes MCs (Cousins y col., 1996). Además, existen isoformas generadas por metilación, hidroxilación y epimerización (Neilan y col., 1999). Son estables bajo diversas condiciones físicas, químicas y biológicas tales como temperatura, luz solar y enzimas (Tsuji y col., 1994; Jones y Orr, 1994; Harada, 1996 y Okano y col., 2009).

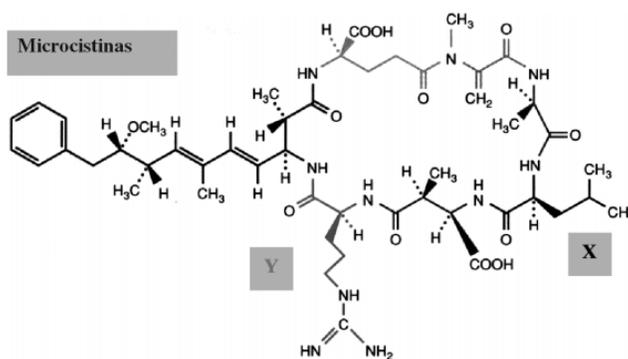


Figura 5. Molécula de microcistina (Moreno y col., 2003).

Las MCs son cianotoxinas potentes para mamíferos conocidas por ser responsables de efectos agudos y crónicos que pueden causar hemorragias hepáticas a las pocas horas de exposición y tienen actividad promotora de tumores por inhibición de la proteína fosfatasa (PP1 y PPA2) observada en roedores, así como en hepatocitos primarios *in vitro*. Diferentes estudios permitieron observar que la microcistina-LR inhibe 40 veces más a la PP2A que a la PP1 (Honkanen y col., 1990). La hiperfosforilación de la proteína intracelular resultante conduce a la alteración de los filamentos intermedios que forman el citoesqueleto en hepatocitos humanos y roedores (Carmichael, 1992). Si bien su principal órgano diana es el hígado, pueden tener efectos sobre otros órganos como riñón, pulmón e intestino (Andrinolo y Sedan, 2011). En plantas, también se han observado efectos tóxicos por inhibición de la proteína fosfatasa (MacKintosh y col., 1990).

La primera confirmación de muerte por cianotoxinas en humanos fue en 1996; alrededor de 100 pacientes desarrollaron insuficiencia hepática aguda, y más de 50 murieron en Caruaru, Pernambuco (Brasil) por el uso de agua para hemodiálisis contaminada con cianotoxinas (Jochimsen y col., 1998; Pouria y col., 1998). Los análisis biológicos y químicos confirmaron la presencia de MCs y cylindrospermopsina en los filtros de carbón activado usados en el sistema de purificación del agua de la clínica. Las MCs fueron también halladas en muestras de sangre y tejido hepático de los pacientes afectados (Jochimsen y col., 1998; Carmichael y col., 2001; Azevedo y col., 2002). Como consecuencia de esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado la MC-LR, una de las cianotoxinas más frecuentes y propone como valor guía $1\mu\text{g.L}^{-1}$ como la máxima concentración permitida para agua potable (OMS, 2003). La Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA por sus siglas inglés, *Environmental Protection Agency*) encomienda niveles de consumo de agua potable de 10 días de $0,3\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs en agua potable para niños de edad preescolar y menores de seis años. Para los niños en edad escolar hasta adultos, los niveles recomendados para el agua potable son inferiores o iguales a $1,6\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs. Los niños pequeños son más susceptibles que los niños mayores y adultos, ya que consumen más agua en relación con su peso corporal.

Por su parte, la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) clasifica a la MC-LR como posible carcinógeno para humanos (grupo 2B), lo que indica que existe evidencia limitada de una asociación con el cáncer en seres humanos, pero pruebas insuficientes asociadas con el cáncer en animales de experimentación (IARC, 2006). En este sentido, Tian y col. (2013) reportaron datos que sugieren que las MCs pueden ser responsables de una alta incidencia de cáncer de hígado en poblaciones que dependen del agua contaminada con MCs como en China (Ueno y col., 1996), Florida (EE.UU.) (Fleming y col., 2002) y Serbia (Svircev y col., 2009), así como también cáncer colorectal en China (Zhou y col., 2002). Además, del riesgo por consumo de agua contaminada, se conoce que las MCs pueden bioacumularse y biomagnificarse en las redes tróficas. Se han realizado numerosos estudios en peces (Magalhães y col., 2001; Magalhães y col., 2003; Cazenave y col., 2006; Chen y col., 2006; Chen y col., 2007; Chen y col., 2009; Deblois y col., 2008; Amé y col., 2010) detectándose la presencia de MCs en músculo. Además, en bivalvos, crustáceos y gasterópodos también se han hallado

MCs (Magalhães y col., 2003; Soares y col., 2004; Ibelings y col., 2005; Chen y col., 2005; Deblois y col., 2008) siendo mayor el riesgo potencial que en los peces debido a que el factor de bioacumulación es mayor.

Uno de los aspectos de interés de las MCs es conocer su función. Existen diversas hipótesis al respecto, aunque ninguna de ellas ha permitido alcanzar una conclusión clara. Se ha propuesto que permiten la protección ante los depredadores o ante los organismos competidores (Pflugmacher, 2002; Jang y col., 2003; Jang y col., 2007); por otro lado, a nivel estructural ofrecerían ventajas para la captación de luz o moléculas nutritivas (quelación) (Vela y col., 2007). También se propone que las condiciones ambientales de estrés pueden estimular su producción (Ross y col., 2006) y otros autores proponen que las MCs son metabolitos secundarios sin función específica conocida (Babica y col., 2006). Por otro lado, es sabido que los ensambles de bacterias influyen el crecimiento y metabolismos de las cianobacterias incluyendo la producción de MCs siendo específicos de cada cepa. Las hipótesis más recientes mencionan que, por un lado, las MCs podrían ser moléculas de comunicación (*quórum sensing*) (Vela y col., 2007) y, por otro, una molécula que elimina especies reactivas del oxígeno (ROS *scavengers*) (Dziallas y Grossart, 2011b). Aún está en discusión si las MCs son metabolitos primarios que participan en los procesos metabólicos esenciales aún desconocidos dentro de la célula, o metabolitos secundarios, producidas constitutivamente o reguladas (inducidas) por condiciones ambientales específicas (Lick, 2004). Como resultado de los efectos tóxicos de las MCs en eucariotas, han sido ampliamente vistas como un metabolito secundario que influye en la interacción ecológica entre las cianobacterias y su entorno. Orr y Jones (1998) fueron los primeros en postular a las MCs como metabolitos primarios. Sin embargo, autores como Long y col. (2001) sugieren que existe una relación aún más compleja al establecer la relación entre la velocidad de crecimiento y la de producción de MCs, principalmente, si estos son procesos acoplados.

El crecimiento de *M. aeruginosa* y la producción de MCs resultan dependientes de diversas condiciones y recursos que intervienen en el proceso de eutrofización entre los que se destacan nutrientes, las altas temperatura y la irradiación, los cuales se describirán a continuación.

Factores de crecimiento de cianobacterias, en especial *M. aeruginosa*, y de producción de microcistinas

Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las cianobacterias. Las altas temperaturas del agua (25-30°C) combinadas con altas concentraciones de nutrientes, aumentan la proliferación de floraciones de *Microcystis* (Robarts y Zohary, 1984; Joehnk y col., 2008; Paerl y Huisman, 2008). Precisamente, favorecen el desarrollo de floraciones en regiones templadas (Robarts y Zohary, 1987, 1992; Joehnk y col., 2008; Wu y col., 2014) y tropicales (Mowe y col., 2015) Por ello, los escenarios de cambio climático podrían provocar aumentos de temperatura incrementando la frecuencia e intensidad de las floraciones cianobacterianas y, por lo tanto, los riesgos asociados (Paerl y Huisman, 2009). Mowe y col. (2015) advierten sobre los efectos indirectos de los aumentos de la temperatura (1,4 - 6°C) debido al cambio climático en zonas tropicales.

Parte de la importancia ecológica de la temperatura es consecuencia de la dependencia general de las reacciones químicas ya que es reguladora esencial de algunas actividades celulares (Angelier, 2002). Las manifestaciones de la actividad celular son posibles entre dos límites: la temperatura umbral mínima y la temperatura umbral máxima (**Figura 6**). Entre estas dos, la curva de actividad es una campana cuyo pico corresponde a la temperatura de máxima velocidad de crecimiento (Angelier, 2002). Las temperaturas mínimas y máximas de actividad pueden variar en función de la temperatura de aclimatación en especies euritermas (Angelier, 2002), es decir, especies que pueden desarrollarse en un amplio rango de temperaturas. Esto es propio de especies ubicuas tal como *M. aeruginosa*. Sin embargo, no existe en la bibliografía información sobre las temperaturas mínimas y máximas para *M. aeruginosa* en medio de cultivo, por ello, este tema es claramente un desafío en el marco del estudio de la caracterización de cepas autóctonas de nuestra región.

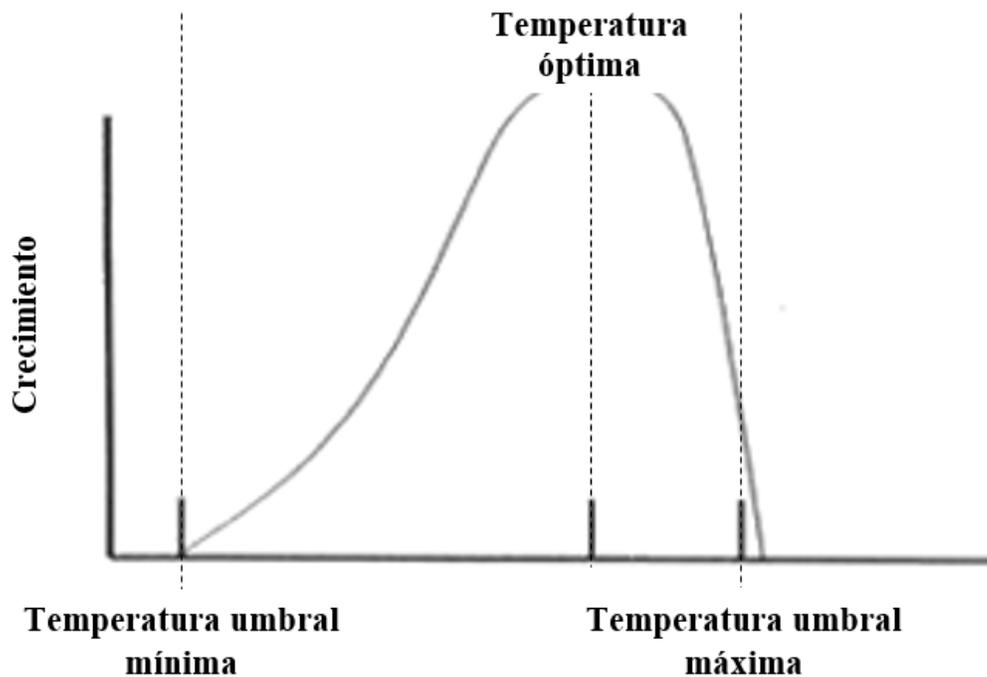


Figura 6. Curva de crecimiento en función de la temperatura. Se observan las temperaturas umbrales dónde el crecimiento es mínimo y la óptima en dónde ocurre el máximo crecimiento.

Nutrientes

Los nutrientes son fundamentales para el crecimiento, síntesis de macromoléculas y de metabolitos de las cianobacterias en general. El fósforo es uno de los principales nutrientes y, con frecuencia, es limitante por lo que determina la producción primaria en un cuerpo de agua (Valiei, 1995). El fósforo juega un papel crucial en la determinación de la productividad potencial de un florecimiento cianobacteriano (Wang y col., 2010a). Debido a esto, frecuentemente se asocia la eutrofización al enriquecimiento de fósforo de los cursos de agua. Su ciclo biogeoquímico está asociado a los sedimentos de lagos, ríos y arroyos. La formación de floraciones de *Microcystis* está sujeta a la deficiencia de fósforo, existiendo una regulación hacia abajo (*down-regulation*) de su crecimiento y su aparato fotosintético (Wang y col., 2010^a). La deficiencia de fósforo restringe la fotofosforilación y conduce a un estado excitado superior de la membrana tilacoide, generando una menor tasa de transporte de electrones (Jacob, 1995) que, a largo

plazo, puede resultar en una baja eficiencia fotosintética (Rao, 1997 y Wang y col., 2010a). Jacobson y Halmann (1982), mostraron el aumento de la producción de gránulos de polifosfato al pasar a *Microcystis* de un medio con escaso fósforo a uno rico. En general, los microorganismos responden a una concentración de fósforo limitante mediante el aumento de la tasa máxima de absorción (Rhee, 1980). El aumento repentino de fósforo ambiental conduce a una rápida acumulación de este nutriente en forma de gránulos de polifosfatos en los organismos que lleva a la disminución e inhibición de la tasa de absorción de fósforo (**Figura 7**). Esta puede ser de importancia ya que las especies con una baja inhibición en la tasa de absorción de fosforo pueden almacenar este elemento en mayor proporción que las especies con una alta inhibición de la absorción. *Microcystis* tiene una constante de inhibición de la absorción de fosforo relativamente más baja que *Oscillatoria* (Kromkamp y col., 1989) por lo que puede absorber y almacenar mayores cantidades de fósforo que otros miembros del fitoplancton.

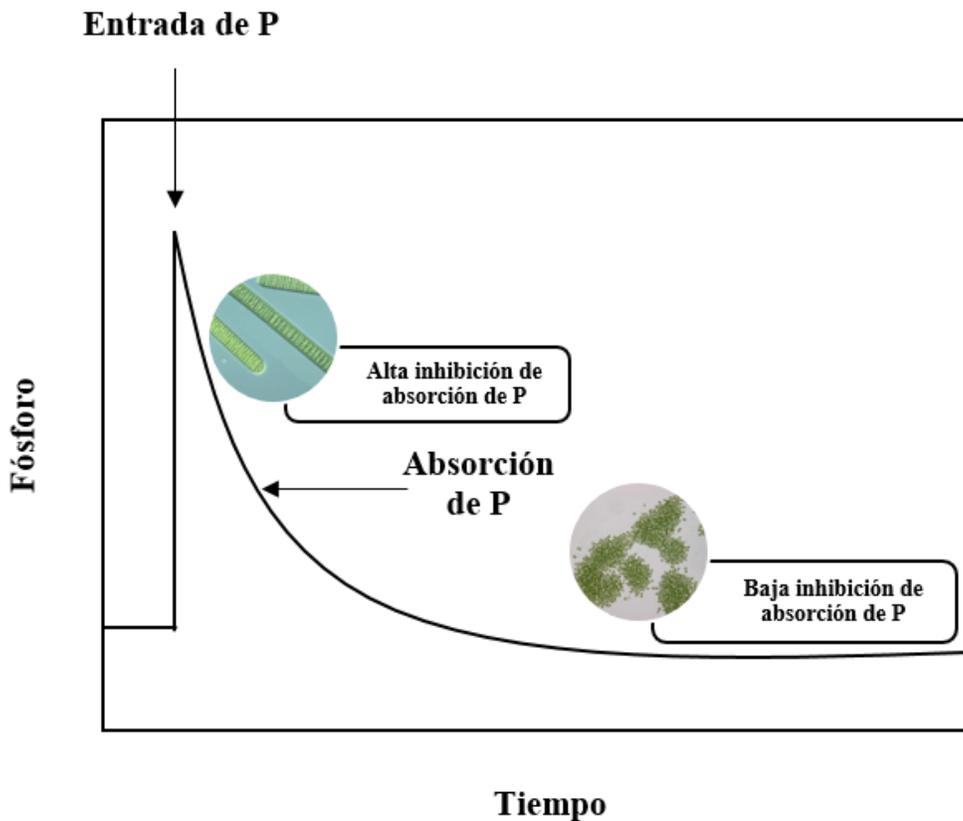


Figura 7. Absorción de fósforo (P) ambiental bajo condiciones de deficiencia de P.

El nitrógeno es otro de los principales nutrientes para las cianobacterias (Yang y col., 2012) por ejemplo para la síntesis de vesículas de gas (Oliver y Ganf, 2000). Para aquellas especies que no fijan nitrógeno, el amonio es la principal fuente de este nutriente (Blomqvist y col., 1994). Sin embargo, los nitratos parecen ser la principal forma de nitrógeno en ambientes que presentan baja relación N:P (McQueen y Lean, 1987) en donde las cianobacterias suelen estar favorecidas (Flett y col., 1980; Schindler, 1977; Smith, 1983; Schreurs, 1992; McQueen y Lean, 1987).

Las reservas de nitrógeno en las células de *M. aeruginosa* se restringen a la acumulación de proteínas ricas en este nutriente (Aubriot y col., 2009).

Por su parte, Redfield (1934) estableció que si los nutrientes no son limitantes, en la mayoría de los organismos fitoplanctónicos la relación C:N:P es 106:16:1 (por cada 106 átomos de carbono inorgánico que se convierten en materia orgánica, se necesitan 16 átomos de nitrógeno y 1 átomo de fósforo). Considerando que, generalmente el carbono inorgánico está en exceso en los ambientes acuáticos, la relación N:P resulta un parámetro adecuado para estudiar el crecimiento de *M. aeruginosa* y la producción de MCs más que el estudio de las concentraciones de cada nutriente por separado.

La influencia de los nutrientes en el crecimiento y producción de MCs de *M. aeruginosa* presentan resultados contradictorios (Vela y col., 2007). Algunos estudios indican que a mayor concentración de nitrógeno, mayor es el crecimiento en *Oscillatoria* (Sivonen, 1990) y otros que a menor concentración de nitrógeno mayor es el crecimiento de *M. aeruginosa* y producción de MCs (Long y col., 2001). Utkilen y col., 1995, observaron que el fósforo no influye en la producción de MCs mientras que otros autores, que las condiciones limitantes de fósforo aumentan la síntesis de MCs (Wicks y col., 1990; Oh y col., 2000).

Debido a esto, es fundamental conducir estudios que permitan dilucidar las influencias de las relaciones N:P sobre el crecimiento de *M. aeruginosa* y producción de MCs de cepas autóctonas; y de este modo, evaluar estrategias de manejo de floraciones cianobacterianas.

Irradiación

La luz o irradiación es una forma de energía radiante que puede ser descrita a través del modelo ondulatorio (ondas electromagnéticas) o corpuscular (fotones o cuantos de luz) (Plastino y Mansilla,

2004). El flujo de energía radiante por superficie (irradiancia) puede medirse en función de los fotones. En los organismos autótrofos, es un factor energético que controla la fotosíntesis (Angelier, 2002). En las cianobacterias, la fotosíntesis es posible en todo el espectro visible gracias a la presencia de pigmentos accesorios. La luz está restringida a longitudes de onda comprendida entre los 400-700 nm (radiación fotosintéticamente activa - PAR); abarca los espectros de luz azul (450-475 nm), roja (620-700nm) y verde (529 -497 nm) (Palacios Bohórquez, 2016). Este rango del espectro provee la energía necesaria para la excitación del fotosistema I (P680) y fotosistema II (P700), provocando la liberación de electrones de la clorofila y dando inicio a la cadena de transporte de electrones en la fase lumínica y la consecuente formación de ATP que posteriormente será utilizado en el ciclo de Calvin (Hill, 1996).

Ecológicamente, existen dos tipos de estrategias frente a la irradiación: organismos de estrategia de luz alta y organismos de estrategia de luz baja. Para definir el tipo de estrategia, se estudia su respuesta respecto al crecimiento frente a un gradiente de intensidad de luz (**Figura 8**) y se determinan los parámetros α , que es la pendiente inicial de la curva de crecimiento en función de la intensidad de luz (I) así como la intensidad de luz subsaturante (I_K) que es la cantidad máxima de fotones que la célula puede procesar (Falkowski y Raven, 1997). Por encima del I_K , ocurre la máxima tasa de crecimiento (μ_{MAX}), si se aumenta aún más, ocurre la fotoinhibición (Kirk, 1994). Los valores de I_K para las especies con estrategia de luz alta son mayores a los correspondientes para la estrategia de luz baja, y α tiende a ser mayor para las especies con estrategia de luz baja respecto a las de estrategia alta (Fabre-Iturburúa, 2011). *M. aeruginosa* es una especie de estrategia de luz alta ($>100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Aubriot y col., 2009), adaptada a la alta irradiación mediante pigmentos accesorios y sistemas de reparación contra el daño provocado por la fuerte incidencia de los rayos ultravioletas (Scheffer, 2004). Cuando la irradiación es baja, se produce un aumento en la pigmentación (Zevenboom y Mur, 1984).

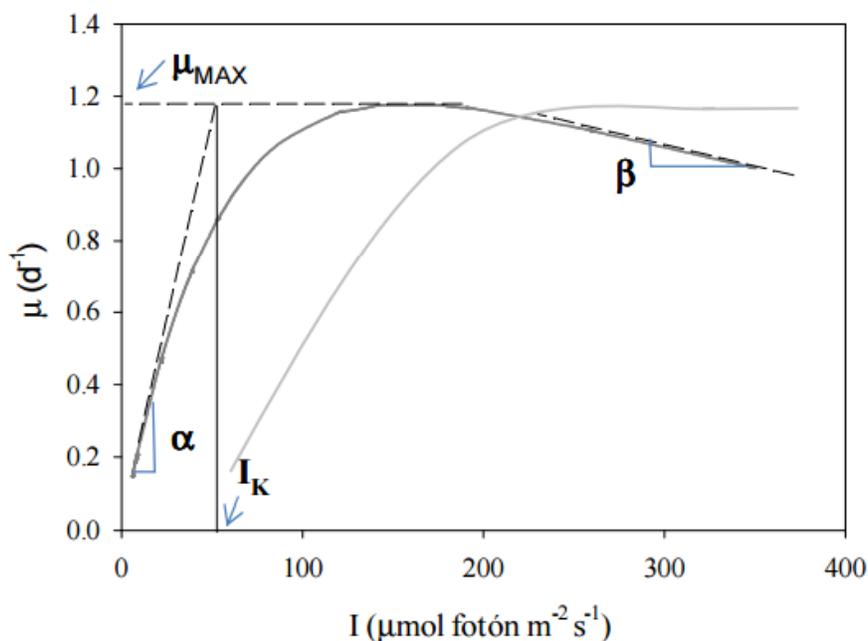


Figura 8. Curva teórica de la tasa de crecimiento (μ) en función de la intensidad de luz (I) para una especie con estrategia de sombra (línea gris oscuro) y de luz alta (línea gris claro). Se indican los parámetros: tasa de crecimiento máxima (μ_{MAX}), pendiente inicial de la curva (α), intensidad de luz de subsaturación (I_K) y pendiente de inhibición (β) (Fabre-Iturburúa, 2011)

Del mismo modo que se mencionó en la temperatura, para la irradiancia también existe la aclimatación de las poblaciones a un ambiente lumínico particular o fotoaclimatación (Walters, 2005). La fotoaclimatación está regulada por señales que provienen de la propia fotosíntesis y forman parte de los mecanismos de regulación homeostática (Walters, 2005). Estos mecanismos son diversos y se dan en diferentes escalas temporales: a corto plazo (segundos-minutos) comprende procesos que no requieren de la síntesis proteica, como la modificaciones en las vías de regulación; a mediano y largo plazo (horas-días-semanas), involucra la síntesis y degradación específica de grandes complejos moleculares y variaciones en el número de fotosistemas, en la proporción entre los centros de reacción de los fotosistemas I y II y en los centros de captación de energía (Bhaya y col., 2002, Walters, 2005, Fabre-Iturburúa, 2011).

Microcystis aeruginosa si bien es una cianobacteria considera de estrategia de luz alta, en condiciones de laboratorio crece mejor a baja irradiación ($<30\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y son extremadamente susceptibles a la foto-inhibición. Esto puede deberse a las diferencias de las características y composición de la luz así como a las densidades de células en condiciones de laboratorio frente a las ambientales.

Este proceso depende de la intensidad de la luz incidente, tiempo de exposición y longitud de onda (Walsh y col., 1997). El exceso de irradiancia puede generar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño oxidativo en las células (Müller y col. 2001); una intensidad de irradiancia aún mayor conlleva a la fotoinhibición y pérdida de la eficacia de la fotosíntesis.

El efecto de los diferentes factores físicos y químicos sobre el crecimiento y la producción de MCs anteriormente expuestos puede ser estudiado sobre las diversas fases del crecimiento de *M. aeruginosa*. Este tema reviste interés y conlleva a la caracterización de cepas nativas encontradas en nuestro país. Una herramienta interesante de ser aplicada en el estudio de estos factores que ejercen su acción sobre el crecimiento de *M. aeruginosa* y la producción de toxina ya sea solos o combinados es el modelado matemático.

Modelos matemáticos

La microbiología predictiva se basa en el desarrollo de modelos matemáticos que permiten predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo determinadas condiciones ambientales (Chang-Fornaris, 1998). Los modelos matemáticos son representaciones simplificadas de un sistema o un fenómeno. Muchas veces formular un concepto teórico en forma de modelo permite poner a prueba determinadas predicciones que derivan de esos conceptos y explorar posibles consecuencias o comportamientos no previstos o no inmediatamente intuitivos (Momo y Capurro, 2006).

Las curvas de crecimiento muestran el crecimiento de las células procariotas en función del tiempo, en ella pueden distinguirse cuatro fases (**Figura 9**; Tortota y col., 2007):

- Lag, latencia o fase de retraso: el número de células cambia poco debido a que estas no se reproducen inmediatamente en un medio nuevo. Hay nula o escasa división celular y la población

atraviesa un período de intensa actividad metabólica que comprende la síntesis de enzimas y moléculas.

- Logarítmica o exponencial: la reproducción celular alcanza una actividad máxima (mayor actividad metabólica) y el tiempo de generación llega a un mínimo constante. Sin embargo, las células son mucho más sensibles a las condiciones adversas en esta fase.
- Estacionaria: el número de células muertas compensa el número de células nuevas por lo que la población se estabiliza; la actividad metabólica se torna más lenta.
- Declinación, senescencia o muerte: el número de células muertas supera a las células nuevas y la población entra en declinación logarítmica.

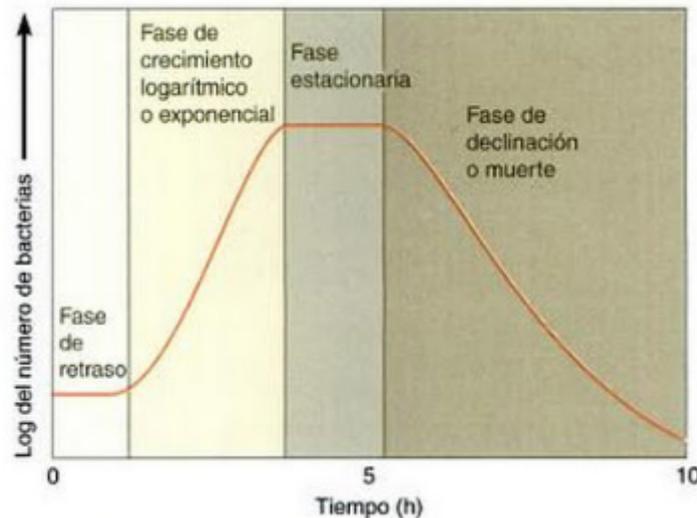


Figura 9. Fases del crecimiento bacteriano (Tortora y col., 2007)

Según Coll-Cárdenas y col. (2001), los modelos matemáticos pueden clasificarse en tres niveles:

- Modelos de nivel primario: se describen cambios en el número de microorganismos en función del tiempo. Para su cuantificación, se puede medir tanto el número de células como la cantidad de metabolito producido (Geeraerd y col., 2004).
- Modelos de nivel secundario: describen las respuestas de los parámetros del modelo primario al cambiar determinadas condiciones de desarrollo o crecimiento, observándose la interacción de dos o más parámetros.

- Modelos de nivel terciario: corresponden a *software* que transforman a los modelos de nivel primario y secundario en programas (McMeekin, 2007). Estos permiten calcular la respuesta de los microorganismos en las distintas condiciones, comparar los efectos de dichas condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos. Entre los más representativos se encuentran el *Pathogen Modeling Program* (PMP) desarrollado por *Agricultural Research Center and Eastern Regional Research Center* (USA), *Microfit* propuesto por *Food Standards Agency and Institute of Research* (UK), *Combase* propuesto por UK, USDA, and *Food Safety Center* (Australia), entre otros representativos (Buelvas Salgado, 2013).

A efectos de modelar el crecimiento de *M. aeruginosa* pueden utilizarse tres modelos primarios continuos poblacionales. El más sencillo es el modelo exponencial o de Malthus (**Ecuación 1**) utilizado para modelar la fase exponencial de crecimiento. La velocidad de crecimiento es una función lineal de la densidad poblacional y tiene una solución explícita que es:

$$N(t) = N_{0*}e^{rt} \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde **N(t)** es la población a tiempo **t**, **N₀**, la inicial; **r** es una constante que indica la tasa de crecimiento y **t** es el tiempo. Un parámetro que se obtiene de este modelo es el tiempo de duplicación que es el tiempo necesario para incrementar al doble la población inicial.

Este modelo es muy utilizado en organismos que se comportan como plagas, sin embargo, es también muy útil para describir el crecimiento poblacional de muchos organismos en períodos pequeños debido a que no hay limitaciones por espacio y recursos.

Otro de los modelos utilizados es el logístico o modelo de Verhulst (**Ecuación 2**), la velocidad de crecimiento es una función cuadrática de la densidad poblacional y se basa en el modelo anterior bajo el supuesto de que la población no puede crecer indefinidamente y cada vez más rápido. En este modelo, **r** no es una constante, sino que es función lineal decreciente de la densidad poblacional. Este modelo tiene

dos puntos de equilibrio definidos como valores de N en donde la velocidad de crecimiento es cero. Estos puntos se corresponden a $N=0$ y $N=K$ (capacidad de carga). La capacidad de carga se refiere a la máxima población que su ambiente puede sostener ya sea por disponibilidad de recursos o espacio.

$$N(t) = \frac{K}{1 + \frac{K - N_0}{N_0} e^{-r_0 t}} \quad \text{Ec. 2}$$

Dónde $N(t)$ es la población final y N_0 , la inicial; r es una constante que indica la tasa máxima de crecimiento, t es el tiempo y K es la capacidad de carga.

Finalmente, el modelo de Gompertz es uno de los modelos más utilizados para describir el desarrollo microbiano (Gibson y col., 1988; Zwietering y col., 1990) determinando la respuesta de los microorganismos bajo diversas combinaciones de factores ambientales (Zwietering y col., 1990; Buchanan, 1992; Lu y col., 2005). Este modelo describe las fases de crecimiento antes mencionadas. El modelo de Gompertz (1825) utiliza una tasa de inhibición de la variable de estado proporcional al logaritmo de la variable, esto significa que la tasa de crecimiento es grande al inicio del proceso cambiando rápidamente a un crecimiento más lento; es un modelo adecuado para representar crecimientos celulares (plantas, bacterias, tumores) siendo que al inicio todas las células son meristemáticas o reproductoras y van perdiendo esta propiedad en un tiempo relativamente pequeño (Bassanezi, 2002).

Dentro de los modelos, es un modelo continuo logístico que utiliza ecuaciones diferenciales. La solución es una función doble exponencial basada en 4 parámetros que describen una curva sigmoideal asimétrica (Zwietering y col., 1991; Col-Cárdenas y col., 2001) (**Figura 10, Ecuación 3**).

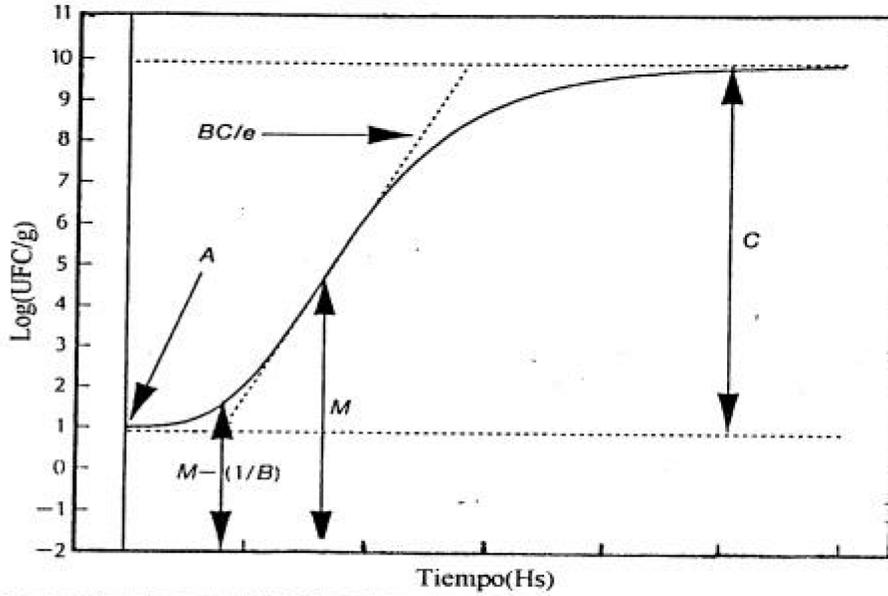


Figura 10. Esquema del modelo de Gompertz (Col-Cárdenas y col., 2001).

$$\text{Log}(N) = a + c * \exp(-\exp(-b*(t - m))) \quad \text{Ec. 3}$$

Dónde **log N** es el logaritmo del número de células ($\log(\text{cél.mL}^{-1})$) al tiempo **t**, **t** es el tiempo (días), **a** es el logaritmo del incremento poblacional, es decir, la diferencia entre la asíntota superior ($\log(N)$ al tiempo $\rightarrow \infty$) y el conteo inicial, **c** es el logaritmo asintótico del conteo cuando el tiempo es aumentado indefinidamente (el número de ciclos logarítmicos de crecimiento) ($\log(\text{cél.mL}^{-1})$), **b** es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo (día^{-1}) y **m** es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (día). A partir de estos, se pueden estimar los parámetros derivados de la ecuación de Gompertz que son: la velocidad específica de crecimiento (μ) que corresponde al valor definido como la tangente en el punto de inflexión y se calcula como $\mu = b * c / e$ con $e = 2,7182$ (día^{-1}); la duración de la fase de latencia (**LPD**) definida como la intercepción de la tangente en el eje x y la asíntota del eje y fue calculada como $\text{LPD} = m - 1/b$ (día); y la máxima población (**MPD**) como el valor máximo de células alcanzado y se calcula como $\text{MPD} = a + c$ ($\log(\text{cél.mL}^{-1})$) (Giannuzzi y col., 1998). Al examinar estos parámetros, se puede predecir el comportamiento de florecimientos de *M. aeruginosa* de modo de

reconocer los signos de alerta temprana para la toma de acciones preventivas. Si bien algunos autores han realizado experimentos de laboratorio usando *M. aeruginosa* bajo diferentes condiciones de temperatura, irradiación y relaciones N:P (van der Westhvizen y Eloff, 1985; Fujimoto y Sudo, 1997; Lick, 2004; Jiang y col., 2008; Davis y col., 2009; Jähnichen y col., 2011; Yang y col., 2012; Bortoli y col., 2014) y modelado su crecimiento, solo aplicaron el modelo exponencial de crecimiento de la curva. No hay información disponible del modelado completo de la curva de crecimiento ni de los parámetros cinéticos del crecimiento de *M. aeruginosa*.

Por otra parte, para el modelado de la velocidad de producción de MCs se han propuesto modelos primarios lineales como los de Long y col. (2001). Este estableció que la relación lineal entre R_{MC} y μ puede ser descripta en términos de la predicción de Q_{MCmin} , Q_{MCmax} y μ_{max} . (**Ecuación 4**).

$$Q_{MC} = \mu * \left(\frac{Q_{MCmax} - Q_{MCmin}}{\mu_{max}} \right) + Q_{MCmin} \quad \text{Ec. 4}$$

En dónde Q_{MC} es el cuota de MCs por célula que se obtiene del cociente entre la concentración de MCs y el recuento de células y μ_{max} es la velocidad máxima de crecimiento de la cianobacteria.

La producción neta de MC (R_{MC}) es determinada como el producto de μ y Q_{MC} y ambas muestran una relación lineal que puede ser descripta en términos de Q_{MCmin} , Q_{MCmax} y μ_{max} . (**Ecuación 5**).

$$R_{MC} = \mu * \left[\frac{(\mu * Q_{MCmax}) - (\mu * Q_{MCmin})}{\mu_{max}} \right] + (\mu * Q_{MCmin}) \quad \text{Ec. 5}$$

Otro tipo de modelos primarios utilizados es el dinámico como el propuesto por Jähnichen y col. (2001, 2008) (**Ecuación 6**).

$$\frac{dM}{dt} = p * \frac{dx}{dt} - d_m * M \quad \text{Ec. 6}$$

Dónde M es la concentración de MCs, p es el coeficiente de la producción de MCs que describe una cantidad constante de MC que pasa a cada nueva célula durante la división celular, d_m es la velocidad de

depleción de primer orden de MC la cual tiene en cuenta la disminución intracelular de MCs en el tiempo en el cultivo batch y dM/dt la concentración de MCs en el tiempo (Jähnichen y col., 2001).

Hasta el momento, no existen en bibliografía trabajos científicos que aborden el modelado de la curva completa de crecimiento de esta especie y su asociación con la producción de MCs frente a diferentes condiciones de temperatura, irradiación y relación N:P. Estos temas se abordarán en la presente Tesis Doctoral.

Remoción de microcistinas en agua

Las intensas y frecuentes floraciones cianobacterianas que afectan las aguas de embalses, ríos y lagunas, incrementan el riesgo de hallar la presencia de MCs. Como se mencionó anteriormente (ver apartado Microcystis aeruginosa y microcistinas), las MCs generan efectos agudos y crónicos sobre las personas expuestas a agua contaminada. Es por ello que la remoción de MCs en agua es un objetivo principal de las plantas depuradoras y de distribución de agua potable. Los tratamientos convencionales son ineficientes principalmente en períodos críticos de floraciones de cianobacterias como se ha reportado previamente (Lahiti y Hiisverta, 1989). Prueba de ello ha sido la presencia de MCs en suministros de agua potable detectada en 10 de 13 muestras en Ensenada y La Plata, Argentina (Echenique y col., 2006).

Los procesos de coagulación, floculación-sedimentación, filtración y cloración pueden ser efectivos para remover MCs intracelular cuando la célula está intacta (Lam y col., 1995; Chow y col., 1999) pero son ineficientes para removerla cuando está en solución (Keijola y col., 1988; Himberg y col, 1989; Svrcek y Smith, 2004). Las floraciones de cianobacterias al ingresar a la planta pueden provocar la obstrucción mecánica en los diferentes procesos unitarios y, a la vez, un aumento del consumo de insumos (Ho y col., 2007^a).

Por otra parte, luego de la remoción de células en los procesos de coagulación-sedimentación pueden quedar en solución cantidades importantes de MCs debido a la lisis de las células. Por ello resulta de interés remover MCs disueltas en el agua tratada. Para la remoción de MCs existen diversos métodos fisico-químicos que plantean ventajas y desventajas en su utilización.

- Oxidantes. El cloro es el más utilizado, así como el ozono; si bien son efectivos en la remoción de MCs en solución, al ser aplicados sobre una floración pueden causar lisis celular y generar, en el

caso del cloro, una amplia gama de compuestos clorados tóxicos para los mamíferos incluyendo los trihalometanos conocidos como cancerígenos (Svrcek y Smith, 2004) y, en el caso del ozono, se genera bromato que es un potencial carcinógeno (Bouland y col., 2004).

- Alguicidas. Están basados en compuestos de cobre que son potencialmente tóxicos y pueden permanecer en el agua generando un peligro mayor al ser consumida (Kenefick y col., 1993). Estos pueden lisar las células liberando las MCs en el cuerpo de agua y afectar a las bacterias beneficiosas que pueden degradar la toxina (Jones y Orr, 1994) y pueden inducir resistencia en los organismos.
- Adsorbentes. El más utilizado es el carbón activado que es efectivo en la remoción de MCs; su eficiencia depende de las características del producto y del agua a tratar. Sin embargo, el carbón progresivamente se satura y pierde capacidad de adsorción a medida que aumenta el volumen de agua filtrada (Falconer y col., 1989). La presencia de materia orgánica reduce la eficacia del tratamiento de remoción de MCs debido a que ocupa los sitios de adsorción (Jones y col., 1993).
- Métodos biológicos. Surgen como una alternativa en el tratamiento de aguas en la década del 90 ya que algunos estudios indicaban que la biodegradación era la principal ruta de eliminación de MCs en el ambiente (Edwards y Lawton, 2009; Zhang y col., 2010). Se presentan como un método seguro (Ishii y col., 2004) que no requiere intrusión biótica debido a que los microorganismos ya están presentes (Chen y col. 2006; Eleuterio y Batista, 2010). La remoción biológica puede ser muy eficaz; sin embargo, los factores que afectan a la eliminación como la masa de biopelículas y la composición, períodos de aclimatación, temperatura y calidad del agua muchas veces no pueden controlarse fácilmente. Más recientemente, se han planteado los métodos biológicos en combinación con otros métodos físicos de adsorción (Drikas y col., 2001) como la que se practica de forma rutinaria en el proceso de tratamiento de agua potable (Jones y col., 1994; Hoeger y col., 2005; Ho y col., 2007; Manage y col., 2010). Más recientemente, Li y Pan (2015) utilizaron microorganismos del suelo combinados con quitosano en una columna a modo de filtro; observaron una alta eficiencia de remoción de MCs al combinar la floculación (eliminando MCs intracelulares) y el proceso de filtrado.

En este contexto, en los últimos años diversos autores han aislado bacterias y consorcios de microorganismos en agua, sedimentos y filtros de plantas de tratamiento de agua con capacidad de remover MCs, los cuales se exponen a continuación.

Microorganismos con potencial para remover microcistinas

La remoción de MCs por medio de microorganismos ha sido estudiada en cursos de agua superficiales, embalses, sedimentos, lagunas de aguas residuales, lagunas de estabilización y filtros de arena.

Diversos investigadores han estudiado la remoción por un conjunto de microorganismos denominados genéricamente como consorcio o biofilm (Cousins y col., 1996; Saitou y col., 2002, Li y col., 2011; Wu y col., 2015; Maghsoudi y col., 2015 y Wang y col., 2016). Por su parte, Cousins y col. (1996) identificaron como mecanismo de remoción a la biodegradación y observaron que la cadena lateral *-Adda* es el sitio de biodegradación inicial.

Además, ha sido aislado un gran grupo de bacterias (**Tabla 1**) siendo Sphingomonadaceae la familia más estudiada. La mayoría de estos organismos han sido identificados como *Sphingomonas* (Bourne y col., 1996, 2001; Park y col., 2001; Saito y col., 2003; Saitou y col., 2003; Harada y col., 2004; Ishii y col., 2004; Ho y col., 2006; Amé y col., 2006) y *Sphingopyxis* (Okano y col., 2009; Zhang y col., 2010; Wang y col., 2010^b; Shimizu y col., 2011; Yan y col., 2012^{a,b}). Casi todos los estudios genotípicos en la remoción de MCs se han centrado en miembros de esta familia y se ha demostrado que contiene genes específicos necesarios para la biodegradación de aquellas. Bourne y col. (1996, 2001) identificaron el cluster de genes, *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* y *mlrD*, de la bacteria *Sphingomonas* sp. cepa ACM-3962 involucrados en la degradación de MC-LR. Los autores determinaron que el gen *mlrA* codifica una enzima responsable de la ruptura hidrolítica de la estructura cíclica de MC-LR. La molécula lineal MC-LR resultante se hidroliza a continuación y secuencialmente por peptidasas codificadas por los genes *mlrB* y *mlrC*. Finalmente, el gen *mlrD* codifica una posible proteína transportadora que permitiría el transporte activo de la MC y/o sus productos de degradación fuera de la célula. Recientemente, Zhu y col. (2016) confirmaron que las bacterias que degradan MCs influyen al regular la expresión de *mcyD* en una cepa tóxica de *Microcystis*.

Los estudios han demostrado que la degradación de MCs no genera subproductos tóxicos. Bourne y col. (1996) y Harada y col. (2004) identificaron dos productos intermedios de la degradación de MC-LR por

Sphingomonas sp. cepa ACM-3962 y *Sphingomonas sp.* cepa B9, respectivamente. Ambos estudios identificaron MC-LR linealizada (NH₂-Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-OH) y un tetrapéptido (NH₂-Adda-Glu-Mdha-Ala-OH). Asimismo, Harada y col. (2004) aislaron -Adda como un producto final de degradación. Por su parte, Amé y col. (2006) estudiaron el camino de la biodegradación de MC-RR por *Sphingomonas sp.* cepa CBA4 y este comenzaría desmetilando MC-RR, obteniéndose un producto intermedio. Asimismo, Wang y col. (2010^b) también estudiaron la degradación de MC-RR. Estos autores hallaron dos metabolitos intermedios y un producto de MC-RR y fueron observados en HPLC y todos ellos tenían perfiles de análisis similares en la longitud de onda de 200 a 300 nm, lo que indica que el grupo de -Adda, en todos los productos de MC-RR se mantuvo intacto. Yan y col. (2012^b) caracterizaron el primer paso del camino enzimático de la biodegradación de MC-RR por *Sphingopyxis sp.* cepa USTB-05. Las secuencias de nucleótidos clonados de la cepa USTB-05-A poseían 92,5% de similitud con la secuencia del gen *mrlA* reportado en *Sphingomonas sp.* cepa ACM-3962. Esta bacteria ha mostrado capacidad para biodegradar MC-LR con anterioridad (Wang y col., 2010^b).

Tabla 1. Bacterias aisladas con potencial de degradación de MCs.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	Cepa	Referencia	Tipo de MC
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas		7CY; Y2; ACM-3962; CBA4; LH21	Boume y col. (1996, 2001); Parky Harada y col. (2001); Saito y col. (2003); Harada y col. (2004); Ishii y col. (2004); Ho y col. (2006); Amé y col. (2006); Kato y col. (2007).	LR, RR, YR, LF, LW, LY
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	<i>Sphingosinicella microcystinivorans</i>	B-9	Kurama y col. (2012)	LR, YR, RR
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	<i>S. sngia</i>		Saitou y col. (2003)	LR, YR, RR
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis		C-1, USTB-05	Okano y col. (2009); Zhang y col. (2010); Shimizu y col. (2011); Yan y col. (2012b)	RR
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingosinicella	<i>S. microcystinivorans</i>	Y2 [†]	Mariyama y col. (2006)	RR
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium		THN1	Jiang y col. (2011)	LR
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium		DC7	Ramani y col. (2012)	LR
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium		TH	Zhu y col. (2016)	LR
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Methyloliphales	Methyloliphilaceae	Methylolobacillus		J10	Hu y col. (2009)	LR, RR
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia			Lemes y col. (2008)	LR
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Paucibacter	<i>Paucibacter toxinivorans</i>	DSM 16998	Rapala y col. (2005)	LR, YR
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Ralstoniaceae	Ralstonia			Zhang y col. (2011); Yan y col. (2004)	LR, RR
Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Morganella	<i>M. morganii</i>		Eleuterio y Batista (2010)	LR
Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>P. aeruginosa</i>		Jones y col. (1994); Takenaka y Watanabe (1997); Leey col. (2006); Kang y col. (2012); Li y Pan (2014, 2015).	LR, RR
Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		dem5A	Li y Pan (2014)	LR, RR
Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter		EMS	Chen y col. (2010)	LR, RR
Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas		MC-LTH2	Yang y col. (2014)	LR, RR
Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	<i>acidaminiphila</i>		Yang y col. (2014)	LR, RR
Proteobacteria	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	<i>E. ludwigii</i>		Sathyay col. (2015)	RR
Actinobacteria	Actinobacteria	Actynomycetales	Micrococaceae	Arthrobaacter			Manage y col. (2009)	RR
Actinobacteria	Actinobacteria	Actynomycetales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium			Manage y col. (2009)	RR
Actinobacteria	Actinobacteria	Actynomycetales	NoCARDiaceae	Rhodococcus		DC8	Manage y col. (2009)	LR
Actinobacteria	Actinobacteria	Actynomycetales	Microbacteriaceae	Microbacterium			Ramani y col. (2012)	LR
Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	<i>B. lactis</i>	420; Bb12	Merluoto y col. (2005); Nybomy col. (2008)	LR, RR, LF
Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	<i>B. longum</i>	46	Nybomy col. (2008)	LR, RR, LF
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	<i>L. rhamnosus</i>	GG; LC-705	Merluoto y col. (2005); Nybomy col. (2008)	LR, RR, LF
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus		EMB	Hu y col. (2012)	LR, RR
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	<i>B. flexus</i>	SSZ01	Alamri (2012)	RR
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium			Lee y col. (2006)	LR

Planteo del problema

Las floraciones de cianobacterias fitoplanctónicas son un problema global en ecosistemas de agua dulce dado que ponen en riesgo las fuentes de agua potable (Paerl y col., 2001) y recreacionales (Turner y col., 1990; Giannuzzi y col., 2011) y tienen, por lo tanto, implicancias ecológicas y sanitarias. Son consideradas una consecuencia de la eutrofización de los cuerpos de agua entendida como la incorporación de nutrientes y materia orgánica provenientes del exterior que induce alteraciones en las características del sistema y en su composición biótica (Margalef y col., 1976). El fenómeno de eutrofización se encuentra actualmente intensificado por las actividades antrópicas vinculadas al uso del suelo que, en el contexto de cambio climático, favorecería a las floraciones de cianobacterias haciendo que sean cada vez más frecuentes e intensas (Vela y col., 2007; Paerl y Huisman, 2008; Michalak y col., 2013; Paerl y Otten, 2013).

Las floraciones cianobacterianas ocurren por la dominancia de una o pocas poblaciones de especies que crecen masivamente (Aguilera y Echenique, 2011) y se estima que el 50% de ellas son tóxicas (Roset y col., 2001). Los efectos incluyen anoxia, aumento de la materia orgánica, producción de compuestos volátiles que generan olores y sabores desagradables y cianotoxinas (Vela y col., 2007). El particular, el género *Microcystis*, especialmente *M. aeruginosa*, es la más ampliamente distribuida a nivel mundial, incluyendo a la Argentina. Los factores más importantes que influyen en su crecimiento y producción de cianotoxinas son la temperatura, la irradiación y los nutrientes. Existen diversos trabajos que han tratado de dilucidar el efecto de estos factores, pero ninguno de ellos ha abordado la cinética de crecimiento y producción de cianotoxinas a través de modelos matemáticos que incluyan las cuatro fases de las curvas de crecimiento de modo diferencial. Asimismo, el modelado de la producción de MCs mediante un modelo dinámico que contemple el desarrollo bacteriano según se modifiquen las condiciones ambientales tampoco ha sido abordado en la literatura. Esto permitiría comprender la dinámica de *M. aeruginosa* y realizar predicciones respecto a su biomasa y metabolitos como la clo-a y las MCs.

Otro aspecto relevante para comprender la dinámica de las floraciones cianobacterias, es que estas se encuentran acompañadas de microorganismos de su entorno o ficosfera (Chalar y col., 2002; Paerl, 1998). Algunos de estos microorganismos pueden ser patógenos y están representados por bacterias, hongos, ciliados y ameboides (Chalar y col., 2002). Muchas bacterias son capaces de estimular o inhibir el

crecimiento de las cianobacterias (Salomon y col., 2003) o provocarles mortandad (Manage y col., 2000) así como influenciar la producción de cianotoxinas. Durante las últimas décadas, el estudio de estos microorganismos se dirigió hacia la bioremoción de cianotoxinas. El aislamiento de nuevas cepas bacterianas degradadoras de MCs podría ser un método de tratamiento de agua sencillo, de bajo costo y efectivo que puede ser combinado con tratamientos físicos y químicos.

Hipótesis

Hipótesis principales

- Los parámetros de la curva de crecimiento de *M. aeruginosa* y de la producción de clo-a y MC se correlacionan positivamente con los factores temperatura, relación N:P e irradiación.
- La producción de MC es un proceso acoplado a la velocidad de crecimiento de *M. aeruginosa*.
- Las bacterias provenientes de floraciones de cianobacterias remueven MC-LR en condiciones de laboratorio.

Objetivos

Objetivo general

Avanzar en el conocimiento básico y aplicado del desarrollo de floraciones cianobacterianas y en la producción de cianotoxinas.

Objetivos específicos

- Caracterizar la cinética de crecimiento y producción de microcistina de la cepa a diferentes temperaturas bajo las condiciones óptimas en cultivos de laboratorio.
- Cuantificar y modelar la cinética de crecimiento de *M. aeruginosa* bajo diferentes condiciones (temperatura, relación N:P e irradiación) en cultivos de laboratorio.
- Cuantificar y modelar la producción de clo-a de *M. aeruginosa* bajo diferentes condiciones en cultivos de laboratorio.
- Cuantificar y modelar la producción de microcistina (MCs) generada bajo diferentes condiciones en cultivos de laboratorio.

- Determinar la relación entre la velocidad específica de crecimiento celular de *Microcystis aeruginosa* (μ_c) y la velocidad de producción de microcistina (μ_{MC}).
- Aislar y caracterizar el ensamble de bacterias heterótrofas asociados a florecimientos cianobacterianos que remueven MC-LR así como las bacterias con potencial para remover MC-LR en solución acuosa.

Materiales y métodos

Cultivo de *M. aeruginosa*

Los ensayos de cinética de crecimiento y la producción de MCs se realizaron con una cepa autóctona de *M. aeruginosa*, CAAT 2005 – 3 no axénica aislada de la localidad de Pila, provincia de Buenos Aires, que ha sido caracterizada previamente por Rosso y col. (2014). Produce 9 variantes MCs siendo la principal, MC [D-Leu¹]-LR (Qi y col., 2015). La cepa ha reducido aproximadamente 2 veces su producción de MCs en condiciones de laboratorio. Además, ha perdido su capacidad de formar colonias típicas (**Figura 4a**) tal como lo han reportado otros autores con otras cepas de *M. aeruginosa* (Zehnder y Gorham, 1960; Scott y col. 1981; Runnegar y col., 1983).

El tamaño de sus células se encuentra entre 3-5 μm , siendo los típicos para *M. aeruginosa* (Zehnder y Gorham, 1960).

La conservación de la cepa se realizó, en el cepario del Laboratorio de Toxicología General de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), mediante pasajes periódicos en medio BG11 (Rippka y col., 1979) modificado (N:P 10) (**Tabla 2**) y cultivada a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, bajo una intensidad de luz de $30\text{ }\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con ciclos de luz-oscuridad de 14:10 horas y aireación constante con aire húmedo estéril, siguiendo los criterios y técnicas de cultivo reunidos en Gonzalez y col. (1995) y Rios-Jacinavicius y col. (2013). Todo el material utilizado, así como el medio de cultivo, fueron previamente esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 121°C y la manipulación de las cepas se realizó bajo condiciones controladas de esterilidad.

Tabla 2. Composición del BG11 modificado para preparar 1 L.

Reactivos BG11 modificado (Vf=1000ml)	Cantidad
Fosfato dipotásico trihidratado	0,04 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,075 g
Cloruro de calcio dihidratado	0,036 g
Carbonato de sodio	0,04 g
Solución 1 (Vf=250 ml)	5 ml
Citrato de amonio y hierro (III)	0,3 g
Ácido cítrico monohidratado	0,3 g

Solución 2 (Vf=250ml)	5 ml
Magnesio Titriplex® dihidrato	0,05 g
Solución 3 (Vf=250ml)	1 ml
Ácido bórico	0,72 g
Cloruro de manganeso tetrahidratado	0,45 g
Sulfato de zinc heptahidratado	0,056 g
Molibdato de sodio dihidratado	0,098 g
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	0,020 g
Nitrato de cobalto (II) hexahidratado	0,012 g
Solución 4*	
Nitrato de sodio (200 mM)	10 ml
Solución 5*	
Bicarbonato de sodio (1 M)	10 ml

*Para la preparación del medio y las soluciones, se utilizó agua destilada. Las soluciones 4 y 5 fueron autoclavadas por separado y adicionadas al momento de utilizar el medio de cultivo.

Aclimatación del cultivo

Para preparar el inóculo (**Figura 11**), se partió de un cultivo en fase exponencial del cepario al cual se le adicionó diariamente medio de cultivo, durante siete días, para mantener un cultivo a baja densidad, sincronizado y aclimatado. El cultivo fue mantenido en condiciones controladas a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a $30\text{ }\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con ciclos de luz-oscuridad de 14:10 horas y aireación constante con aire húmedo estéril. Posteriormente, se le adicionó medio BG11, según lo mostrado en **Tabla 2**, para alcanzar la densidad establecida para el inicio de la curva, estableciendo así, el tiempo inicial cero (T_0).

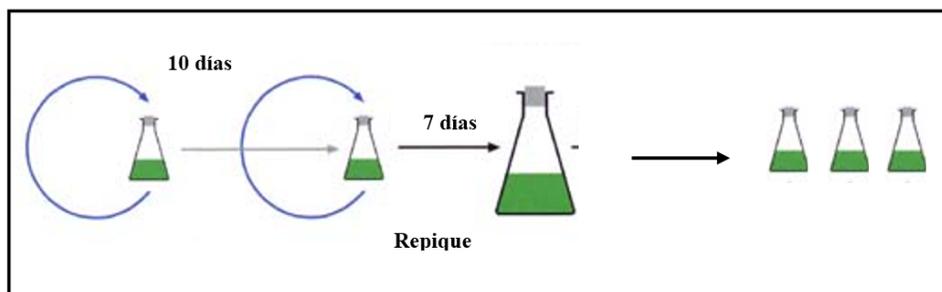


Figura 11. Esquema de preparación del inóculo inicial de las curvas de crecimiento de *M. aeruginosa*.

Cada curva de crecimiento tuvo un inóculo inicial entre $9 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ cél.mL⁻¹ (D.O._{740nm} \approx 0,1), que coincide con observaciones de campo (Echenique y col., 2003; Echenique y col., 2006; Andrinolo y col., 2007; Giannuzzi y col., 2012; Crettaz-Minaglia y Bordet, 2013).

Diseño experimental de la cinética de crecimiento y la producción de microcistina-LR

Todos los ensayos fueron realizados en cámara de cultivo Ingelab que permitió controlar las condiciones de irradiación y temperatura. Los ensayos fueron realizados por duplicado con volúmenes iniciales de 300 mL de cultivo cada uno. Este volumen de ensayo fue seleccionado de modo de garantizar una extracción de muestras menor al 10% del volumen total.

Inicialmente, se ensayó el crecimiento y la producción de MC-LR de *M. aeruginosa* a cuatro temperaturas constantes en medio BG11 modificado con una relación N:P=10, reportada como la óptima (Oh y Rhee, 1991). Se utilizó una irradiación constante de $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, reportada como baja según Amé y Wunderlin (2005) con ciclo luz:oscuridad 14:10 horas en cámara de cultivo IngeLab y aireación constante con aire húmedo estéril. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre los parámetros de crecimiento, producción de clo-a y MC-LR, se estudiaron 4 niveles de temperaturas (26, 28, 30 y 35°C \pm 1°C), las cuales son frecuentes en el agua durante los florecimientos de cianobacterias y han sido reportadas por Andrinolo y col. (2007), Giannuzzi y col. (2012) y Crettaz-Minaglia y Bordet (2013), siendo el resto de las condiciones óptimas para el crecimiento (N:P 10 y $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Por otro lado, la utilización de temperaturas constantes como isotermas, se vinculan a la poca variación durante un ciclo diario (día y noche), medido previamente (datos no mostrados).

Posteriormente, se realizó un diseño experimental tipo factorial, que consistió en combinaciones de las condiciones y recursos siguientes: temperatura (°C), intensidad de irradiación y relación N:P. Estos

fueron seleccionados en función de la importancia que tienen ante florecimientos de cianobacterias (Hyenstrand y col., 1998) en el período estival.

Se utilizaron tres niveles de temperatura constante 26, 30 y 36 °C \pm 1°C abarcando el rango frecuente observado durante los florecimientos de cianobacterias estivales. Tres niveles de irradiación 30, 50 y 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mediante el empleo de luz blanca fluorescente fría con ciclo luz:oscuridad 14:10 y aireación constante con aire húmedo estéril. El rango de irradiación ha sido reportado como un rango frecuente en ambientes naturales durante florecimientos de cianobacterias (Utkilen y Gjølme, 1992; Rapala y col., 1997). El medio de cultivo BG11 fue modificado en su composición inicial de nutrientes variando las concentraciones de NaNO_3 y K_2HPO_4 que permitieron trabajar en tres niveles de relación N:P 10, 100 y 150. Estos fueron seleccionados, de acuerdo a la relación de Redfield: 1 nivel con exceso de P (N:P 10) y 2 niveles con deficiencia de P (N:P 100 y 150). Estas relaciones han sido halladas durante el desarrollo de cianobacterias por diversos autores (Oh y Rhee, 1991, Schreurs, 1992, Vézie y col., 2002; Morales y col., 2017).

De las posibles combinaciones de los factores: 3 niveles de temperatura, 3 niveles de N:P y 3 niveles de irradiancia, se realizaron un total de 27 curvas de crecimiento.

Determinaciones en el estudio cinético de los cultivos

En forma periódica, durante 15-20 días, se tomaron muestras por duplicado del cultivo de modo de abarcar las fases de latencia, exponencial y estacionaria y se realizaron las siguientes determinaciones: determinación de la densidad óptica, recuento celular, determinación de clo-a y determinación de MC-LR.

Determinación de la densidad óptica

La densidad óptica del cultivo, que permite estimar la biomasa celular, se midió colocando 1 mL de cultivo en una cubeta plástica de paso de luz de 1 cm, en espectrofotómetro Metrolab 330, a 740 nm (Lyck, 2004).

Recuento celular

Para el recuento celular, se utilizó el método directo de cuantificación en microscopio óptico con cámara de Neubauer, recomendado para contar células pequeñas de cultivos (Villafañe y Reid, 1995). Se tomaron diferentes volúmenes de muestra (100-500 μL) por duplicado dependiendo de la densidad del cultivo y fueron conservados con solución de formol (4%). Las muestras fueron tratadas, durante 30 minutos, a una temperatura de 80°C con un baño térmico y agitadas por 30 segundos con agitador vortex para disgregar las células (Box, 1981). Cuando las muestras se enfriaron, se realizaron diluciones apropiadas según la densidad celular y se les colocó solución de lugol (2%) para facilitar su observación y sedimentación. Posteriormente, la muestra fue homogeneizada y se colocó una alícuota de la muestra en una cámara con grilla Neubauer de volumen de 0,0001 mL, se cubrió con un cubreobjetos y se dejó sedimentar durante 15 minutos aproximadamente. El conteo de células se realizó siguiendo los criterios estadísticos reunidos por Venrick (1995). De este modo, la muestra fue observada con un microscopio óptico Olympus® con un aumento de 400X y se contaron las células contenidas en la cámara hasta contar un número mínimo de 100 células. Para el cálculo del número de células se utilizó la **Ecuación 7** y los resultados se expresaron en cél.mL^{-1} . El valor fue corregido de acuerdo a un segundo factor de dilución que surge de la adición del conservante de las muestras.

$$[\text{N}^{\circ}\text{células}] = \left(\frac{(\text{N}^{\circ}\text{células contadas} \cdot \text{factor de dilución})}{0,0001\text{mL}} \right) \quad \text{Ec. 7}$$

Determinación de clorofila-a

Se tomaron volúmenes variables para determinar clo-a (100-500 μL) por duplicado. Esta fue determinada con espectrofotómetro Metrolab 330, posteriormente a una extracción con metanol al 100%, a longitudes de onda de 665 y 750 nm, antes y después de acidificar con ácido clorhídrico (HCl) 1N, según la técnica de Marker y col. (1980). El cálculo se realizó con la **Ecuación 8**. Los resultados expresan la concentración de clo-a fotosintéticamente activa, es decir, con descuento de feopigmentos y fue expresada en $\mu\text{g.L}^{-1}$.

$$[\text{Clo} - a] = 2,72 * [(\text{Absa}665\text{nm} - \text{Absa}750\text{nm}) - (\text{Absb}665\text{nm} - \text{Absb}750\text{nm})] * 11,62 * \left(\frac{\text{vol.E}}{\text{vol.M}}\right) \quad \text{Ec. 8}$$

En dónde **Absa** es la absorbancia antes de acidificar; **Absb** es la absorbancia después de acidificar; **Vol.E** es el volumen del extracto de metanol (en mL) y **Vol.M** es el volumen de la muestra (en L).

Determinación de microcistina-LR

Existen diversos métodos para determinar MCs, entre ellos, pueden mencionarse los métodos *screening* (que detectan la presencia o ausencia) que incluyen a los métodos biológicos y bioensayos (Perez y col., 2008) como el ensayo ratón (McElhiney y Lawton, 2005), bioensayo en organismos acuáticos (*Daphnia*, *Artemia*) (Kyselkova y Maršálek, 2000), ensayos en hepatocitos (Fladmark y col., 1998), inhibición de la proteína fosfatasa (Heresztyn y Nicholson, 2001) ELISA y ensayos con bacterias luminiscentes (Microtox) (Lawton y col., 1990). Además, los métodos físico-químicos (Perez y col., 2008) que permiten cuantificar las MCs basados en el equipo HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, por sus siglas en inglés) que puede tener diversos detectores como el ultravioleta y espectro de masa (Perez y Aga, 2005).

Para cuantificar la toxina de las curvas de crecimiento producidas por *M. aeruginosa*, se utilizó un HPLC/MS que permite identificar y cuantificar el principal componente de la MC que la cepa produce de modo mayoritario denominada MC [D-Leu¹]-LR (Qi y col., 2015). Este equipo permite obtener información estructural debido a que cada toxina produce iones característicos de su espectro de masa y detectarlas en concentraciones pequeñas (límite de detección 0,05 ppb y límite de cuantificación 0,10 ppb). Este método fue seleccionado para cuantificar la producción de MC de los ensayos de las curvas de crecimiento por los niveles de producción de MC [D-Leu¹]-LR de la cepa (del orden de ppb) y por el volumen relativamente pequeño necesario para esta determinación.

El equipo utilizado fue un HPLC/MS con un solo sistema de simple cuadrupolo (Shimadzu LCMS-2020) propiedad de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia de Química ubicado en el Partido de San Martín.

Se sonicó 1 mL de cultivo por duplicado durante 30 minutos (Omni Ruptor 400) y se centrifugaron por 15 minutos a 5000 rpm/min a 4°C. El sobrenadante fue pasado por cartuchos Sep-Pak C-18 (Waters), previo acondicionamiento (10 mL 100% metanol, 50 mL 100% agua destilada), y las MCs fueron eluidas en metanol al 80% a un volumen final de 0,5 mL (Barco y col., 2005). De acuerdo a como se mencionó antes, las MCs se cuantificaron con HPLC/MS Shimadzu LCMS-2020 determinando el principal componente de las MCs (m/z 520) usando una columna C18 (Hyperprep HS, 5- μ m poro, 250 mm 10 mm) (Giannuzzi y col., 2016).

Para la fase móvil se utilizó agua grado Milli-Q, ácido fórmico (96%, grado HPLC, Tedia, EE.UU.) y acetonitrilo (grado LC-MS, Tedia, EE.UU.). Se utilizaron 2 soluciones: solución A [agua + 12,7 de ácido fórmico] y solución B [acetonitrilo + 12,7 mM de ácido fórmico]. Las condiciones iniciales fueron 30% solución B, luego un gradiente lineal de 70% de solución B por 12 minutos, elución isocrática con 70% de solución B por 3 minutos y, finalmente, un gradiente lineal de 30% de solución B durante 5 minutos (tiempo de corrida total: 20 minutos). El flujo fue de 1,0 mL.min⁻¹ con una división de flujo antes de la entrada al ESI (0,2 mL.min⁻¹ al ESI-MS). La separación de MCs (50 μ L de volumen de muestra de inyección) fue realizada por cromatografía de fase inversa en C18. La columna analítica (150 x 4,6 mm) fue empaquetada con 5 μ m (Thermo) y mantenida a 25 °C. Se utilizó un patrón estándar de MC-LR de Sigma (St Louis, MO, USA) y se realizó una curva de calibración de 1-20 ppb.

Modelado matemático de los datos experimentales

Estimación de los parámetros cinéticos de la curva de crecimiento de *M. aeruginosa*

El número de cél.mL⁻¹ de *M. aeruginosa* fue modelado usando la ecuación de Gompertz modificada (**Ecuación 3**). La ecuación fue aplicada a los datos experimentales de los recuentos de *M. aeruginosa* por regresión no lineal usando el programa Systat (Systat Inc., versión 5.0). El programa presupone que los errores están normalmente distribuidos en la regresión no lineal. Esta distribución, se calcula mediante los valores de los residuos de la regresión (que corresponde a la resta entre los valores experimentales y los

valores predichos por el modelo). En la **Figura 12**, se observa que la distribución de los residuos se encuentra cercano a cero. Los residuos vs. los valores ajustados (**Figura 12**) muestran que el modelo de Gompertz permite describir satisfactoriamente los datos analizados.

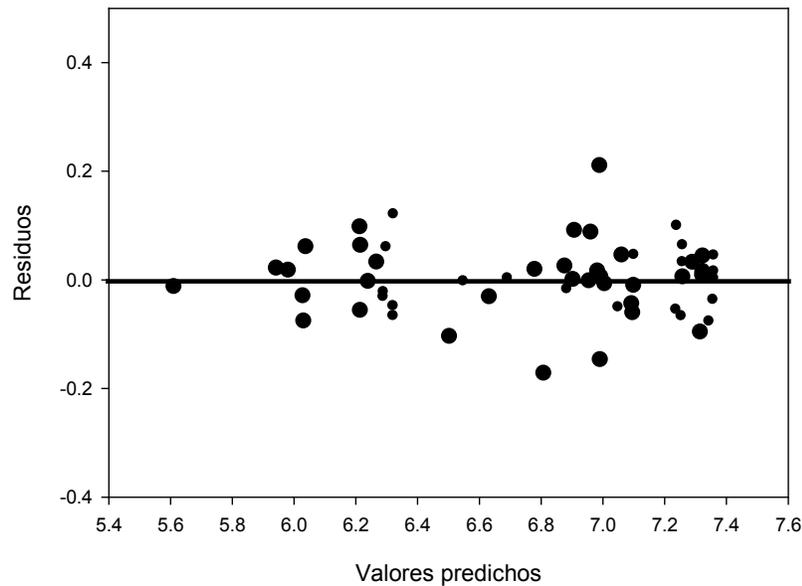


Figura 12. Distribución de los residuos al aplicar el modelo de Gompertz.

Además, se analizó la distribución de los errores en términos de los residuos. La **Figura 13** presenta la distribución de los residuos. En la misma **Figura 13**, se observa que los valores de los residuos (valores experimentales menos los valores predichos por el modelo de Gompertz) se encuentran normalmente distribuidos.

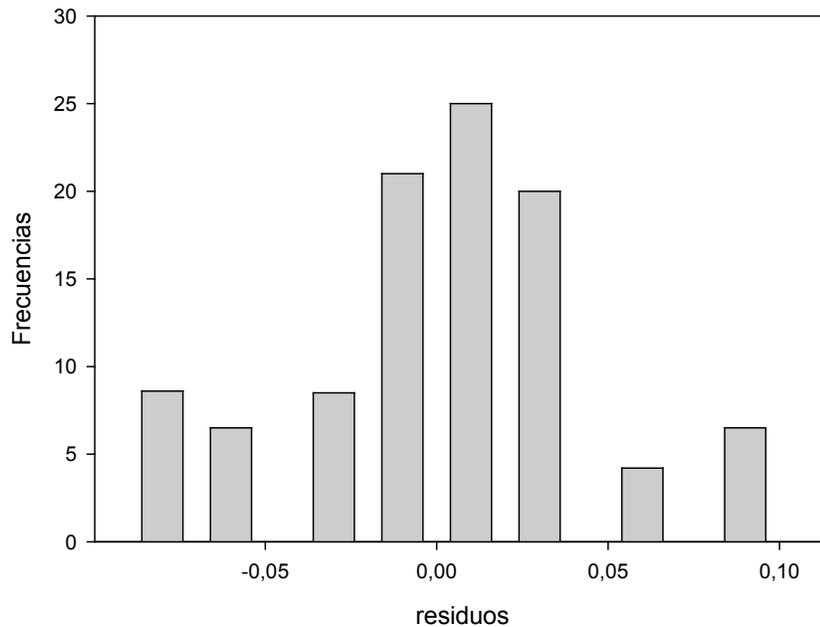


Figura 13. Distribución de los residuos obtenidos luego de aplicar el modelo de Gompertz a los datos experimentales.

Se evaluaron los parámetros velocidad de crecimiento (μ), la duración de la fase de latencia (LDP) y la máxima población (MPD) a partir de los 4 parámetros obtenidos del modelo de Gompertz (**Ecuación 3**).

Para evaluar la bondad de ajuste del modelo de Gompertz aplicado a la cinética de crecimiento, se utilizó el coeficiente de correlación R^2 y el error medio cuadrático (RMSE) definido por la **Ecuación 9**.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{datos experimentales}_i - \text{datos predichos}_i)^2}{n-k}} \quad \text{Ec. 9}$$

Dónde **datos experimentales_i** son los datos experimentales, **datos predichos_i** son los valores predichos por el modelo, **n** es el número de datos experimentales y **k** es el número de parámetros del modelo. Un

valor del RMSE pequeño, define la mejor adecuación del modelo para describir los datos (Snedecor y Cochran, 1969).

Efecto de la temperatura sobre la tasa específica de crecimiento y la duración de la fase de latencia

El efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de *M. aeruginosa* (μ y LPD), estimados de la ecuación de Gompertz modificada, fueron modelados usando dos funciones que describen su relación con la temperatura. Existen numerosos modelos secundarios que pueden aplicarse al crecimiento de los microorganismos como el modelo de Arrhenius, el modelo de la raíz cuadrada, los modelos de superficie de respuesta, los modelos probabilísticos y los modelos obtenidos mediante redes neuronales artificiales entre otros (Céspedes-Molina, 2012). Sin embargo, el modelo de Arrhenius es uno de los modelos más empleados (Buelvas-Salgado, 2013) ya que permite predecir el comportamiento de los microorganismos frente a los cambios de temperatura.

Ecuación de Arrhenius

La ecuación de Arrhenius es una expresión matemática que se utiliza para comprobar la dependencia de la temperatura con la constante de velocidad específica de crecimiento. Este modelo secundario fue utilizado para describir el efecto de la temperatura sobre μ y LPD obtenidos anteriormente a partir del modelo de Gompertz y permite calcular la energía de activación (E_a) de la cepa para ambos parámetros.

La energía de activación (E_μ) es considerada como la sensibilidad de la velocidad específica de crecimiento (μ) de *M. aeruginosa* a los cambios térmico y se refiere a la energía mínima que necesita un sistema antes de poder iniciar un determinado proceso. Esta se describe en la **Ecuación 10**.

$$\mu = A * \exp\left(\frac{-E_\mu}{RT}\right) \quad \text{Ec. 10}$$

Dónde **T** que es la temperatura absoluta (°K), **E_μ** es la energía de activación de μ (kJ.mol⁻¹) también llamada temperatura característica, **A** es el factor de frecuencia (o pre-exponencial) y **R** es la constante de los gases (8,31 kJ.°K⁻¹.mol⁻¹).

Para evaluar las energías de activación del parámetro μ en el rango 15-35°C, se utilizó la **Ecuación 11**.

$$\mu = k_1 * \exp\left(-\frac{E_{\mu_1}}{RT}\right) - k_2 * \exp\left(-\frac{E_{\mu_2}}{RT}\right) \quad \text{Ec. 11}$$

Dónde **T** que es la temperatura absoluta (°K), **E_{μ1}** y **E_{μ2}** son las energías de activación de μ en los diferentes rangos de temperatura (kJ.mol⁻¹) también llamada temperatura característica, **k₁** y **k₂** son las pendientes de cada segmento y **R** es la constante de los gases (8,31 kJ.°K⁻¹.mol⁻¹).

También se calculó la velocidad de adaptación como la recíproca de LPD (1/LPD) (Lee y Torres, 1993) que permite evaluar el efecto de la temperatura sobre los valores de LPD. Este parámetro refleja el período de adaptación de *M. aeruginosa* a su nuevo entorno y permite inferir cambios al modificarse la temperatura pudiendo ser considerada como la sensibilidad de la velocidad de adaptación a los cambios térmicos. Este parámetro se ajustó a un modelo de tipo Arrhenius según la **Ecuación 12**.

$$\frac{1}{\text{LPD}} = D * \exp\left(\frac{-E(1/\text{LPD})}{RT}\right) \quad \text{Ec. 12}$$

Dónde **1/LPD** es la velocidad de adaptación (día⁻¹), **T** es la temperatura en grados Kelvin (°K), **D** es el factor de frecuencia (o pre-exponencial) (día⁻¹), **E_(1/LPD)** es la energía de activación de 1/LPD (kJ.mol⁻¹) y **R** es la constante de los gases (8,31J.°K.mol⁻¹).

Para evaluar las energías de activación del parámetro LPD en el rango 15-35°C, se utilizó la **Ecuación 13**.

$$\frac{1}{LPD} = k_3 * \exp\left(-\frac{E_{LPD1}}{RT}\right) - k_4 * \exp\left(-\frac{E_{LPD2}}{RT}\right) \quad \text{Ec. 13}$$

Dónde **T** que es la temperatura absoluta (°K), **E_{LPD1}** y **E_{LPD2}** son las energías de activación de μ en los diferentes rangos de temperatura (kJ.mol⁻¹) también llamada temperatura característica, **k₁** y **k₂** son las pendientes de cada segmento y **R** es la constante de los gases (8,31 kJ.°K⁻¹.mol⁻¹).

Se determinó el coeficiente de temperatura (**Q₁₀**) que se define, como el factor de incremento de la velocidad de crecimiento cuando la temperatura se incrementa 10°C (**Ecuación 14**).

$$Q_{10} = \frac{\mu_1}{\mu_2} * \exp\left(\frac{10}{T_2 - T_1}\right) \quad \text{Ec. 14}$$

Dónde **T₁** y **T₂** son las temperaturas 25 y 35°C, respectivamente, y **μ_1** y **μ_2** son las velocidades específicas de crecimiento a las temperaturas mencionadas.

Modelo modificado de Ratkowsky

Este modelo permite describir la velocidad de crecimiento alrededor de las temperaturas óptima, mínima y máxima de crecimiento de una cepa particular. Zwietering y col. (1991) propusieron la ecuación modificada de Ratkowsky y col. (1983) (**Ecuación 15**):

$$\mu = (b * (T - T_{min}))^2 (1 - \exp(c * (T - T_{max}))) \quad \text{Ec. 15}$$

Dónde **b** es un parámetro de Ratkowsky (°C⁻¹ días⁻¹), **T_{min}** es la mínima temperatura a la que el crecimiento es observado (°C), **c** es un parámetro de Ratkowsky (°C⁻¹) y **T_{max}** es la máxima temperatura a la que el crecimiento es observado (°C).

De modo similar, para ajustar la fase de latencia a través de todo el rango de temperaturas se aplicó una transformación logarítmica. La variación de LPD con la temperatura se ajustó con la **Ecuación 16**.

$$\ln(\text{LPD}) = \frac{p}{T+q} \quad \text{Ec. 16}$$

El parámetro **q** es la temperatura a la cual LPD es infinito (sin crecimiento), T es la temperatura en °C y q es una constante.

Modelado de la producción de clorofila-a

La producción de clo-a fue modelada como una ecuación de primer orden (**Ecuación 17**).

$$\frac{dC}{dt} = (k_0) * C \quad \text{Ec. 17}$$

Donde (k_0) es la constante de la velocidad específica de pseudo-primer orden para clo-a (d^{-1}); C es la concentración de clo-a al tiempo (t); y t es el tiempo (días).

Integrando **Ec. 17**

$$\int \frac{dC}{C} = k_0 * \int t$$

$$\ln \left[\frac{C}{C_0} \right] = k_0 * t \quad \text{Ec. 18}$$

C_0 es la concentración inicial de clo-a ($mg.L^{-1}$).

Cuando los valores de clo-a duplican al valor inicial, el tiempo para alcanzar ese valor se denomina tiempo de duplicación de la concentración de clo-a (td_{clo-a}) y se calculó con la **Ecuación 19**.

$$td_{clo-a} = \frac{\ln 2}{k_0} \quad \text{Ec. 19}$$

Ecuación de Arrhenius

La ecuación de Arrhenius también puede ser aplicada a la producción de metabolitos de *M. aeruginosa* como es la clo-a. Entonces, para conocer los efectos de la temperatura sobre el valor de k_0 , se aplicó la ecuación de tipo Arrhenius (**Ecuación 20**).

$$k_0 = A * \exp\left(-\frac{E(k_0)}{RT}\right) \quad \text{Ec. 20}$$

Dónde **T** es la temperatura absoluta (°K), **E**_(k₀) es la energía de activación (kJ.mol⁻¹) de k_0 (día⁻¹), **A** es un factor de frecuencia (o pre-exponencial) y **R** es la constante de los gases (8,31 kJ.°K⁻¹ mol⁻¹).

Calculo del cuota (Q_{clo-a})

El parámetro cuota (Q_{clo-a}) se refiere a la cantidad de clo-a que produce cada célula de *M. aeruginosa*. Se obtiene del cociente entre la producción de clo-a y el número de células. Este parámetro permite interpretar las consecuencias de las variaciones de los parámetros sobre la producción de clo-a de cada célula, pudiéndose interpretar como una respuesta de tipo fisiológica de las células a las condiciones del medio.

Modelado de la producción de microcistina-LR

La producción de MCs fue evaluada utilizando la **Ecuación 6** propuesto por Jähnichen y col. (2001, 2008) aplicada a los datos experimentales de la producción de MCs y se vinculó al modelo de crecimiento celular de Gompertz (**Ecuación 3**) propuesto en esta Tesis Doctoral generando la **Ecuación 21**.

$$\frac{dX}{dt} = 10^{a+\exp\left(c*\exp\left(-\exp\left(-b*(t-m)\right)\right)\right)*c*\exp\left(-\exp\left(-b*(t-m)\right)\right)*-\exp\left(-b(t-m)\right)*(-b)*\ln(10)} \quad \text{Ec. 21}$$

En dónde $\mathbf{dX/dt}$ corresponde a la derivada del crecimiento de *M. aeruginosa* ajustada de la ecuación de Gompertz, es decir, debe derivarse la ecuación de Gompertz respecto al tiempo. \mathbf{a} , \mathbf{c} , \mathbf{b} and \mathbf{m} fueron ajustados a los datos experimentales de curvas de crecimiento luego de aplicar la ecuación de Gompertz a los recuentos celulares.

Las ecuaciones fueron resueltas numéricamente usando un método de cuarto orden Runge-Kutta. El coeficiente p (fg.cél⁻¹), la tasa de depleción d_m (días⁻¹) y la producción de [D-Leu¹]-MC-LR (μg.L⁻¹) fueron determinados con el procedimiento de mínimos cuadrados usando regresión no lineal con el programa MATLAB (Mathworks Inc.).

Cálculo del cuota (Q_{clo-a} y Q_{MC})

Las concentraciones de MCs se expresaron de dos formas diferentes: en relación al número de células (Q_{MC} (fgMC.cel⁻¹) y en relación a la clo-a como Q_{clo-a} (fgMC.ngClo-a⁻¹) que es el cociente entre [D-Leu¹]-MC-LR y el número de células y la clo-a, respectivamente.

Modelo superficie-respuesta

Los modelos polinomiales o de superficie de respuesta son muy utilizados debido a su facilidad de uso, además que permite valorar múltiples factores ambientales y sus interacciones sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de los microorganismos y producción de metabolitos. (Sun, 2012, Buelvas-Salgado, 2013).

Para evaluar los efectos conjuntos de la temperatura, la irradiación y la relación N:P sobre los parámetros de crecimiento de *M. aeruginosa*, producción de clo-a y MC, se utilizó una ecuación de tipo superficie de respuesta con 3 factores y con interacciones completas (**Ecuación 22**).

$$y(x) = \beta_0 + \sum_{i=1}^m (\beta_i x_i) + \sum_{i=1}^m (\alpha_i x_i^2) + \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m (\gamma_{i,j} x_i x_j) + \nu \prod_{i=1}^m x_i \quad \text{Ec. 22}$$

En dónde \mathbf{a} y $\mathbf{\beta}$ son constantes, $\mathbf{m}=3$; \mathbf{x}_1 =temperatura; \mathbf{x}_2 =relación N:P y \mathbf{x}_3 =irradiación. Esta ecuación fue aplicada a los parámetros derivados de crecimiento, producción de clo-a y MCs.

Toma de muestras ambientales para aislamiento del ensamble de microorganismos heterótrofos con potencial remoción de MC-LR

Para la obtención de microorganismos con potencial de remoción de MCs, se tomó una muestra de agua en el Río de la Plata, en la toma de agua de Ensenada (Buenos Aires) ($34^{\circ} 49'58,7''$ S – $57^{\circ} 56'54,1''$ O) (**Figura 14**) durante un florecimiento de *Microcystis* sp., registrado el día 10/01/2014; utilizando una red de fitoplancton de apertura de malla de $25\mu\text{m}$ que fue arrastrada por la superficie del agua. En esta zona, los florecimientos cianobacterianos se han observado periódicamente (Andrinolo y col., 2007; Giannuzzi y col., 2012). El florecimiento fue caracterizado a través de la observación del mismo *in vivo* y con tinción de lugol al 2% en microscopio óptico Olympus y se midieron *in situ* temperatura, pH, oxígeno disuelto (O.D.) y conductividad eléctrica (C.E.) con equipo multiparamétrico.

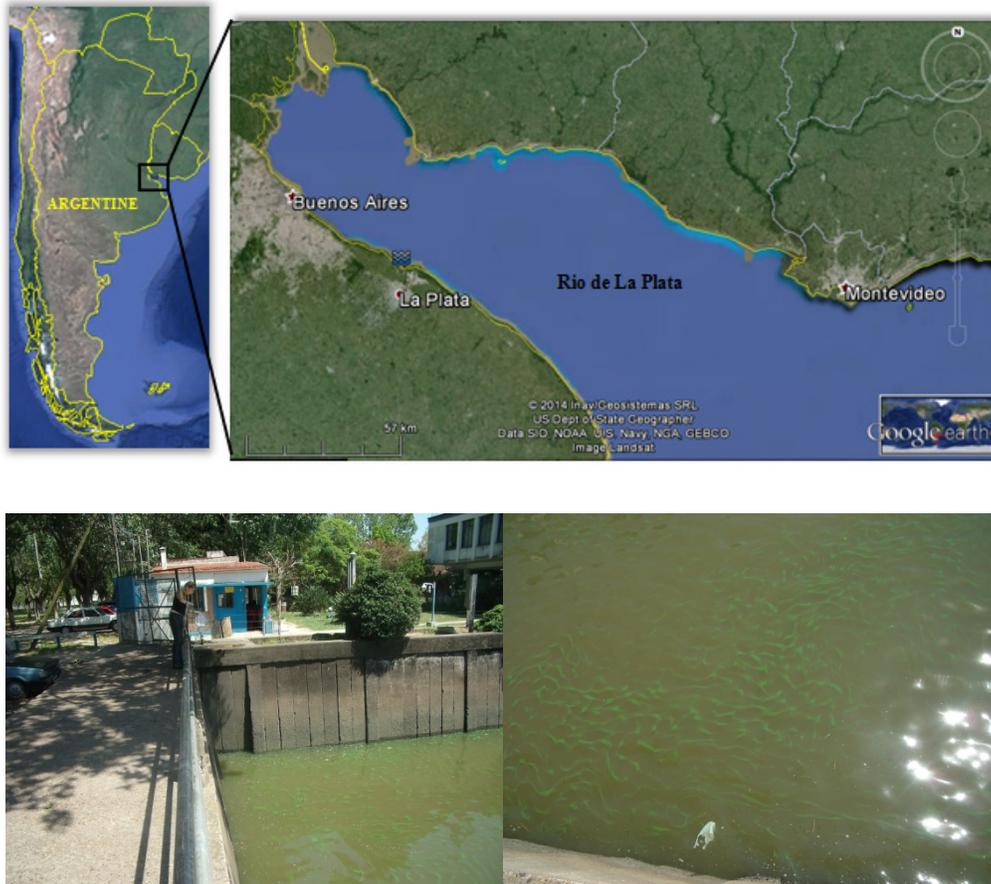


Figura 14. Área de colecta de muestras del florecimiento de *M. aeruginosa* del día 10/01/2014.

Aclimatación y aislamiento de bacterias con potencial de remoción de microcistina-LR

La aclimatación y el aislamiento de los microorganismos (**Figura 15**), se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Amé y col. (2006). Se utilizó un medio mínimo de sales (MSM) ajustado a pH 7,0 esterilizado al cual se le adicionó MC [D-Leu¹]- LR a una concentración 200 µg.L⁻¹ (**Tabla 3**). La toxina empleada fue obtenida del cultivo de *M. aeruginosa* (ver apartado **Extracción de microcistina [D-Leu¹]- LR**). Al extracto de toxina obtenido, se le eliminaron las bacterias acompañantes mediante filtración con filtro de acetato 0,22 µm.

La aclimatación consistió en un período en el cual se realizaron sucesivos repiques a partir de la muestra directa del florecimiento de cianobacterias en medio MSM suplementado con toxina. Esto genera que los microorganismos comiencen a aclimatarse a las condiciones del cultivo. Se inició este período colocando 20 mL de la muestra del río con 80 mL de medio de cultivo MSM e incubando a 32°C y en oscuridad y sin agitación. Cada 20 días, aproximadamente, se tomaron 20 mL del cultivo aclimatado y se adicionaron 80 mL de medio de cultivo MSM suplementado con 200 µg.L⁻¹ MC [D-Leu¹]- LR y se lo mantuvo a las mismas condiciones. Este procedimiento se realizó 5 veces. El cultivo fue mantenido a temperatura controlada (32°C±1°C) en oscuridad y periódicamente se tomaron muestras para determinar concentración de MC [D-Leu¹]- LR. Posteriormente al período de aclimatación, los microorganismos del cultivo fueron aislados utilizando un ansa y placas de Petri con medio MSM agarizado suplementado con MC [D-Leu¹]- LR a una concentración de 200 µg.L⁻¹. Con el objeto de obtener colonias aisladas se empleó el método de aislamiento de colonia aislada mediante estrías en placa. Este es un procedimiento clásico para aislar cepas de bacterias. Las placas fueron incubadas 48 horas en estufa a 32°C y en oscuridad. De los crecimientos observados en las placas, se tomaron 10 colonias típicas diferentes en apariencia y color y fueron repicadas e incubadas en las mismas condiciones hasta obtener bacterias aisladas. A los microorganismos aislados, se les realizó la tinción de Gram y los preparados fueron observados al microscopio Olympus a 1000X para identificar la morfología de estos.

Tabla 3. Composición del medio MSM* para preparar 1 L.

Reactivos MSM (Vf=1000mL)	Cantidad (mg)
Sulfato de magnesio monohidratado	112

Sulfato de zinc monohidratado	5,00
Molibdato de sodio dihidratado	2,50
Potasio fosfato monobásico	340
Sodio fosfato monobásico heptahidratado	670
Cloruro de calcio	14,0
Cloruro férrico	0,13
MC [D-Leu ¹]- LR	0,20

*Para la preparación del medio se utilizó agua destilada. El medio se preparó, ajustando el pH 7 y luego fue autoclavado. Al momento de utilizar se agregó MC [D-Leu¹]- LR en la concentración establecida (200 µg.L⁻¹). El medio agarizado se prepara mediante la adición de 15 g de agar-agar por litro de medio.

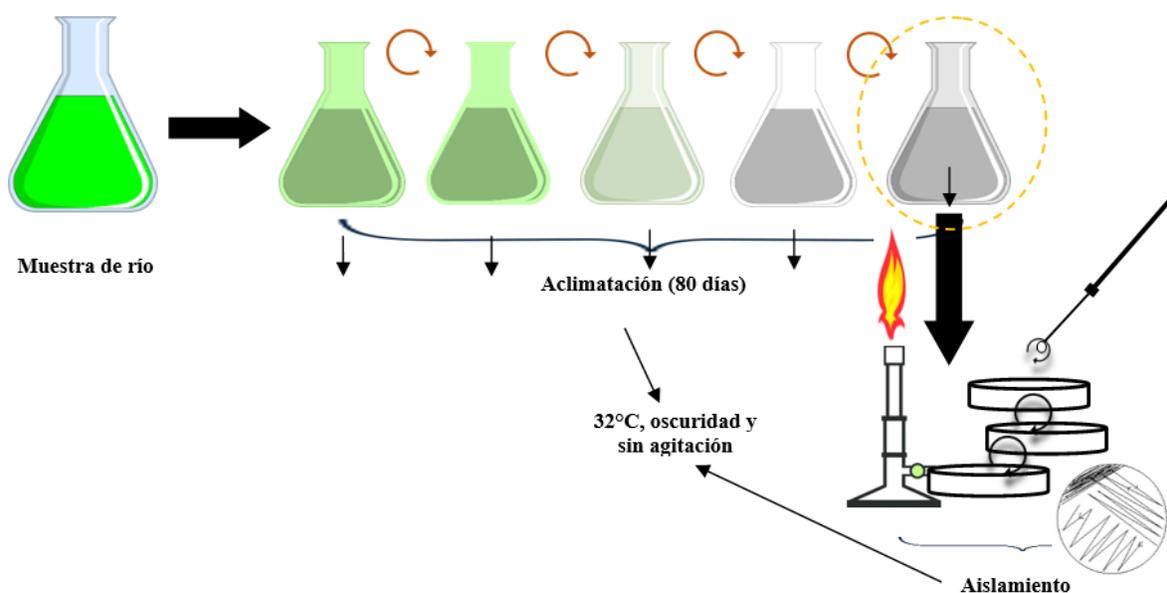


Figura 15. Esquema del procedimiento de aclimatación y aislamiento de microorganismos con potencial de remover MC [D-Leu¹]- LR provenientes de un florecimiento de cianobacterias del río de La Plata. Las flechas punteadas indican el repique de MC [D-Leu¹]- LR y las flechas llenas

indican toma de muestra de cultivo para realizar la determinación de MC [D-Leu¹]- LR. En cada repique, se utilizó medio MSM suplementado con 200 µg.L⁻¹ de MC [D-Leu¹]- LR.

Extracción de microcistina [D-Leu¹]- LR

Con el fin de obtener un extracto o stock de MC [D-Leu¹]- LR para ser utilizada en los ensayos de remoción, se utilizó 1L de cultivo de *M. aeruginosa* (CAAT-03-2005) en fase exponencial de crecimiento, y se siguió la metodología descrita por Andrinolo y col. (2009). Las células de la cepa se rompieron para liberar la cianotoxina intracelular utilizando ultrasonido durante 3 ciclos de 30 minutos (Omni Ruptor 400) en baño de hielo y, luego, se centrifugaron por 15 minutos a 5000 rpm/min a 4°C. El sobrenadante fue pasado por cartuchos Sep-Pak C-18 (Waters), previo acondicionamiento (10 mL 100% metanol, 50 mL 100% agua destilada), y las MCs fueron eluidas en metanol al 80% a un volumen final de 150 mL (Barco y col., 2005). El extracto metanólico obtenido fue evaporado a 65°C para concentrarlo en un rotavapor y se incorporó un volumen conocido de agua bidestilada. Esto permite eliminar únicamente el metanol por evaporación y contener la MC [D-Leu¹]- LR en agua para evitar que el solvente afecte posteriormente en los microorganismos. De este proceso se obtuvieron 50 mL de extracto de MC [D-Leu¹]- LR en solución acuosa.

Como se mencionó en el apartado Determinación de microcistinas, existen diversos métodos para cuantificar las MCs. A los fines de cuantificar un extracto concentrado proveniente de un cultivo de *M. aeruginosa*, que presenta altas concentraciones de MC [D-Leu¹]- LR (del orden de ppm), fue cuantificado en un HPLC-UV ($\lambda = 238$ nm) con arreglo de diodos. El detector UV solo tiene el inconveniente de ser poco selectivo y sensitivo, por eso, el detector con arreglo de diodos no solo responde a la absorción UV sino que también al espectro típico de las MCs permitiendo distinguir entre espectros relacionados. Su límite de detección es de 1 ppm y el de límite de cuantificación es de 2 ppm.

El equipo utilizado fue un HPLC-UV (Shimadzu 2010) con una columna C18 Hyperprep HS, 5 µm de poro, 250 mm x10 mm). La columna se equilibró con una mezcla compuesta por 65% de solución A [agua con 0,05% (v /v) ácido trifluoroacético] y 35% de solución B [acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,05% (v / v)]. La fase móvil consistía en un gradiente discontinuo de soluciones A y

B. El caudal fue de 3,0 mL.min⁻¹. La toxina se identificó en la en base a su espectro UV y tiempo de retención. Se utilizó un estándar de MC-LR de Sigma (St Louis, MO, EE.UU.).

Ensayo de remoción de microcistina-LR

Se realizó un ensayo de remoción (**Figura 16**) por duplicado para identificar los microorganismos con capacidad de remover MCs. Cada bacteria aislada fue incubada en caldo nutritivo durante 12 horas (*overnight*) para obtener un cultivo en fase exponencial a una concentración aproximada de 10⁹ UFC.mL⁻¹. El ensayo de remoción se realizó en tubos de ensayo agregando 9 mL de MSM conteniendo MC [D-Leu¹]-LR a una concentración final de 200 µg.L⁻¹ y 1 mL del cultivo de microorganismo crecida con una dilución seriada 1/100 en buffer fosfato de modo tal de obtener una concentración de 10⁶ UFC.mL⁻¹ como inóculo inicial. Además, se realizó un control en idénticas condiciones sin la adición de microorganismos. Se tomaron muestras para determinar la concentración de MC [D-Leu¹]-LR totales a los días 0 y 7 mediante HPLC/MS Shimadzu LCMS-2020 (ver apartado Determinación de microcistinas).

Para todos los procedimientos antes mencionados, se utilizó medio de cultivo y materiales esterilizados mediante autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

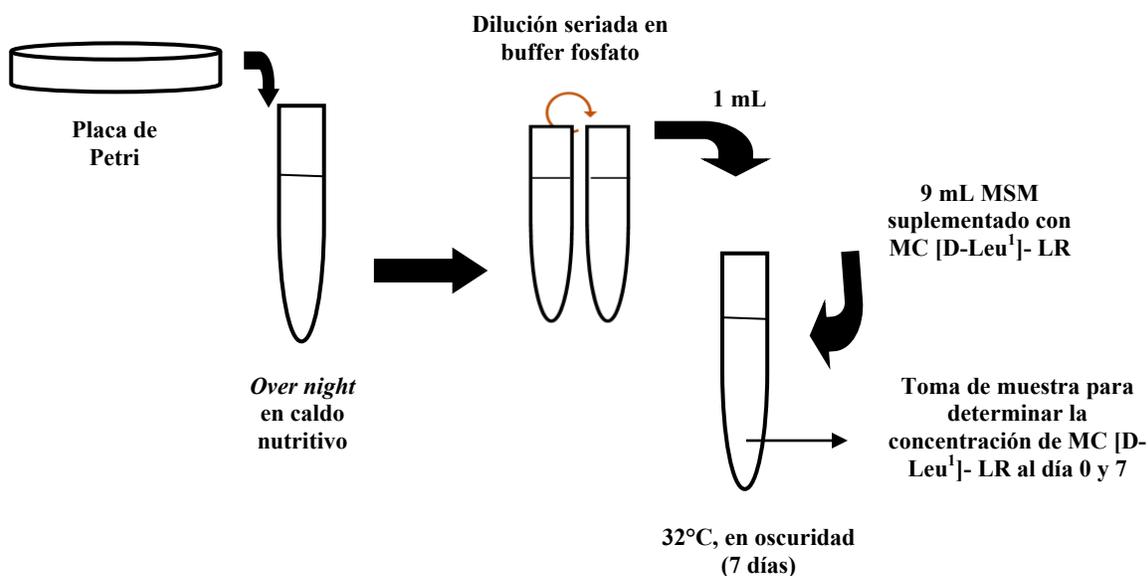


Figura 16. Esquema del ensayo de remoción de MC [D-Leu¹]- LR a través de microorganismos.

Los datos de remoción de MCs obtenidos fueron analizados utilizando el programa Systat (Systat Inc., versión 5.0); el ajuste se realizó para cada experimento realizado y recopilado de la literatura con regresión lineal previa normalización de la concentración de MC-LR (**Ecuación 23**).

$$\ln \frac{C}{C_0} = -k_{MC} \times t \quad \text{Ec. 23}$$

En dónde C_0 es la concentración inicial de toxina y C a los diferentes tiempos, k_{MC} es una constante de remoción de MC-LR y t el tiempo.

Se definió el tiempo de remoción medio (**trm**) como el tiempo necesario para reducir la concentración de MC la mitad respecto de su concentración inicial (**Ecuación 24**) asumiendo que la degradación de MC por microorganismos sigue una relación lineal; el trm fue calculado para los microorganismos aislados del río de La Plata y para datos bibliográficos posibilitando, de este modo, la comparación entre microorganismos.

$$tm = \frac{\ln 2}{k_{MC}} \quad \text{Ec. 24}$$

Dónde $\ln 2$ es el logaritmo natural de 2 y k_{MC} es la pendiente de la curva de remoción de MC obtenida por regresión lineal.

Identificación

Se identificó la bacteria con mayor capacidad de remover MC [D-Leu¹]- LR. Se tomó la bacteria aislada corroborando mediante tinción de Gram y observación microscópica que se trataba de un cultivo puro y se hizo crecer en caldo triptona soja durante 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad. Luego, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasa, prueba de citrato, movilidad, reducción de nitratos, oxidación de glucosa, manitol, xilosa, ONPG, indol, ureasa y Voges Proskauer (Diaz y col., 1995; MacFaddin, 2003; Koneman y col., 2008).

Posteriormente, la bacteria fue enviada al Laboratorio de Microbiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Partido de San Martín en donde fue purificada y fue aislado el ADN con el kit comercial Invitex® y el gen 16S rRNA fue amplificado y secuenciado por MacroGen Korea usando los primers 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). La secuencia obtenida fue comparada con las secuencias del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI por sus siglas en inglés) y se comparó con las diferentes secuencias de nucleótido presentes en la base de datos usando el algoritmo BLASTN (Altschul y col., 1997).

Análisis estadístico

Para todos los ensayos, la bondad de ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2). Además, se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía previo ajuste estadístico requerido (distribución normal y homogeneidad de la varianza) y el test de comparación de pares de Tukey con nivel de significación de 0,05 y 0,001 empleando el programa Systat (Systat Inc., versión 5.0).

El ajuste de los datos se realizó para cada experimento del diseño factorial por regresión no lineal, minimizando la suma de los cuadrados de las desviaciones entre los valores experimentales y predichos. Se realizaron correlaciones lineales (r) entre los parámetros de las curvas de crecimiento, producción de clo-a y MC y los factores estudiados (temperatura, relación N:P e irradiación).

Resultados y discusión

Efecto de la temperatura de incubación sobre la cinética de crecimiento, la producción de clorofila-a y de microcistina-LR en un cultivo de *M. aeruginosa*

Efecto de la temperatura de incubación en la cinética de crecimiento de *M. aeruginosa*

Se evaluó el efecto de diferentes temperaturas (26, 28, 30 y 35°C) sobre el número de células en un cultivo de *M. aeruginosa* que se encontraba en condiciones de irradiación y nutrientes óptimas.

La evaluación de los recuentos de células en función del tiempo permitió estudiar la cinética de crecimiento bajo diferentes temperaturas. Pudo observarse que la cinética de crecimiento mostró una

curva sigmoidea característica y, durante los experimentos, el número de células se incrementó exponencialmente luego de la fase lag. El número de células iniciales estuvo comprendido entre $9 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^6$ cél.mL⁻¹ y alcanzó, al finalizar el estudio, niveles de 10^7 cél.mL⁻¹. Este rango de valores de recuentos celulares ha sido hallado en los florecimientos de *M. aeruginosa* en ambientes naturales (Echenique y col., 2003; Echenique y col., 2006; Andrinolo y col., 2007; Giannuzzi y col., 2012; Crettaz-Minaglia y Bordet, 2013).

En la **Figura 17**, se presentan los datos experimentales de los recuentos de *M. aeruginosa* durante su crecimiento a las temperaturas 26, 28, 30 y 35°C. Puede observarse que, al aumentar la temperatura, *M. aeruginosa* crecen más rápidamente. En la misma figura se han incluido con líneas llenas la aplicación del modelado matemático de Gompertz. También, se han incluido datos de Jähnichen y col. (2011) y Bortoli y col. (2014) correspondientes al crecimiento de *M. aeruginosa*, bajo condiciones similares, a 15°C y 25°C, respectivamente para ampliar el rango de temperaturas de estudio. Se obtuvo un buen ajuste ($R^2=0,99$) entre los datos experimentales y los predichos (**Figura 18**).

La **Tabla 4** presenta los valores calculados arrojados por el ajuste a la ecuación de Gompertz (**Ecuación 3**) (a, b, c y m), los valores derivados que corresponden a los parámetros cinéticos: velocidad de crecimiento (μ), duración de la fase de latencia (LPD) y máxima población (MPD) así como los valores de R^2 y RMSE para cada temperatura estudiada. Puede observarse que los valores de R^2 variaron entre 0,981 – 0,997 y los de RMSE fueron menores a 0,085 log (cél.mL⁻¹) lo que indica un buen ajuste entre los datos experimentales con el modelo propuesto. Se puede observar que los valores de LPD disminuyeron, así como los correspondientes a los de μ aumentaron al aumentar la temperatura. Es así que los valores de LPD disminuyeron 10,8 veces y los de μ aumentaron 4,8 veces al aumentar la temperatura de 15°C a 35°C.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para los valores de μ . La comparación de pares de Tukey indicó que los valores de μ a 15°C fueron significativamente diferentes de los de 28°C ($p=0,029$); 30°C ($p=0,003$) y 35°C ($p=0,009$). LPD fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) entre 15°C y las demás temperaturas ($p = 0,000-0,001$) y el valor de LPD a 35°C fue estadísticamente diferente de 25°C ($p=0,002$), 26°C ($p=0,002$), 28°C ($p=0,013$) y 30°C ($p=0,048$). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de MPD de las 6 temperaturas.

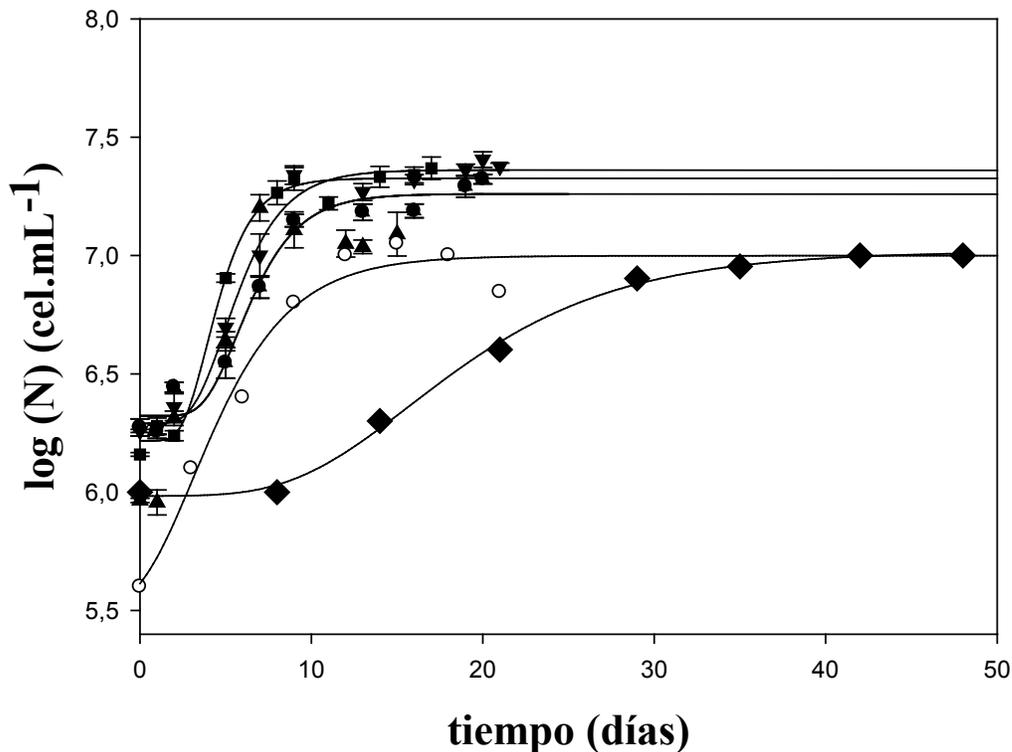


Figura 17. Modelado del crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz a ● 26°C, ▼28°C, ■ 30°C y ▲ 35°C. ◆ 15°C datos de Jähnichen y col. (2011), O 25°C datos de Bortoli y col. (2014). Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

Tabla 4: Parámetros de la ecuación de a, c, b, m y parámetros cinéticos derivados (μ , LPD y MPD) para el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en medio de cultivo a 26°C; 28°C; 30°C y 35°C. Se adicionaron los datos a 15°C de Jähnichen y col. (2011) y a 25°C de Bortoli y col. (2014).

T (°C)	a	b	c	m	μ (d ⁻¹)	LPD (d)	MPD (cél.mL ⁻¹)	R ²	RMSE
15	5,98±0,02	1,03±0,04	0,14±0,14	15,72±0,62	0,05±0,01 ^a	8,17±0,56 ^a	7,01±0,07 ^a	0,997	0,028
25	5,50±0,06	1,49±0,08	0,31±0,02	6,14±0,05	0,17±0,02 ^{a,b}	4,14±0,17 ^b	6,99±0,14 ^a	0,987	0,010
26	6,36±0,02	0,89±0,03	0,55±0,08	5,83±0,22	0,18±0,03 ^{a,b}	4,01±0,12 ^{b,c}	7,25±0,06 ^a	0,978	0,085
28	6,29±0,02	1,07±0,04	0,53±0,09	4,95±0,03	0,20±0,03 ^{a,b}	3,04±0,11 ^b	7,33±0,06 ^a	0,988	0,070
30	6,22±0,02	1,11±0,04	0,68±0,13	3,92±0,26	0,28±0,03 ^b	2,47±0,42 ^{b,c}	7,33±0,06 ^a	0,991	0,085
35	5,92±0,00	1,18±0,10	0,53±0,11	2,64±0,43	0,24±0,01 ^b	0,75±0,04 ^c	7,10±0,11 ^a	0,981	0,082

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

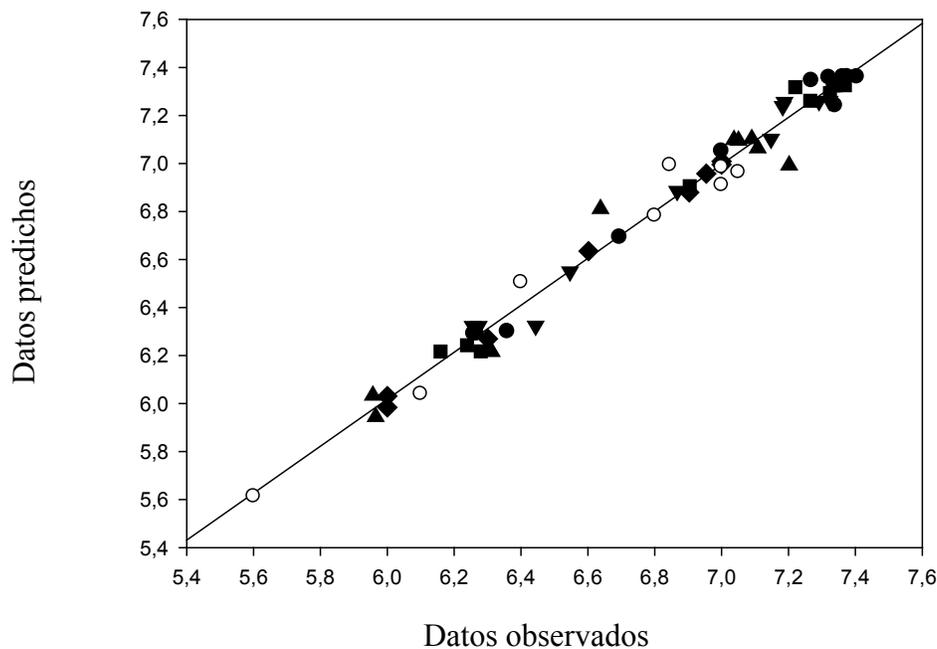


Figura 18. Correlación entre los datos experimentales y los valores predichos correspondientes a cél.mL^{-1} de *M. aeruginosa*. Los datos estimados fueron obtenidos de la aplicación de la Ecuación 3 para el crecimiento de *M. aeruginosa* a ● 26°C, ▼28°C, ■30°C, ▲35°C, ◆ 15°C (datos de Jähnichen y col., 2011), ○ 25°C (datos de Bortoli y col., 2014).

Los valores de μ obtenidos en el presente trabajo doctoral se correspondieron con los informados por Gorham (1964) para la temperatura óptima de crecimiento (30°C - 35°C). Watanabe y Oishi (1985) observaron mayores μ en *M. aeruginosa* a mayor temperatura (rango 18-32°C). Lick (2004) informó valores de μ entre 0,52 a 0,54 día^{-1} para *M. aeruginosa* NIVA - CYA 228/1 en medio O² modificado a 20°C. Por su parte, Imai y col. (2009) hallaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de *M. aeruginosa* ($p < 0,05$) entre 20°C y 30°C, pero no entre las velocidades de crecimiento a 25°C y 30°C, o entre 30°C y 35°C en medio MA modificado. Estos resultados corresponden a la velocidad específica de crecimiento (día^{-1}) entre sucesivos tiempos de muestreo y fueron calculadas aplicando un modelo lineal al número de células (cél.mL^{-1}).

Efecto de la temperatura de crecimiento de *M. aeruginosa* sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la fase de latencia (LPD)

Ecuación de Arrhenius

Se evaluó la dependencia de los valores de $\ln(\mu)$ en el rango de temperatura estudiado (15-35°C) (**Ecuación 11**) mediante un modelo lineal de dos segmentos que convergen en una temperatura crítica a aproximadamente 28°C, encontrándose un buen ajuste entre los datos y los modelos propuestos (**Figura 19a**). Esta temperatura separa dos dominios lineales 15-28°C y 28-35°C. Las pendientes de estos segmentos determinan dos energías de activación E_{μ_1} y E_{μ_2} . En el dominio entre 15-28°C, E_{μ_2} fue de $83,08 \pm 0,9 \text{ kJmol}^{-1}$ con $R^2=0,999$; y en el dominio entre 28°C-35°C E_{μ_1} fue de $13,30 \pm 0,8 \text{ kJmol}^{-1}$ con un $R^2=0,995$ (**Tabla 5**). En el rango de 28-35°C, la temperatura característica fue de 6,3 veces más baja que el dominio de temperatura de 15-28°C con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Esto indicaría que, en el dominio de 28-35°C, *M. aeruginosa* sería menos sensible a los cambios térmicos y, en cambio, en el dominio de 15-28°C, sería más sensible por lo que pequeños cambios de temperatura afectan fuertemente en los valores de μ obtenidos.

De igual manera, cuando el logaritmo de los valores de $1/\text{LPD}$ fue graficado en función de la recíproca de la temperatura absoluta dos dominios lineales fueron encontrados (**Figura 19b**). Las pendientes de estos segmentos determinan dos energías de activación $E_{(1/\text{LPD}_1)}$ y $E_{(1/\text{LPD}_2)}$. En el dominio 15-28°C, $E_{(1/\text{LPD}_2)}$ fue de $50,32 \pm 0,19 \text{ kJmol}^{-1}$ con $R^2=0,989$ y en el dominio 28-35°C, el $E_{(1/\text{LPD}_1)}$ fue de $149,91 \pm 1,9 \text{ kJmol}^{-1}$ con un $R^2=0,998$ (**Ecuación 13**). Lo anterior indica que, en el dominio de temperaturas 15-28°C, la cepa presenta una menor sensibilidad frente a los cambios térmicos en la LPD y, en el dominio 28-35°C, una mayor sensibilidad con un nivel de significancia $p < 0,001$ (**Tabla 5**).

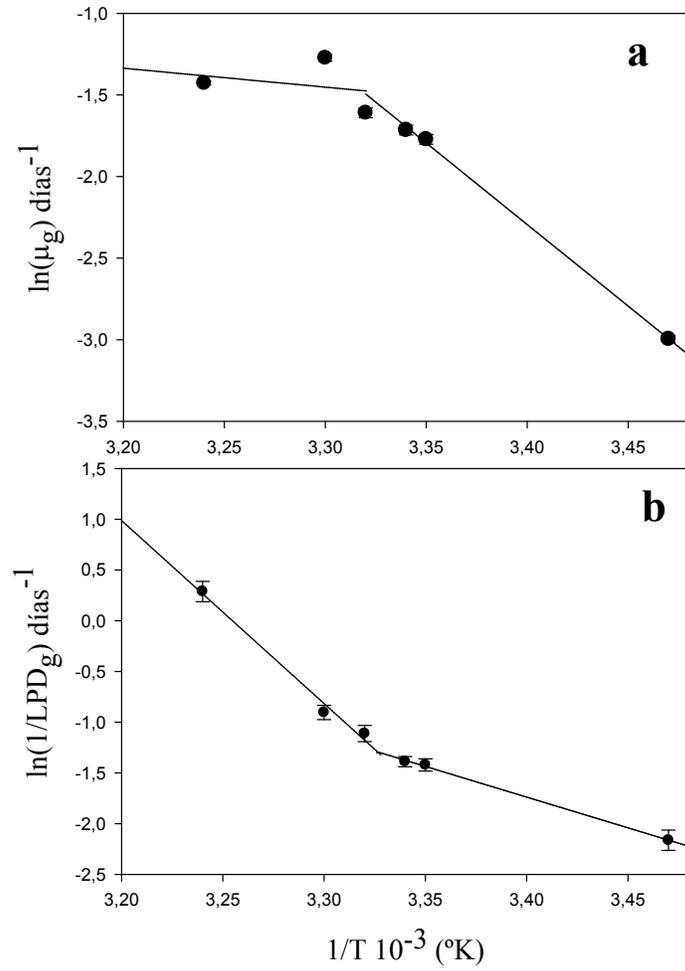


Figura 19: Gráfico de Arrhenius: a) μ y b) $1/LPD$ para *M. aeruginosa* en medio de cultivo

Tabla 5: Aplicación de ecuación tipo Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre μ y $1/LPD$.

$k_1 = 2,37 \pm 0,05 \text{ (día)}^{-1}$	$k_2 = 31,127 \pm 0,56 \text{ (día)}^{-1}$
$E_{(\mu 1)} = 13,30 \pm 0,81 \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$	$E_{(\mu 2)} = 83,08 \pm 0,9 \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$
$R^2 = 0,995$	$R^2 = 0,999$
$k_1 = 58,72 \pm 6,22 \text{ (día)}^{-1}$	$k_2 = -18,0 \pm 0,06 \text{ (día)}^{-1}$
$E_{(1/LPD)1} = 149,91 \pm 1,9 \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$	$E_{(1/LPD)2} = 50,32 \pm 0,19 \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$
$R^2 = 0,998$	$R^2 = 0,989$

Los valores de energías de activación de μ fueron mayores en el dominio de temperaturas más bajas y menores en el dominio de temperaturas más altas. Por el contrario, los valores de energías de activación de LPD fueron menores a temperaturas más bajas y mayores a temperaturas más altas. Esto indica que al evaluar los efectos de la temperatura sobre *M. aeruginosa* es fundamental tener en cuenta la fase de crecimiento que se está evaluando así como el rango de temperaturas.

Krüger y Eloff (1978) informaron valores de energía de activación para la velocidad de crecimiento para diferentes aislamientos de *M. aeruginosa*. Estos autores informaron valores mayores a temperaturas más bajas, coincidiendo con lo hallado en este trabajo, y establecieron una temperatura crítica de alrededor de 17,5°C. Bajo similares condiciones de temperatura de crecimiento (24-35°C) e intensidad de irradiación (33 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), hallaron rangos similares de energías de activación. Estos autores hallaron 3 puntos de cambio de pendiente a 14, 25 y 34°C, a diferencia de este trabajo, en donde fue hallado un solo punto a 28°C. Esto puede deberse a que los autores incluyeron mayor cantidad de temperaturas. Es posible que, ampliando el rango de temperaturas, se observen otros puntos de cambio de pendiente en el estudio de la cepa autóctona empleada en esta Tesis Doctoral.

Por otro lado, no hay información disponible en la bibliografía sobre la energía de activación para la fase de latencia (1/LPD) lo que indica un avance en el conocimiento en la caracterización de la cepa.

Los valores de Q_{10} (**Ecuación 14**) fueron de 0,29 y 0,71 para los rangos de 15-25°C y 25-35°C, respectivamente. Diversos autores hallaron valores de rango similar a los informados en la presente Tesis Doctoral. Krüger y Eloff (1978) para condiciones similares, hallaron $Q_{10}=2,6$ y 1,09 para los rangos 14-25°C y temperaturas mayores a 25°C, respectivamente. Visser y col. (2016) hallaron valores de Q_{10} para *M. aeruginosa* entre 2,21 y 4,63 calculados a partir de los datos de Lüring y col. (2013). Y Mehnert y col. (2010) estudiaron siete cianobacterias y halló valores de Q_{10} entre 0,87-2,33.

Modelo modificado de Ratkowsky

Se utilizaron los valores de μ a las temperaturas ensayadas (26, 28, 30 y 35°C) y los calculados a 15°C, 25°C y 40°C tomados de Bortoli y col. (2014); Jähnichen y col. (2011) y Krüger y Eloff (1978),

respectivamente. La **Ecuación 15** ajustó consistentemente con los datos de μ con un $R^2=0,87$ y permitió estimar las temperaturas cardinales ($T_{min} = 8,58 \pm 2,34^\circ\text{C}$, $T_{max} = 45,04 \pm 1,35^\circ\text{C}$ y $T_{opt} = 33,39 \pm 0,55^\circ\text{C}$) que caracterizan el crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo (**Figura 20a**). Las constantes de la **Ecuación 15** fueron $b = 0,0796 \pm 0,2909$ y $c = 0,0057 \pm 0,0432$.

Zehnder y Gorham (1960) hallaron que la temperatura óptima de crecimiento para *M. aeruginosa* fue $28 \pm 1^\circ\text{C}$ a $27 \mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; dentro de un rango de $13-43^\circ\text{C}$; variando levemente respecto a lo hallado en el presente trabajo. Asimismo, según Krüger y Eloff (1978), las temperaturas óptimas estuvieron comprendidas entre $28,8-30,5^\circ\text{C}$, sin embargo, mencionan que especies de *M. aeruginosa* aisladas de ambientes más cálidos toleran mayores temperaturas por estar adaptadas a esas condiciones. Además, observaron que, temperaturas tanto más bajas y más altas que las óptimas, se limita el crecimiento de la cianobacteria. Lürling y col. (2013) hallaron que las temperaturas óptimas para dos cepas de *M. aeruginosa* fueron entre $30,0-32,5^\circ\text{C}$. Más recientemente, Gonçalves y col. (2016) determinaron que la temperatura óptima de una cepa de *M. aeruginosa* fue de $25,6^\circ\text{C}$.

Los efectos de la temperatura sobre el crecimiento de *M. aeruginosa* son diversos e incluyen aquellos que afectan directamente e indirectamente. Según Lürling y col. (2013), el efecto más importante de la temperatura en las cianobacterias es incrementar la velocidad de crecimiento. Esto les otorgaría ventajas frente a los escenarios de cambio climático respecto a otros miembros del fitoplancton (Joehnk y col., 2008; Paerl y Huisman, 2008, 2009) principalmente las diatomeas y dinoflagelados. Como organismos procariontes, en general, las velocidades de crecimiento son óptimas a mayores temperaturas (Butterwick y col., 2005; Watkinson y col., 2005). Este enfoque es interesante desde el punto de vista del cambio climático.

Por otra parte, se obtuvo un buen ajuste entre los valores de LPD y el modelo propuesto; los parámetros de **Ecuación 16** son $q = -0,73 \pm 0,27$ y $p = 33,43 \pm 4,56$ con $R^2=0,93$. Mediante esta ecuación y con los valores de los parámetros calculados, es posible predecir el valor de LPD a una temperatura diferente a las que se realizó el experimento en el rango de temperaturas estudiado (**Figura 20b**).

No hay información disponible en la bibliografía lo que indica otro avance en el conocimiento en la caracterización de la cepa.

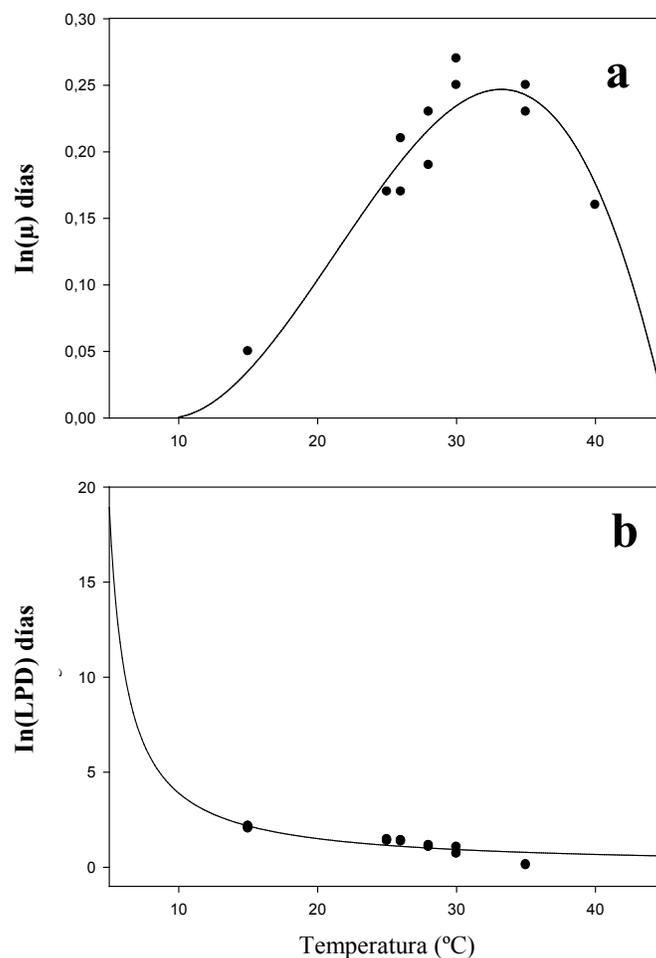


Figura 20: Efecto de la temperatura sobre a) μ y b) LPD para *M. aeruginosa* en medio de cultivo.

Efectos de la temperatura en la producción de clorofila-a

La clo-a, como principal metabolito fotosintético de *M. aeruginosa*, fue determinada durante el crecimiento de la cepa a 26, 28, 30 y 35°C (**Figura 21**). La concentración inicial de clo-a varió entre 1000- 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Al finalizar el experimento, la concentración fue entre 5 y 10 veces más alta que la inicial dependiendo de las condiciones de temperatura (**Figure 21**).

La **Ecuación 18** se ajustó adecuadamente a los datos experimentales (**Figure 21**). La **Tabla 6** muestra las constantes k_0 halladas, los valores de $t_{d_{\text{clo-a}}}$ y los valores de los coeficientes de determinación (R^2). Se halló que los valores de k_0 eran mayores a medida que la temperatura aumentaba a 35°C, presentando

diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con las otras temperaturas. Por su parte, el td_{clo-a} decreció a la mitad, de 3,66 a 1,88 días, cuando la temperatura aumentó de 26 a 35°C.

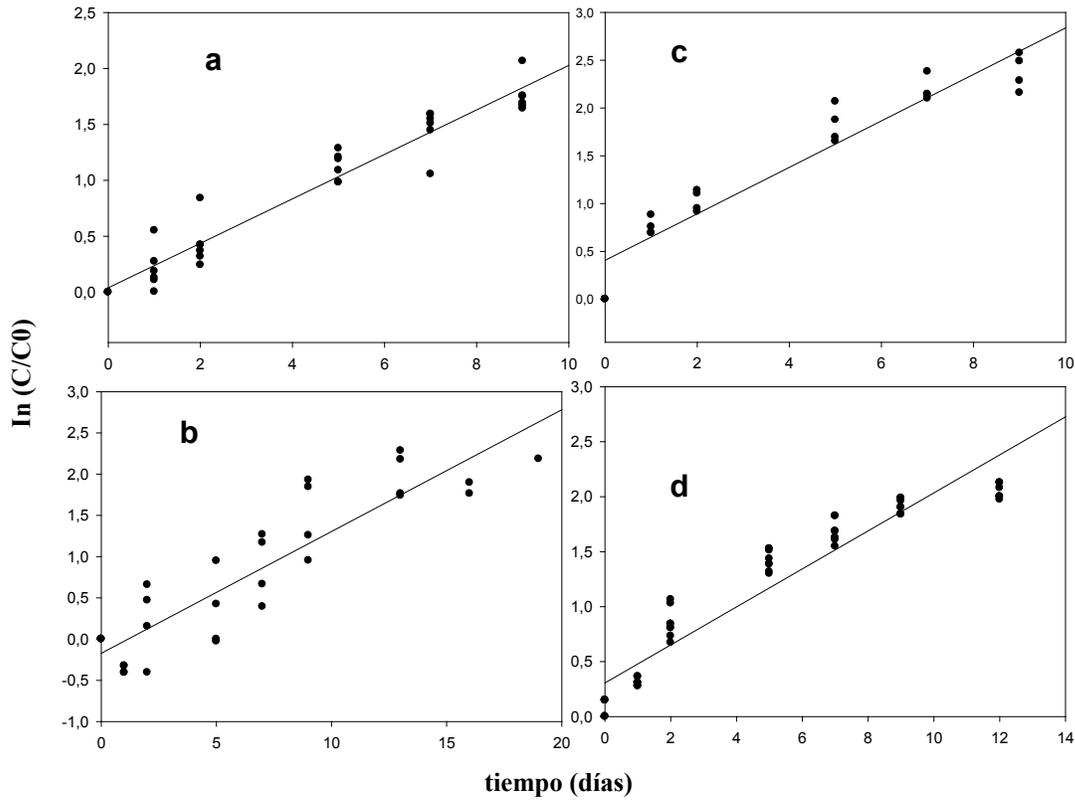


Figura 21: Aplicación de la ecuación de primer orden a los valores de clo-a durante la incubación a diferentes temperaturas a) 26°C, b) 28°C, c) 30°C y d) 35°C.

Tabla 6: Parámetros obtenidos de la aplicación de la ecuación de primer orden a los valores clo-a.

Temperatura (°C)	k_0 (día) ⁻¹	R^2	td_{clo-a} (día)
26	0,189±0,009 ^a	0,936	3,66±0,17 ^a
28	0,167±0,013 ^a	0,808	4,15±0,32 ^a
30	0,243±0,016 ^a	0,914	2,85±0,18 ^b
35	0,367±0,015 ^b	0,941	1,88±0,07 ^b

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Giannuzzi y col. (2016), hallaron valores similares de clo-a para la misma cepa utilizada en la presente Tesis Doctoral. Asimismo, se observó también que los valores de clo-a fueron mayores a temperaturas más elevadas (de 23 a 29°C). No han podido compararse los valores de clo-a con otros datos presentados en la bibliografía científica por presentar diferencias en su determinación o forma de expresión de los resultados. No obstante, existe escasa información en la literatura sobre el estudio de la clo-a en *M. aeruginosa* y su interpretación como parámetro fisiológico.

Ecuación de Arrhenius

La aplicación de la ecuación de Arrhenius (**Ecuación 20**) se observa en la **Figura 22**. El valor de A fue de $6,91 \pm 1,01$ y $E_{(k_0)}$ fue de $16,79 \pm 0,31 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ con un coeficiente de correlación de 0,88. Los parámetros de la ecuación aplicada permiten predecir los valores k_0 a otras temperaturas en el rango del estudio. No se halló información en la literatura científica sobre la energía de activación $E_{(k_0)}$ de clo-a de *M. aeruginosa* en medio de cultivo a diferentes temperaturas.

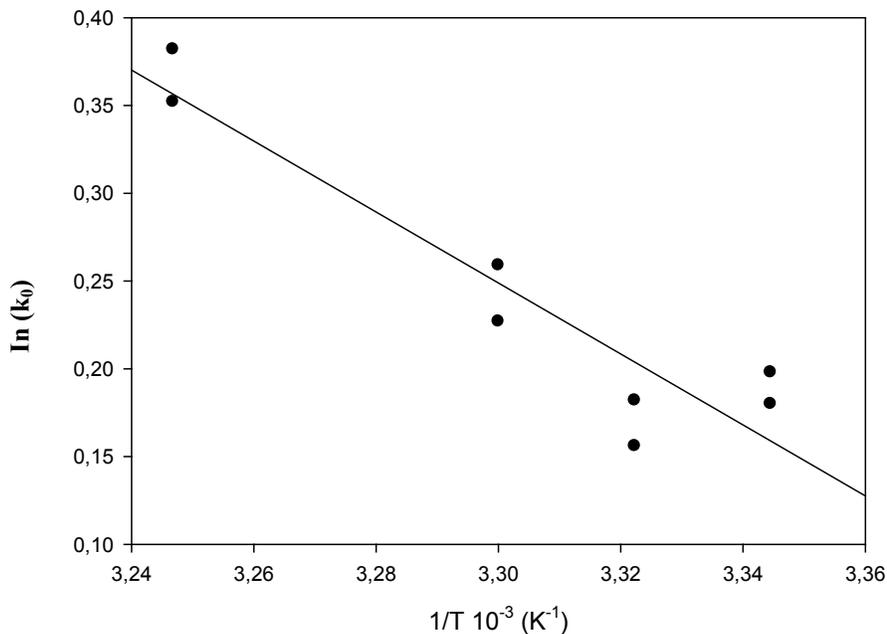


Figure 22: Aplicación de la ecuación tipo Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre k_0 de clo-a.

Efectos de la temperatura sobre el valor de Q_{clo-a}

En los ensayos, el valor de Q_{clo-a} fue relativamente estable durante los experimentos y estuvo comprendido entre 0,402-1,152 $pg.cél^{-1}$ a 26°C; 0,319-0,625 $pg.cél^{-1}$ a 28°C; 0,321-0,810 $pg.cél^{-1}$ a 30°C y 0,887-1,847 $pg.cél^{-1}$ a 35°C (**Figura 23**). El Q_{clo-a} se incrementó aproximadamente el doble cuando la temperatura aumentó de 26 a 35°C. La relación entre $(Q_{clo-a})_{max}/(Q_{clo-a})_{min}$ para todas las temperaturas estuvo comprendida entre 1,9-2,8. Estos resultados coinciden con Lyck (2004) que informó valores de Q_{clo-a} entre 0,184-1,046 $pg.cél^{-1}$ para *M. aeruginosa* NIVA-CYA 228/1 en cultivos batch a 20°C y una relación similar de $(Q_{clo-a})_{max}/(Q_{clo-a})_{min}$ de 2,1. Se observa que la temperatura influye en la producción de clo-a por célula con diferencias significativas ($p>0,05$). Al incrementarse la temperatura, cada célula produce mayor cantidad de clo-a y la produce con mayor velocidad, según los valores de td_{clo-a} hallados.

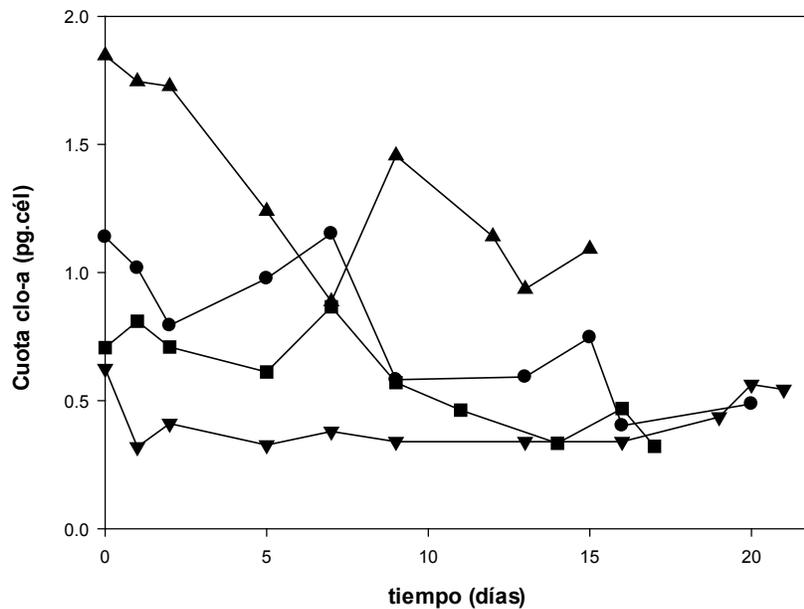


Figura 23: Evolución de Q_{clo-a} , durante los experimentos a ● 26°C, ▼ 28°C, ■ 30°C y ▲ 35°C.

Efectos de la temperatura en la producción de microcistinas en el cultivo de *M. aeruginosa*

Los valores iniciales de producción [D-Leu¹] MC-LR variaron entre 100 – 150 $\mu g.L^{-1}$; correspondientes a los valores de toxina del inoculo de *M. aeruginosa*. Al finalizar el experimento (13-20 días), los valores de [D-Leu¹] MC-LR fueron 950, 500, 365 y 100 $\mu g.L^{-1}$ a 26°C, 28°C, 30°C y 35°C, respectivamente. En

la **Figura 24**, se puede observar un espectro de masa obtenido durante la cuantificación del componente principal de [D-Leu¹] MC-LR.

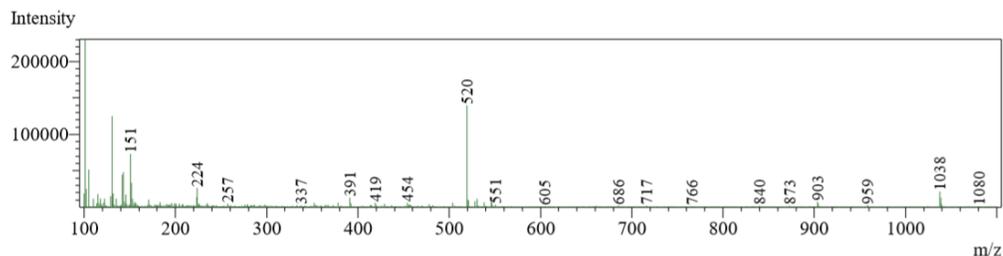


Figura 24. Espectro de masa del componente principal de [D-Leu¹] MC-LR (m/z 520) obtenido del equipo HPLC/MS 2020.

En la **Figura 25**, se observa la aplicación de la **Ecuación 19** a los datos experimentales de MC obtenidos a las 4 temperaturas ensayadas (líneas llenas). Se obtuvo una buena correlación ($R^2=0,917-0,987$) entre los datos experimentales y los valores predichos. Los parámetros derivados p (coeficiente de producción de MCs) y d_M (tasa de depleción) de la **Ecuación 6** se observan en la **Tabla 7**.

La máxima producción de [D-Leu¹] MC-LR decreció 9,5 veces cuando la temperatura se incrementó de 26°C a 35°C. Al aumentar la temperatura, el valor de p decreció y hubo diferencias significativas ($p<0,05$) entre 26°C y las demás temperaturas ensayadas. Asimismo, los valores de d_M fueron mayores a 30-35 °C. Se observaron diferencias estadísticamente diferentes ($p<0,05$) entre el valor de p a 26°C y las demás temperaturas. En tanto, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de d_M .

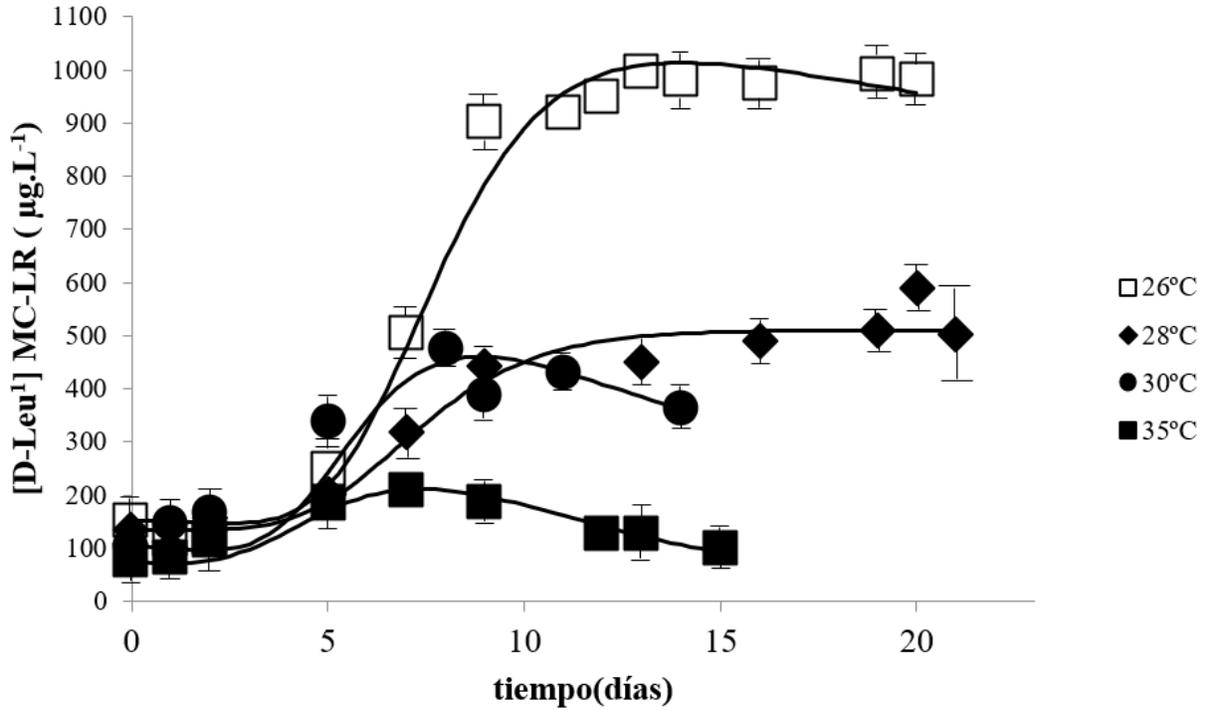


Figura 25: Modelado de la producción de [D-Leu¹] MC-LR en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden a la aplicación del modelo a los datos experimentales a □ 26°C, ◆ 28°C, ● 30°C y ■ 35°C. Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

Tabla 7: Parámetros estimados de la aplicación del modelo a los datos experimentales, coeficiente de producción de [D-Leu¹] MC-LR (p) y tasa de reducción de [D-Leu¹] MC-LR (d_M)

T (°C)	p (fg.cél ⁻¹)	d_M (día ⁻¹)	R ²
26	63,89±3,68 ^a	1,37.10 ⁻² ±6,19×10 ^{-3a}	0,987
28	18,24±2,67 ^b	7,96.10 ⁻⁴ ±9,30×10 ^{-3a}	0,965
30	27,91±8,05 ^b	6,89.10 ⁻² ±4,88×10 ^{-2a}	0,917
35	31,35±4,80 ^b	1,63.10 ⁻¹ ±2,95×10 ^{-2a}	0,926

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Según algunos estudios, las temperaturas altas y bajas en comparación con la temperatura óptima para la cepa disminuyen la toxicidad o concentraciones de microcistinas (Cood y Poon, 1988, Gorham, 1964, Runnegar et al., 1983, Sivonen, 1990, van der Westhuizer y Eloff, 1985 y Rapala et al., 1997). En este

trabajo, se encontró que al disminuir la temperatura aumentó la concentración de MCs. Esto coincide con Gorham (1964), Runnegar y col. (1983), van der Westhuizen y Eloff (1985), Watanabe y Oishi (1985), van der Westhuizen y col. (1986); Cood y Poon (1988), Sivonen (1990), Rapala y col. (1997), Lehman y col. (2008); Wang et al. (2010^a), Dziallas y Grossart (2011^b), Mowe y col. (2015) y Giannuzzi y col. (2016). De hecho, Runnegar y col. (1983) afirman que la temperatura durante el crecimiento de *Microcystis* es el principal factor para determinar la toxicidad. Por su parte, Jiang y col. (2007) mencionan que no observaron efectos sobre la producción de MCs. En contraste, estudios ambientales advierten incrementos de MCs en floraciones al aumentar la temperatura. No obstante, Wicks y Thiel (1990) y Shen y col. (2003) hallaron la mayor concentración de toxinas a alrededor de los 27°C. Las diferencias entre los estudios ambientales y de laboratorios son varias. Una de ellas es que *M. aeruginosa* es formadora de floraciones cianobacterias, siendo una especie frecuentemente dominante en período estival. Además, al formar floraciones acumulativas superficiales (Visser y col., 2005), es posible que ocurra una concentración facilitada por los vientos predominantes. Asimismo, la capacidad de formar grandes colonias en ambientes naturales es perdida en condiciones de laboratorio, lo que hace que la metodología de colecta de muestras varíe ampliamente.

Retomando los análisis previos, se puede considerar que al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de crecimiento (μ) y las células se reproducen más rápidamente, sin embargo, la producción de toxina disminuye al aumentar la temperatura en el rango estudiado (25-35°C). Estas observaciones podrían ser alentadoras en escenarios de cambio climático donde es de esperar que esta cepa produzca menos cantidad de toxina. No obstante, es posible que se incremente la frecuencia e intensidad de las floraciones de cianobacterias.

La relación inversa entre crecimiento y producción de MCs puede ser interpretada en términos de costos y beneficios de producir MCs, debido a que su biosíntesis ocurre por una compleja vía multienzimática que consume mucha energía, lo cual implica costos para la célula. Los resultados sugieren que, en condiciones de crecimiento celular, los beneficios de producir MCs superan los costos, lo que podría explicar el bajo nivel de producción de MCs a altas temperaturas (30 y 36°C). Al respecto, Briand y col. (2008) informan que, bajo condiciones favorables de crecimiento, el costo de producir MCs prevalece por sobre sus beneficios y, consecuentemente, la producción es baja. Esto podría interpretarse a la luz de los resultados

de este trabajo, debido a que se halló que a temperaturas entre 15-28°C la energía de activación es mayor que a 28-35°C y se genera una mayor producción de MCs. Esto significa que *M. aeruginosa* es más sensible a los cambios térmicos a temperaturas relativamente más baja, por lo que la mayor producción de MCs podría ofrecer una ventaja frente a las condiciones ambientales.

Por otra parte, Zilliges y col. (2011) y Meissner y col. (2013, 2014) demostraron que una gran fracción de MCs podría no extraerse con metanol. Asimismo, es posible que bajo determinadas condiciones ambientales prevalezcan otras MCs o isoformas (Dziallas y Grossart, 2011^b). Al respecto, se ha demostrado que la temperatura tiene efectos sobre las proporciones relativas de tres péptidos tóxicos identificados de una cepa *M. aeruginosa* (van der Westhuizer y col., 1986) y que las concentraciones relativas de MC-LR, MC-RR y MC-YR pueden cambiar con el tiempo (Watanabe y col., 1989). De modo similar, Rapala y col. (1997) han observado cambios en la producción de variantes de MCs al variar la temperatura en cepas de *Dolichospermum*: las variantes -LR se incrementaron a una temperatura superior a 25°C, por el contrario, las variantes -RR se incrementaron a una temperatura inferior a 25°C.

Efectos de la temperatura sobre el parámetro Q_{MC}

Los valores de Q_{MC} iniciales variaron entre 73-84 fg.cél⁻¹ provenientes del inóculo de *M. aeruginosa* que contiene toxina (**Figura 26a**); esto puede deberse a la aclimatación previa a 26°C (Jähnichen y col., 2008). Los valores de Q_{MC} máximos se observaron en la fase exponencial a 26 y 28°C (83-80fg.cél⁻¹, respectivamente) y fueron dos a tres veces mayores que los correspondientes en la fase estacionaria tardía (**Figura 26a**). A 30 y 35°C, Q_{MC} decreció durante el tiempo de incubación. A 26°C, Q_{MC} fue constante durante los primeros 15 días y luego, decreció. Al finalizar el estudio, los Q_{MC} fueron similares para 26, 28, 30 y 35°C (20±10fg.cél⁻¹) (**Figura 26a**). Pueden producirse modificaciones sustanciales de los Q_{MC} como resultado de un agotamiento de las MCs, que se hace evidente en la transición de crecimiento exponencial a crecimiento estacionario. Briand y col. (2008) observaron una disminución en los Q_{MC} en la fase de crecimiento exponencial tardía. El Q_{MC} muestra una tendencia decreciente a medida que la temperatura aumentó, siendo significativamente ($p<0,05$) mayor en 26°C en comparación con otras temperaturas.

Por otro lado, se estudió el parámetro cuota expresado por clo-a (Q_{MC}) que se refiere a la cantidad de MCs producida por cantidad de clo-a en *M. aeruginosa*. Se obtiene del cociente entre la producción de MCs y el valor de clo-a para cada tiempo. El parámetro Q_{MC} por clo-a (**Figura 26b**), no presenta diferencias significativas ($p>0,05$) en el ensayo. Algunos autores han descrito que las MCs se encuentran asociadas a la membrana de los tilacoides de *M. aeruginosa* sugiriendo una cercana asociación física entre las MCs y la maquinaria fotosintética de la célula. La relación constante de Q_{MC} por clo-a (**Figura 26b**) encontrada en este trabajo soporta esta hipótesis y sugiere que la síntesis de MC y/o su función puede estar ligada al proceso fotosintético (Long y col., 2001).

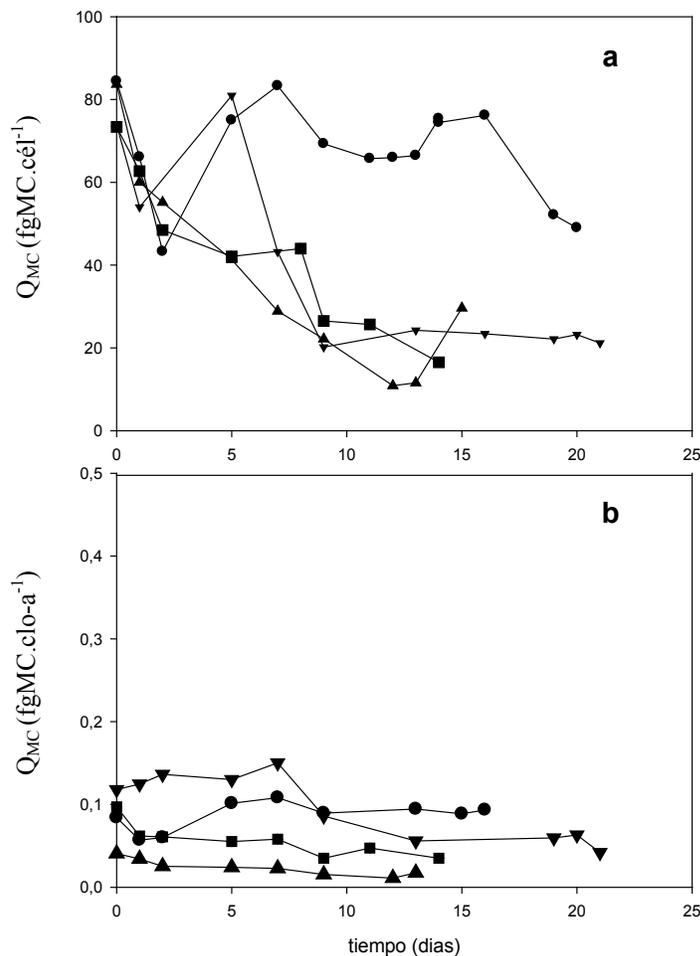


Figura 26: Evolución de a) Q_{MC} por célula; b) Q_{MC} por ng de clorofila, durante los experimentos a ● 26°C, ▼ 28°C, ■ 30°C y ▲ 35°C.

Efectos de diferentes factores sobre el crecimiento de *M. aeruginosa*

Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre la cinética de crecimiento de *M. aeruginosa*

A continuación, se desarrollarán los resultados obtenidos de la combinación de la temperatura, irradiación y relación N:P sobre el crecimiento de *M. aeruginosa*, en condiciones de laboratorio. Para ello, se analizará el efecto de la irradiación y la relación N:P a cada una de las temperaturas ensayadas (26, 30 y 36°C).

En la **Figura 27**, se observan los datos experimentales de las curvas de crecimiento a 26°C bajo los diferentes niveles de irradiación y relación N:P. En estas, se observó un crecimiento de tipo sigmoideo característico y, durante los experimentos, el número de células se incrementó exponencialmente luego de la fase lag. El número de células iniciales estuvo comprendido entre $6,6 \cdot 10^5$ - $1,9 \cdot 10^6$ cél.mL⁻¹ y alcanzó, al finalizar el estudio, valores entre $7,4 \cdot 10^6$ - $2,6 \cdot 10^7$ cél.mL⁻¹. Este rango de valores de recuento ha sido hallado en los florecimientos de *M. aeruginosa* en ambientes naturales (Echenique y col., 2003; Echenique y col., 2006; Andrinolo y col., 2007; Giannuzzi y col., 2012; Crettaz-Minaglia y Bordet, 2013). No se hallaron diferencias significativas ($p=0,307$) entre los recuentos celulares a 26°C (ver **Tabla A1** en Anexos).

Además, en la **Figura 27**, se observa la aplicación del modelado matemático de Gompertz (líneas llenas) y, en la **Tabla 8**, se presentan los parámetros cinéticos calculados con la **Ecuación 3**. Se obtuvo un buen ajuste entre los datos experimentales y los predichos con un coeficiente de determinación R^2 entre 0,9988-0,9999 y RMSE entre 0,0210-0,0849 (**Figura 30**).

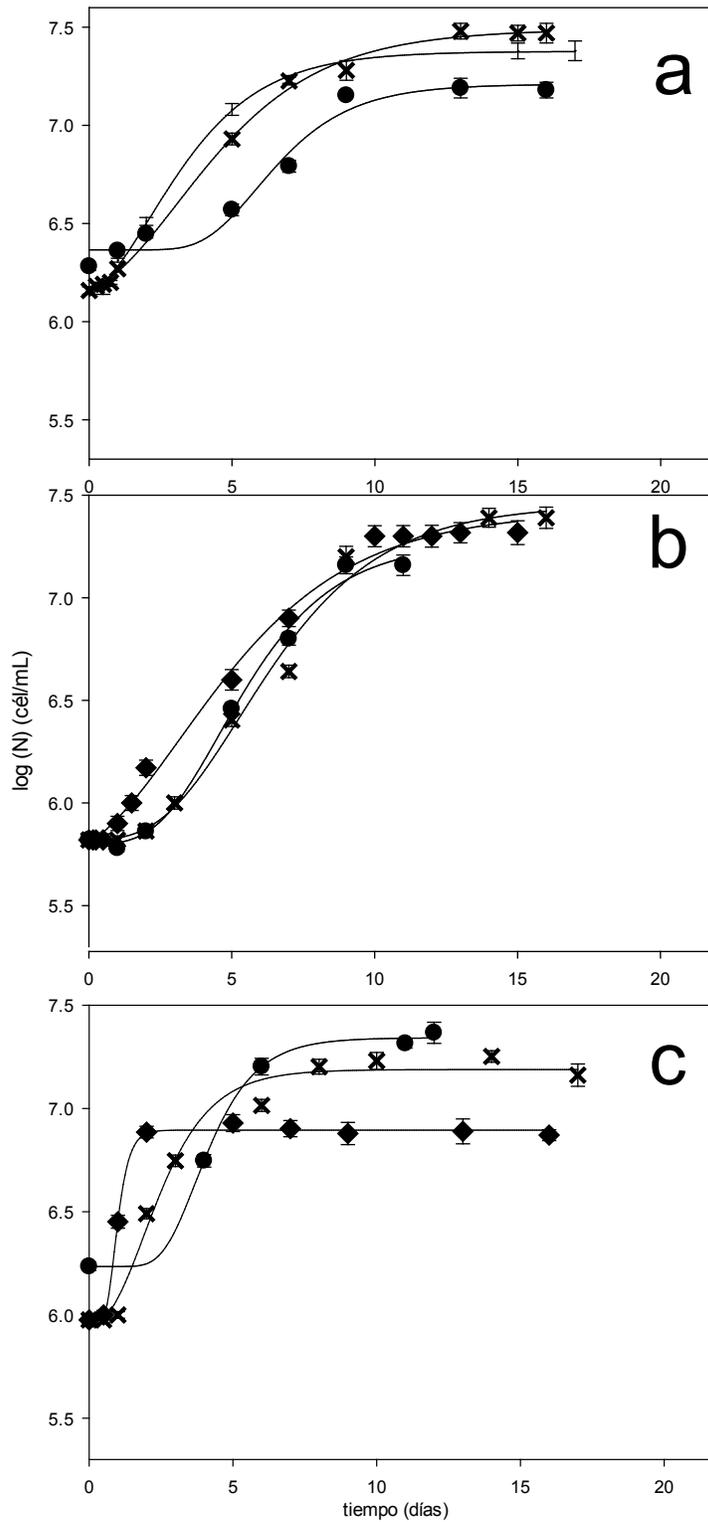


Figura 27. Modelado del crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz a 26°C, a) 30 μmol

fotones $m^{-2}.s^{-1}$; b) 50 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; c) 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; • N:P 10; x N:P 100; ♦ N:P 150.

Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

Tabla 8. Parámetros de la ecuación de Gompertz a, b, c y m y parámetros cinéticos derivados (μ , LPD y MPD) para el crecimiento de *M. aeruginosa* en condiciones de cultivo a 26°C a 30, 50 y 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; N:P 10; N:P 100; N:P 150. Además, se incluyen R^2 y RMSE.

26°C		a	b	c	m	μ (d^{-1})	LPD (d)	MPD (cél/mL)	R^2	RMSE
30 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	6,2954±0,0080	0,9932±0,0114	0,5423±0,0219	5,3938±0,0611	0,20±0,0536 ^a	3,55±0,0674 ^a	7,28±0,0194 ^a	0,9988	0,0816
	NP100	6,0956±0,0147	1,3942±0,0183	0,3997±0,0086	3,1483±0,0686	0,21±0,0509 ^a	0,65±0,2630 ^b	7,49±0,0330 ^a	0,9997	0,0299
	NP150	6,0590±0,0239	1,3160±0,0264	0,4905±0,0165	2,2239±0,0916	0,24±0,0687 ^a	0,18±0,4002 ^b	7,37±0,0503 ^a	0,9993	0,0329
50 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	5,7996±0,0112	1,3886±0,0205	0,4663±0,0156	4,4211±0,0547	0,24±0,0680 ^a	2,28±0,3647 ^a	7,19±0,0317 ^b	0,9994	0,0592
	NP100	5,8029±0,0129	1,6377±0,0202	0,4537±0,0101	4,4476±0,0619	0,27±0,0633 ^a	2,24±0,3777 ^b	7,44±0,0331 ^b	0,9994	0,0849
	NP150	5,6719±0,0242	1,6562±0,0306	0,4692±0,0116	3,0070±0,0943	0,29±0,0769 ^a	0,88±0,4292 ^b	7,33±0,0548 ^b	0,9993	0,0545
70 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	6,2342±0,0029	1,1147±0,0039	0,8539±0,0104	3,7068±0,0122	0,35±0,0462 ^b	2,54±0,1627 ^a	7,35±0,0293 ^b	0,9999	0,0400
	NP100	5,9473±0,0166	1,2689±0,0185	0,8192±0,0342	1,9420±0,0549	0,38±0,0955 ^b	0,72±0,3254 ^b	7,22±0,0351 ^b	0,9988	0,0751
	NP150	5,9568±0,0136	1,0914±0,0176	0,9110±0,0679	1,6564±0,0597	0,36±0,1009 ^b	0,56±0,3400 ^b	7,05±0,0312 ^b	0,9993	0,0210

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

Bajo los tratamientos de irradiación, hubo diferencias significativas en los parámetros μ y MPD. Los valores de μ variaron entre 0,20-0,35 d^{-1} , observándose un aumento de la velocidad de crecimiento al aumentar la intensidad de irradiación con diferencias muy significativas ($p=6,03.10^{-4}$); entre 30 y 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$ ($p=5,77.10^{-4}$) y significativas entre 50 y 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$ ($p=0,02$). A una irradiación de 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$, se observó un incremento de los valores de μ de aproximadamente 2 veces respecto a irradiaciones de 30 y 50 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$. Este resultado coincide con lo hallado por Watanabe y Oishi (1985) que observaron un incremento en el μ al incrementarse la irradiación de 7,53 a 75,3 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$. Esto indica que la velocidad de crecimiento de *M. aeruginosa* se encuentra estimulada al incrementarse la irradiación a temperaturas relativamente bajas (26°C). Además, se hallaron diferencias significativas en MPD, que varió entre 7,05-7,49 $cél.mL^{-1}$, entre tratamientos ($p=0,014$) entre 30 y 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$ ($p=0,01$). A 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$, los valores de MPD fueron más bajos

que a las demás irradiaciones. Esto pudo deberse a un proceso de fotoinhibición debido a que la cepa se encuentra aclimatada, en condiciones de laboratorio, a una menor irradiación. Por otra parte, la LPD varió entre 0,18-3,55 día, no hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0,602$).

Watanabe y Oishi (1985) hallaron, a 25°C y 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un valor de $\mu=0,44 \text{ día}^{-1}$ siendo mayor que los hallados en el presente trabajo (0,20-0,24 días^{-1}). Esto puede ser debido a que los autores utilizaron luz continua y, en este trabajo se utilizaron ciclos de luz-oscuridad 14:10 y aireación. Más recientemente, Lürling y col. (2013) hallaron valores de $\mu=0,67\text{-}0,77 \text{ día}^{-1}$ a 25°C y 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para cepas de *M. aeruginosa*. Estos valores son mayores a los hallados en la presente Tesis Doctoral. Las diferencias pueden haber sido debidas a que los autores midieron el crecimiento a través de la clo-a como indicador de biomasa y solo en la porción exponencial de la curva de crecimiento.

Por otro lado, al analizar los efectos de la relación N:P sobre los parámetros de crecimiento, y al contrario de los tratamientos de irradiación, se hallaron diferencias significativas en LPD. No se observaron diferencias significativas en μ ($p=0,538$), ni en MPD ($p=0,07$). Sin embargo, al analizar la fase de latencia, se observaron diferencias muy significativas entre los diferentes tratamientos ($p=1,18\cdot 10^{-6}$), entre NP:10 y NP:100 ($p=2,14\cdot 10^{-4}$) y entre N:P de 10 y N: P: de 150 ($p=1,33\cdot 10^{-4}$). La LPD disminuyó, en promedio, 2 veces al incrementarse la relación N:P de 10 a 100 y 5 veces al incrementarse la relación N:P de 10 a 150. Es posible que, al incrementar la disponibilidad de N en cianobacterias no fijadoras como *M. aeruginosa*, la LPD disminuya porque permite adaptarse más rápidamente al nuevo ambiente. Asimismo, es posible que en el período de aclimatación de la cepa y dada la capacidad de almacenar gránulos de polifosfatos (Harold, 1963, 1964, 1966; Okada y col., 1982); permita no tener dificultades en un nuevo ambiente con deficiencia de P. Es por ello que, como se afirma en la literatura, en las cianobacterias no fijadoras, el N podría ser el nutriente limitante (Gerloff, 1952). Watanabe y Oishi (1985) no observaron efectos en la variación de la relación N:P en cultivos de *M. aeruginosa* a 25°C y 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sin embargo, bajo deficiencia de N observaron un retardo en el crecimiento al día 4. De modo similar en esta Tesis Doctoral (**Figura 28a**, curva N:P 10), se observa que, a N:P 10, el valor de LPD aumenta casi 20 veces respecto a las curvas bajo la relación N:P 100 y 150. Tempranamente, Gerloff y col. (1952) han

afirmado que *Microcystis* tiene un requerimiento de N mucho más alto que de otros elementos, así como un requerimiento de P muy bajo. Estos autores han podido obtener las cosechas máximas de cultivo a N:P=75. Por otra parte, Zehnder y Gorham (1960) realizaron experimentos a 27°C bajo condiciones de irradiación entre 13,5-54 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ variando diversos medios de cultivo y sus proporciones de macronutrientes como N y P. En ellos, observaron que el crecimiento de *M. aeruginosa* se incrementaba al aumentar los macronutrientes, no hallando que el balance fuera especialmente crítico. En el mencionado trabajo el crecimiento fue medido como la diferencia entre el cultivo inicial y la cosecha final, determinada en peso seco.

En la **Figura 28**, se observan los datos experimentales de las curvas de crecimiento a 30°C bajo los diferentes niveles de irradiación y relación N:P. En estas, de modo similar que a 26°C, se observó un crecimiento de tipo sigmoideo característico y, durante los experimentos, el número de células se incrementó exponencialmente luego de la fase lag. A 30°C, el número de células iniciales estuvo comprendido entre $3,3\cdot 10^5$ y $1,4\cdot 10^6$ cél.mL^{-1} y alcanzó, al finalizar el estudio, niveles de $2,4\cdot 10^7$ cél.mL^{-1} . Este rango de valores de recuento ha sido hallado en los florecimientos de *M. aeruginosa* en ambientes naturales (Echenique y col., 2003; Echenique y col., 2006; Andrinolo y col., 2007; Giannuzzi y col., 2012; Crettaz-Minaglia y Bordet, 2013).

Se observaron diferencias significativas entre los recuentos ($p=1,97\cdot 10^{-4}$). Bajo las condiciones de irradiación 30 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y N:P 10 se observaron los mayores recuentos celulares tanto iniciales como finales (ver **Tabla A4** en Anexos).

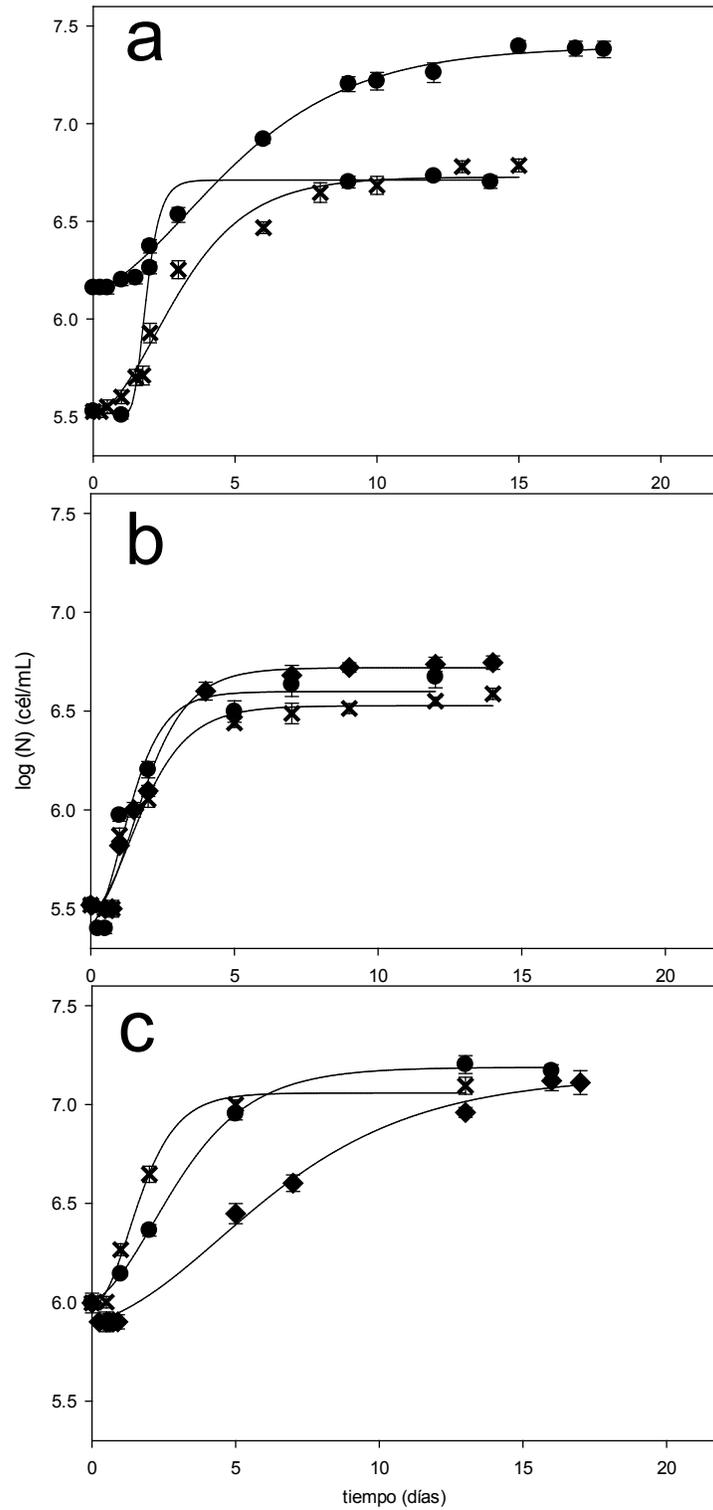


Figura 28. Modelado del crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz a 30°C, a) 30 μmol

fotones $m^{-2}.s^{-1}$; b) 50 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; c) 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150.

Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

En la **Figura 28**, también puede observarse la aplicación del modelado matemático de Gompertz (líneas llenas) y, en la **Tabla 9**, se presentan los parámetros cinéticos de μ , LPD y MPR para *M. aeruginosa* creciendo en diferentes condiciones de irradiancia, NP y a 30°C calculados con la **Ecuación 3**. Se obtuvo un buen ajuste entre los datos experimentales y los predichos con un coeficiente de determinación R^2 0,9962 – 0,9996 y RMSE entre 0,0180-0,1339 (**Tabla 9**, **Figura 30**).

Tabla 9: Parámetros de la ecuación de a, c, b, m y parámetros cinéticos derivados (μ , LPD y MPD) para el crecimiento de *M. aeruginosa* en condiciones de cultivo a 30°C a 30, 50 y 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; N:P 10; N:P 100; N:P 150.

30°C		a	b	c	M	μ (d^{-1})	LPD (d)	MPD (cél/mL)	R^2	RMSE
30 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	6,0833±0,0323	1,3110±0,0323	0,4619±0,0222	3,1014±0,1361	0,22±0,0768 ^a	0,94±0,2669 ^a	7,39±0,0585 ^{a,c}	0,9980	0,0328
	NP100	5,5016±0,0320	1,2460±0,0370	0,6645±0,0570	2,1845±0,1003	0,30±0,1209 ^a	0,68±0,4570 ^a	6,75±0,0692 ^{a,d}	0,9962	0,0731
	NP150	5,4943±0,0387	1,2450±0,0504	0,4842±0,0465	3,0079±0,1819	0,22±0,1065 ^a	0,94±0,6166 ^a	6,74±0,0891 ^a	0,9968	0,0255
50 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	5,4953±0,0281	1,2250±0,0312	1,0116±0,0774	2,0363±0,0623	0,46±0,1440 ^b	1,04±0,2555 ^a	6,72±0,0593 ^{b,c}	0,9976	0,1339
	NP100	5,4443±0,0270	1,1396±0,0294	0,9492±0,0678	1,8083±0,0768	0,40±0,1185 ^b	0,75±0,3773 ^a	6,58±0,0564 ^{b,d}	0,9980	0,0899
	NP150	5,4516±0,0362	1,1708±0,0396	0,9899±0,0788	1,5513±0,0747	0,43±0,1461 ^b	0,54±0,3774 ^a	6,62±0,0758 ^b	0,9973	0,0199
70 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	5,9486±0,0311	1,2393±0,0336	0,9454±0,0243	2,1530±0,1090	0,43±0,0800 ^b	1,09±0,4367 ^a	7,19±0,0647 ^{a,c}	0,9995	0,0180
	NP100	5,9599±0,0114	1,0980±0,0123	1,0802±0,0290	1,2723±0,0286	0,44±0,0817 ^b	0,35±0,2312 ^a	7,06±0,0237 ^{a,d}	0,9996	0,0670
	NP150	5,9418±0,0218	1,1915±0,0365	0,8751±0,0164	2,0556±0,1579	0,38±0,0607 ^b	0,91±0,6120 ^a	7,13±0,0583 ^a	0,9988	0,0552

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

Bajo los tratamientos de irradiación, hubo diferencias en los parámetros μ y MPD. Se observaron diferencias muy significativas en los valores de μ ($p=8,41.10^{-4}$), que variaron entre 0,22-0,46 $día^{-1}$, entre 30 y 50 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$ ($p=1,82.10^{-3}$) y entre 30 y 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$ ($p=3,58.10^{-3}$). Los menores valores de μ ocurrieron a 30 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$. Watanabe y Oishi (1985) hallaron un valor de $\mu=0,59$ $día^{-1}$ bajo las condiciones de 32°C y 30 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$, siendo mayor que la hallada en la presente Tesis Doctoral. Esto puede ser debido a que los autores utilizaron luz continua y, en este trabajo se

utilizaron ciclos de luz-oscuridad 14:10 y aireación. Lürling y col. (2013) encontraron un valor de $\mu=0,94$ día⁻¹ a 30°C y 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, también mayor al encontrado en la presente Tesis Doctoral. Los autores midieron el crecimiento a través de la clo-a como indicador de biomasa y sólo en la porción exponencial de la curva de crecimiento.

Asimismo, se hallaron diferencias muy significativas en los valores de MPD, que variaron entre 6,58-7,39 cél.mL⁻¹, entre tratamientos ($p=1,06\cdot 10^{-4}$): entre 30 y 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p=6,67\cdot 10^{-3}$) y entre 50 y 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p=2,03\cdot 10^{-4}$). A 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiación, los valores de MDP fueron los menores.

Por otra parte, los valores de LPD no tuvieron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,927$ y $p=0,129$ respectivamente). En general, los valores fueron bajos en relación a 26°C, menores a 1 día, aproximadamente.

Respecto a la relación N:P, a 30°C, no hubo diferencias significativas entre tratamientos en μ ($p=0,831$) y LPD ($p=0,127$). Sólo en los valores de MPD se hallaron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,04$): entre N:P de 10 y 100 ($p=0,04$). Bajo la relación N:P 10, los valores de MDP fueron mayores que a N:P100. Oh y col. (2000) realizaron estudios a 28°C con irradiación continua a 160 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bajo condiciones de deficiencia de P encontrando valores de μ comprendidos entre 0,1-0,8 día⁻¹. En este trabajo, el incremento de μ estuvo acompañado del incremento de P en condiciones limitantes de este nutriente y la relación atómica N:P varió de 24 a 15 con un aumento de los valores de μ . En la presente Tesis Doctoral, esta relación no fue hallada y el μ estuvo principalmente influenciado por la irradiación; sin embargo, los autores mencionados utilizaron un nivel de irradiación más alto que los ensayados y presentados en este apartado.

En la **Figura 29**, se observan los datos experimentales de las curvas de crecimiento a 36°C bajo los diferentes niveles de irradiación y relación N:P. En estas, se observó un crecimiento de tipo sigmoideo característico y, durante los experimentos, el número de células se incrementó exponencialmente luego de la fase lag. A 36°C, el número de células iniciales estuvo comprendido entre $2,1\cdot 10^5$ - $2,6\cdot 10^5$ cél.mL⁻¹ y alcanzó, al finalizar el estudio, niveles entre $1,0\cdot 10^6$ - $3,2\cdot 10^6$ cél.mL⁻¹. Este rango de valores de recuento ha

sido hallado en los florecimientos de *M. aeruginosa* en ambientes naturales (Echenique y col., 2003; Echenique y col., 2006; Andrinolo y col., 2007; Giannuzzi y col., 2012; Crettaz-Minaglia y Bordet, 2013).

No se hallaron diferencias significativas ($p=0,114$) entre los recuentos celulares a 36°C bajo las diferentes intensidades de irradiación y relación N:P (ver **Tabla A7 en Anexos**).

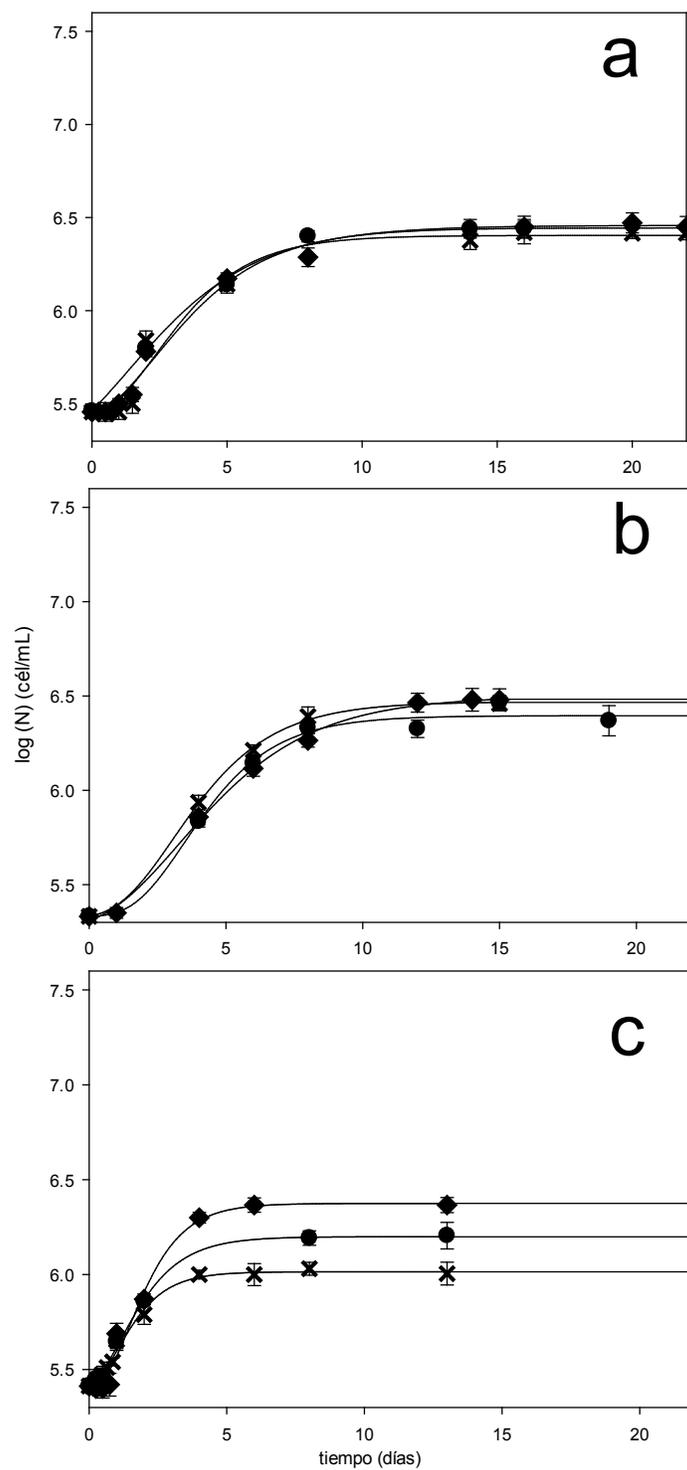


Figura 29. Modelado del crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz a 36°C, a) 30 μmol

fotones $m^{-2}.s^{-1}$; b) 50 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; c) 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150.

Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

En la **Figura 29**, también se observa la aplicación del modelado matemático de Gompertz (líneas llenas) y, en la **Tabla 10**, se presentan los parámetros cinéticos calculados con la **Ecuación 3**. Se obtuvo un buen ajuste entre los datos experimentales y los predichos con un coeficiente de determinación R^2 entre 0,9981-0,9998 y RMSE entre 0,0255-0,5764 (**Tabla 10**, **Figura 30**).

Tabla 10: Parámetros de la ecuación de Gompertz a, c, b, m y parámetros cinéticos derivados (μ , LPD y MPD) para el crecimiento de *M. aeruginosa* en condiciones de cultivo a 36°C a 30, 50 y 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$; N:P 10; N:P 100; N:P 150.

36°C		a	b	c	M	μ (d^{-1})	LPD (d)	MPD (cél/mL)	R^2	RMSE
30 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	5,3896±0,0330	1,0520±0,0407	0,4984±0,0440	2,5598±0,1857	0,19±0,0371 ^a	1,28±0,6023 ^a	6,44±0,0737 ^a	0,9981	0,0545
	NP100	5,3266±0,0401	1,0869±0,0422	0,4474±0,0237	2,0157±0,1835	0,18±0,0702 ^a	0,90±0,5494 ^a	6,41±0,0823 ^a	0,9983	0,0704
	NP150	5,3953±0,0193	1,0693±0,0213	0,4783±0,0197	2,6159±0,1025	0,19±0,0609 ^a	1,25±0,4343 ^a	6,46±0,0406 ^a	0,9989	0,5764
50 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	5,3231±0,0085	1,1418±0,0097	0,4734±0,0084	3,3187±0,0440	0,20±0,0419 ^a	1,21±0,2913 ^a	6,46±0,0182 ^a	0,9998	0,0576
	NP100	5,3198±0,0287	1,1493±0,0340	0,4954±0,0312	3,0729±0,1316	0,21±0,0819 ^a	1,05±0,5086 ^a	6,33±0,0627 ^a	0,9992	0,0276
	NP150	5,2782±0,0294	1,2137±0,0294	0,3859±0,0181	3,3702±0,1178	0,17±0,0648 ^a	0,78±0,4892 ^a	6,50±0,0522 ^a	0,9992	0,0298
70 μmol fotón $m^{-2}.s^{-1}$	NP10	5,3837±0,0132	0,8208±0,0148	1,0150±0,0517	1,4043±0,0486	0,31±0,0836 ^b	0,42±0,3069 ^b	6,20±0,0280 ^b	0,9990	0,0258
	NP100	5,3804±0,0096	0,7534±0,0107	0,9259±0,0339	1,3674±0,0425	0,26±0,0566 ^b	0,29±1,0995 ^b	6,13±0,0203 ^b	0,9993	0,0255
	NP150	5,3860±0,0207	0,8860±0,0232	0,9597±0,0647	1,5521±0,0673	0,31±0,0945 ^b	0,51±0,3591 ^b	6,27±0,0439 ^b	0,9986	0,0711

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

Al variar las intensidades de irradiación, se observaron diferencias en todos los parámetros que describen las curvas de crecimiento. Se observaron diferencias muy significativas en μ , que varió entre 0,17-0,31 d^{-1} entre tratamientos ($p=1,68.10^{-3}$). A 70 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$ el μ fue más altos que a los demás tratamientos con valores de p que variaron entre $1,22.10^{-3}$ - $5,97.10^{-3}$. Lüring y col. (2013) encontraron un valor de $\mu=0,7$ - $1,01$ d^{-1} a 35°C y 80 μmol fotones $m^{-2}.s^{-1}$, también mayor al encontrado en la presente Tesis Doctoral. Las diferencias en los resultados pueden haber sido debidas a que los autores midieron el crecimiento a través de la clo-a como indicador de biomasa y sólo en la porción exponencial de la curva

de crecimiento. Krüger y Eloff (1978) mencionan en su trabajo que *M. aeruginosa* puede crecer a altas temperaturas y bajas irradiancias tal como lo hallado en esta Tesis Doctoral.

También, se observaron diferencias muy significativas en LPD, que varió entre 0,29-1,28 día entre tratamientos ($p=1,70 \cdot 10^{-3}$). A $70 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ la LPD fue entre 2 y 3 veces más bajas que a los demás tratamientos con valores de p que variaron entre $1,23^{-3}$ -0,01. Respecto a los valores de MDP, que variaron entre 6,50-6,13 cél.mL^{-1} , se hallaron diferencias muy significativas entre tratamientos ($p=4,70 \cdot 10^{-5}$): entre 30 y $70 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=2,69 \cdot 10^{-4}$) y entre 50 y $70 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=3,41 \cdot 10^{-4}$). A $70 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, los MPD fueron los más bajos (6,13-6,27 cél.mL^{-1}) que a las demás intensidades de irradiación (6,33-6,50 cél.mL^{-1}).

Respecto a la relación N:P, a diferencia de los tratamientos de irradiación a 36°C , no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de crecimiento de *M. aeruginosa* (μ $p=0,907$; LPD $p=0,665$ y MPD $p=0,09$).

Tal como se mencionó antes, la aplicación del modelo matemático de Gompertz a los datos experimentales presento un buen ajuste ($R^2=0,99$). Esto se visualiza en la **Figura 30** donde se han incluido la totalidad de datos experimentales y los predichos por el modelo observándose una correlación muy buena.

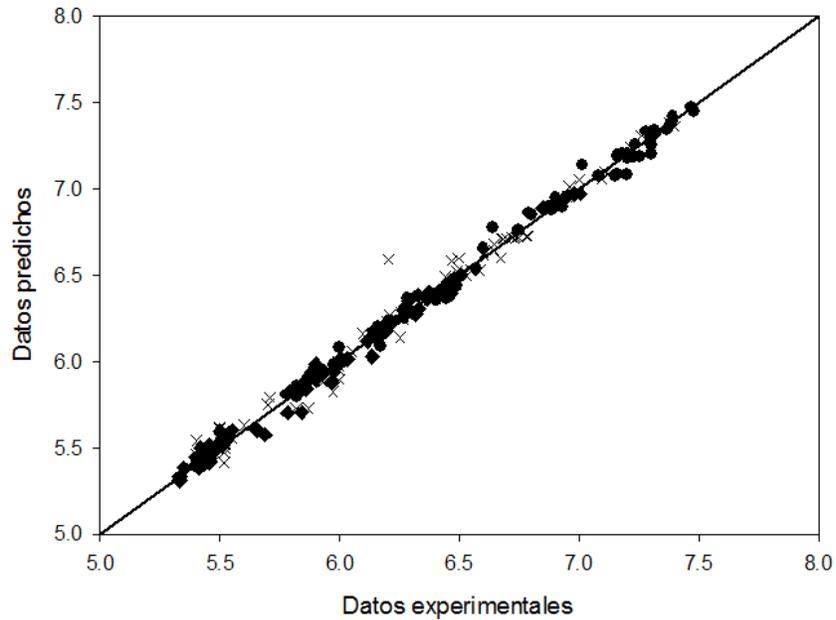


Figura 30. Correlación entre los datos experimentales y los predichos correspondientes a cél.mL^{-1} de *M. aeruginosa*. Los datos estimados fueron obtenidos de la aplicación de la Ecuación 3 para el crecimiento de *M. aeruginosa* a ● 26°C, x 30°C; ◆ 36°C.

Retomando los resultados anteriores, se observó que, a todas las temperaturas ensayadas, la intensidad de la irradiación influyó en los valores de la velocidad de crecimiento de *M. aeruginosa*. A mayor irradiación fue mayor la velocidad de crecimiento observándose este patrón de modo más significativo a 26 y 30°C. Esto pudo haber sido debido a que el aumento de la irradiación, en un rango de baja irradiación, estimula el proceso de fotosíntesis, aunque en un rango de alta irradiación, el efecto no sería tan importante (Contreras-Flores y col., 2003). En este sentido, Jiang y col. (2007) encontraron que entre 60-300 $\mu\text{molE m}^{-2}\text{s}^{-1}$ la irradiación estimula el crecimiento de *M. aeruginosa* y a mayores intensidades, es inhibido. Deblois y Juneau (2010) hallaron que, a baja intensidad de irradiación ($<136 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$), el crecimiento de *M. aeruginosa* fue limitado por este factor y a altas intensidades (272-820 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$), no hubo efectos significativos en el crecimiento. En el trabajo realizado por Yang y col. (2012), que estudiaron el crecimiento de *M. aeruginosa* a 25 y 30°C a 35 y 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (ciclo 12:12 horas), observaron que los efectos de la temperatura dependían de la irradiación.

Por otra parte, la fase de latencia estuvo influenciada por las relaciones N:P. Se observó que a 26°C el exceso de N disponible permite disminuir el valor de LPD, sin embargo, a temperaturas más altas no se observó este efecto y el valor de LPD, fue de 1 día aproximadamente. Esto indicaría que la temperatura más alta permite disminuir el valor de LPD independientemente de la relación N:P. Yang y col. (2012) mencionan que tanto el N como la irradiación influyen en la producción de polisacáridos y que el crecimiento de *M. aeruginosa* fue inhibido en condiciones de baja concentración de N, en base a experimentos con concentraciones de 0,26; 2,55 y 25,47 mg.L⁻¹. En los trabajos de Brookes y Ganf (2001) y Yang y col. (2012), observaron que bajo condiciones de alta concentración de nitrógeno; la intensidad luminosa más alta parece mejorar el crecimiento de *M. aeruginosa*, independientemente de la temperatura. En la presente Tesis Doctoral, se observaron pequeños aumentos de las velocidades de crecimiento bajo condiciones de exceso de N, aunque no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Respecto a los valores de MPD, se observó un efecto negativo de la intensidad de irradiación que puede ser debida a las condiciones previas de aclimatación de la cepa al laboratorio que se realiza a baja intensidad de irradiación. Según afirma Jiang y col. (2012), la mayoría de las cianobacterias (especialmente cepas de laboratorio) prefieren una baja irradiación y son extremadamente susceptibles a la fotoinhibición. Además, es posible que la densidad celular y la no conformación de colonias típicas genere poco autosombreado y protección entre las células generando efectos nocivos de las altas irradiaciones. Este proceso depende de la intensidad de la luz incidente, el tiempo de exposición y la longitud de onda (Walsh y col., 1997). Además, la MPD disminuyó al aumentar la temperatura; particularmente, esto fue observado a 36°C. Como mencionan Jiang y col. (2012), existe un complejo sinérgico entre los factores que influye en el crecimiento de *M. aeruginosa*. Según, Robarts y Zohary (1987), la tasa de fotosíntesis, la tasa de respiración específica y la tasa de crecimiento serían independientes de la temperatura en los cultivos de luz limitada, mientras que en los cultivos de *Microcystis* con luz saturada, estos parámetros dependerían de la temperatura. Esto indicaría que el crecimiento de *Microcystis* está limitado por las bajas temperaturas con mayor severidad que en los otros géneros de cianobacterias que forman la floración (Šejnohová, 2008).

Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre la producción de clorofila-a

En la **Figura 31**, se observa la variación de los datos experimentales de clo-a bajo los diferentes tratamientos de irradiación y relación N:P a una temperatura constante de 26°C. Al comenzar los experimentos a 26°C, la clo-a estuvo comprendida entre 948,2-1928,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ y, al finalizar, alcanzó valores entre 9851- 22335 $\mu\text{g.L}^{-1}$, incrementándose la concentración inicial entre 7 y 22 veces (**Figura 31**).

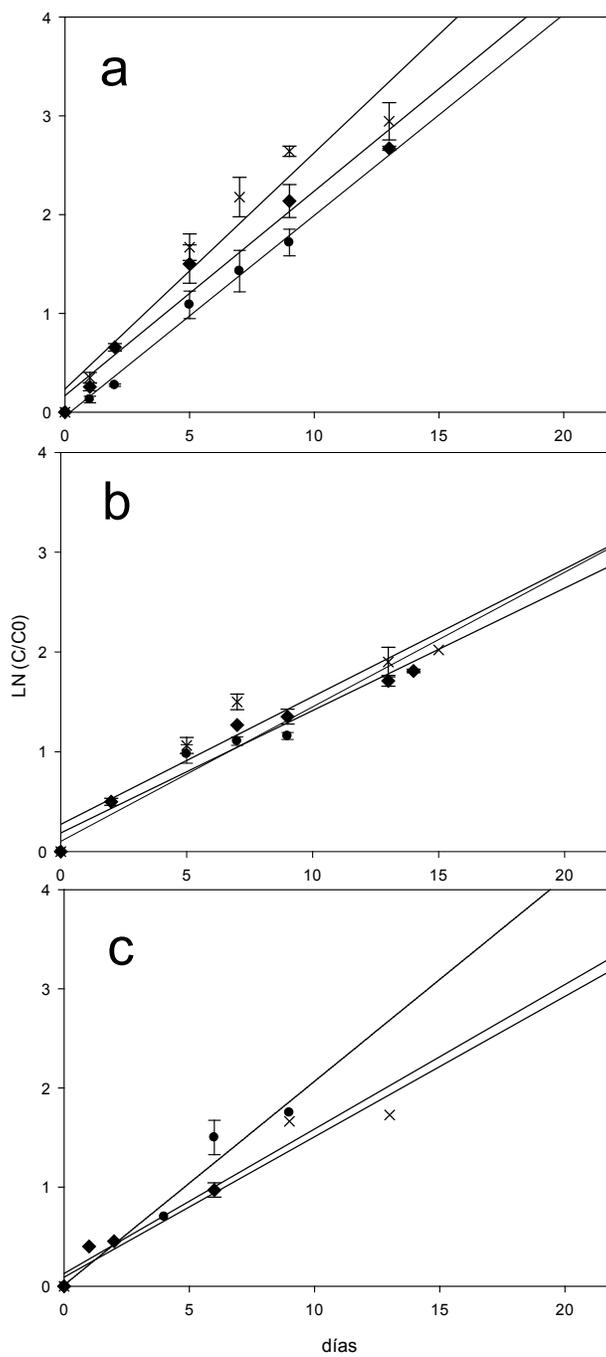


Figura 31. Variación de los niveles de clo-a durante la incubación a 26°C. a) 30 μmol fotones m⁻².s⁻¹; b) 50 μmol fotones m⁻².s⁻¹; c) 70 μmol fotones m⁻².s⁻¹; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150. Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

En la **Figura 31**, se observa, además, la aplicación del modelo lineal (**Ecuación 18**) que se ajustó adecuadamente a los datos experimentales (líneas llenas) con coeficientes de determinación R^2 entre 0,9107-0,9885. Además, la **Tabla 11** muestra las constantes k_0 halladas, el tiempo para duplicar la concentración de clo-a inicial y los valores de los coeficientes de correlación (R^2).

Tabla 11: Parámetros obtenidos de la aplicación de la ecuación de pseudo-primer orden de cinética de clo-a a los datos experimentales.

26°C		k_0 (d ⁻¹)	R^2	td_{clo-a} (d)
30 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	0,20±0,07 ^a	0,99	3,41±0,05 ^a
	NP100	0,23±0,08 ^a	0,94	2,90±0,05 ^a
	NP150	0,21±0,09 ^a	0,96	3,35±0,06 ^a
50 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	0,16±0,09 ^a	0,91	4,48±0,06 ^b
	NP100	0,15±0,06 ^a	0,91	4,68±0,04 ^b
	NP150	0,14±0,09 ^a	0,96	4,86±0,06 ^b
70 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	0,21±0,04 ^a	0,95	3,37±0,03 ^b
	NP100	0,14±0,08 ^a	0,93	4,89±0,05 ^b
	NP150	0,15±0,07 ^a	0,93	4,76±0,05 ^b

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

No se hallaron diferencias significativas ($p=0,0694$) entre las concentraciones de clo-a (ver **Tabla A2** en Anexos) entre los tratamientos a 26°C. Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los k_0 entre tratamientos de irradiación ($p=0,12$) ni entre tratamientos de N:P ($p=0,79$).

Por otra parte, se hallaron diferencias muy significativas entre los valores de td_{clo-a} entre tratamientos de irradiación ($p=5,49\cdot 10^{-7}$) entre 30-50 μmol fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p=1,29\cdot 10^{-4}$) y entre 30-70 μmol fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p=1,58\cdot 10^{-4}$). Los mayores valores de td_{clo-a} fueron a 50 y 70 μmol fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, aproximadamente 2 veces mayores que a 30 μmol fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente. Esto pudo deberse al efecto que ejercen las mayores irradiaciones sobre la síntesis de clo-a ya que la cepa de laboratorio se encuentra aclimatada a bajos valores de irradiación por lo que los altos valores pueden afectar la producción de este metabolito. En el caso del tratamiento a irradiación de 70 μmol fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, el valor de td_{clo-a} más elevado puede

vincularse al descenso de la MPD a irradiancias elevadas, es decir que el td_{clo-a} puede estar vinculado a un descenso del recuento de células. Sin embargo, la clo-a es un metabolito vinculado no solo a la biomasa sino al estado fisiológico de la cianobacteria por lo que, además del descenso de la población, puede existir un efecto sobre la misma producción de clo-a.

Respecto a la comparación de los valores de td_{clo-a} entre los niveles de relación N:P a 26°C, no se hallaron diferencias significativas ($p=0,221$).

En la **Figura 32**, se observa la variación de los datos experimentales de clo-a bajo los diferentes tratamientos de irradiación y relación N:P a una temperatura constante de 30°C. Al comenzar los experimentos a 30°C, la clo-a estuvo comprendida entre 695-1470 $\mu\text{g.L}^{-1}$ y al finalizar, alcanzó valores entre 4688-19122 $\mu\text{g.L}^{-1}$, incrementándose la concentración inicial entre 8 y 13 veces (**Figura 32**).

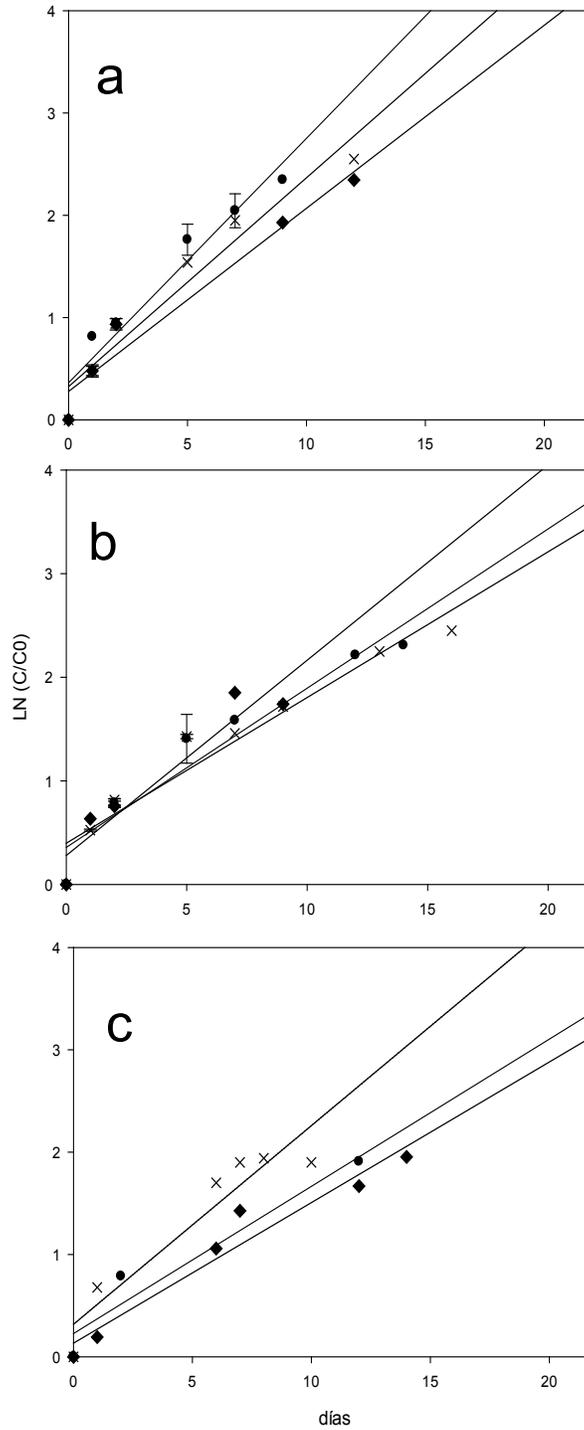


Figura 32. Variación de los niveles de clo-a durante la incubación a 30°C. a) 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; b) 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; c) 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; • N:P 10; x N:P 100; ♦ N:P 150. Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

En la **Figura 32**, además, se observa la aplicación del modelo lineal (**Ecuación 18**) que ajustó adecuadamente a los datos experimentales (líneas llenas) con coeficientes de determinación R^2 entre 0,9051-0,9546. La **Tabla 12** muestra las constantes k_0 halladas, el tiempo para duplicar la concentración de clo-a inicial (td_{clo-a}) y los valores de los coeficientes de correlación (R^2).

Tabla 12: Parámetros obtenidos de la aplicación de la ecuación de pseudo-primer orden de cinética de clo-a a los datos experimentales.

30°C		k_0 (d ⁻¹)	R^2	td_{clo-a} (d)
30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	0,2390±0,09 ^a	0,9345	2,900±0,06 ^a
	NP100	0,2041±0,08 ^a	0,9377	3,396±0,05 ^a
	NP150	0,1790±0,09 ^a	0,9546	3,872±0,06 ^a
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	0,1537±0,09 ^a	0,9266	4,510±0,06 ^b
	NP100	0,1506±0,09 ^a	0,9330	4,603±0,06 ^b
	NP150	0,1485±0,08 ^a	0,9051	4,668±0,05 ^b
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	0,1639±0,07 ^a	0,9306	4,229±0,05 ^b
	NP100	0,1941±0,07 ^a	0,9457	3,571±0,05 ^b
	NP150	0,1374±0,08 ^a	0,9471	5,045±0,05 ^b

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

No se hallaron diferencias significativas ($p=0,055$) entre las concentraciones de clo-a (ver **Tabla A5** en Anexos) entre los tratamientos a 30°C. Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los k_0 entre tratamientos de irradiación ($p=0,274$) ni entre tratamientos de N:P ($p=0,658$).

Por otra parte y de modo similar que a 26°C, se hallaron diferencias muy significativas entre los td_{clo-a} entre tratamientos de irradiación ($p=1,84\cdot 10^{-5}$) entre 30-50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p=1,43\cdot 10^{-4}$) y entre 30-70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p=8,75\cdot 10^{-4}$). Los mayores valores de td_{clo-a} ocurrieron a 50 y 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo aproximadamente 2 veces mayores que a 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Esto pudo deberse, al igual que a 26°C, a un efecto de las altas intensidades de irradiación a la cepa debido a que se encuentra aclimatada a condiciones de laboratorio de baja irradiación. Respecto a la comparación de los td_{clo-a} entre tratamientos N:P, no se hallaron diferencias significativas ($p=0,05$). Raps y col. (1983) observaron que, en

medio BG11 a 29°C y en un rango de irradiación de 20-565 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la producción de clo-a disminuía al incrementarse la intensidad de irradiación. Similares resultados fueron observados en Myers y Kratz (1955) y Vierling y Alberte (1980) así como en la presente Tesis Doctoral.

En la **Figura 33**, se observa la variación de los datos experimentales de clo-a bajo los diferentes tratamientos de irradiación y relación N:P a una temperatura constante de 36°C. Al comenzar los experimentos a 36°C, la clo-a estuvo comprendida entre 888-1802 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y al finalizar, alcanzó valores entre 3366-14855 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, incrementándose la concentración inicial entre 4 y 15 veces (**Figura 33**).

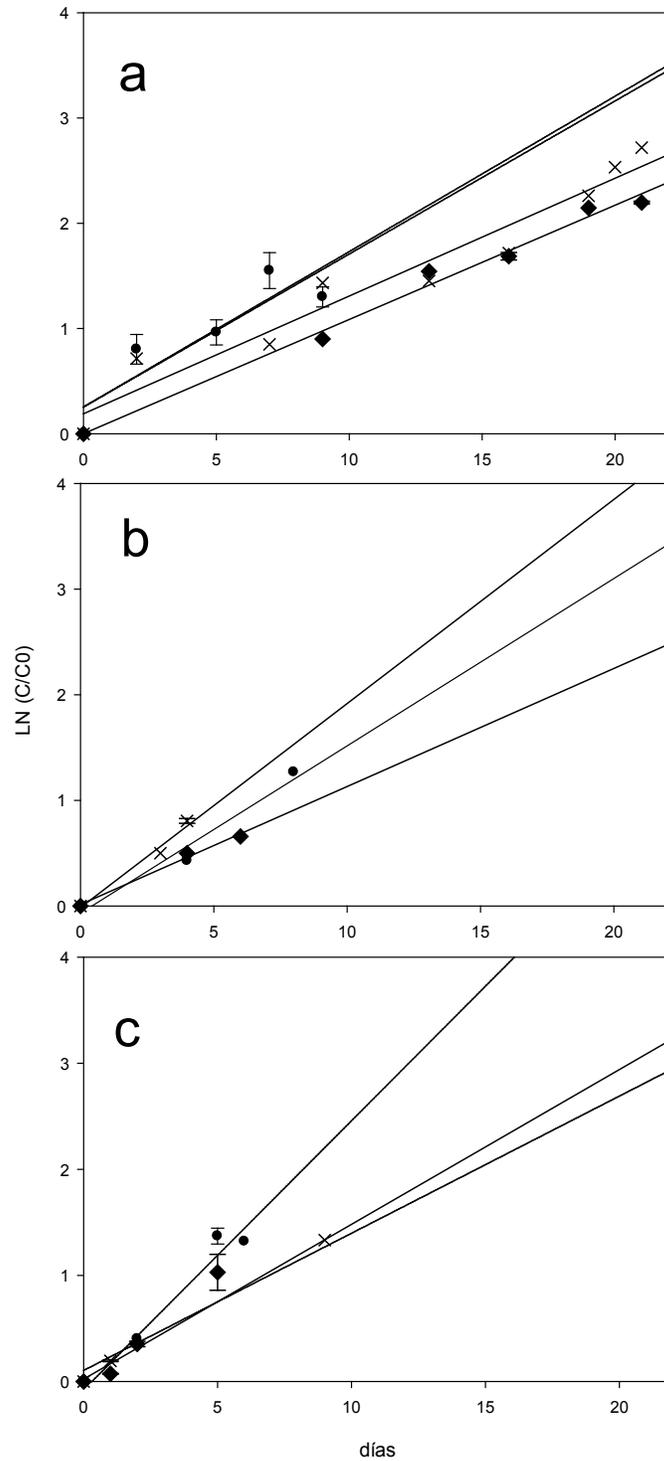


Figura 33. Variación de los niveles de clo-a durante la incubación a 36°C. a) 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; b) 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; c) 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; • N:P 10; x N:P 100; ♦ N:P 150. Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

En la **Figura 33**, también se muestra la aplicación del modelo lineal (**Ecuación 18**) que ajustó adecuadamente a los datos experimentales (líneas llenas) con coeficientes de determinación R^2 entre 0,929-0,999. La **Tabla 13** muestra las constantes k_0 halladas, el tiempo para duplicar la concentración de clo-a inicial (td_{clo-a}) y los valores de los coeficientes de correlación (R^2).

Tabla 13: Parámetros obtenidos de la aplicación de la ecuación de pseudo-primer orden de cinética de clo-a a los datos experimentales.

36°C		k_0	R^2	td_{clo-a} (d)
30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	NP10	0,1455±0,10 ^a	0,9290	4,764±0,07 ^a
	NP100	0,1119±0,09 ^a	0,9459	6,194±0,06 ^a
	NP150	0,1085±0,08 ^a	0,9887	6,388±0,05 ^a
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	NP10	0,1585±0,09 ^a	0,9662	4,373±0,06 ^a
	NP100	0,1933±0,10 ^a	0,9799	3,586±0,07 ^a
	NP150	0,1118±0,08 ^a	0,9896	6,200±0,05 ^a
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	NP10	0,2537±0,09 ^a	0,9628	2,732±0,06 ^b
	NP100	0,1459±0,08 ^a	0,9989	4,751±0,05 ^b
	NP150	0,2153±0,10 ^a	0,9836	3,219±0,07 ^b

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

No se hallaron diferencias significativas ($p=0,105$) entre las concentraciones de clo-a (ver **Tabla A8** en Anexos) entre los tratamientos a 36°C. Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los k_0 entre tratamientos de irradiación ($p=0,135$) ni entre tratamientos de N:P ($p=0,575$).

Por otro lado, se hallaron diferencias significativas entre los td_{clo-a} entre tratamientos de irradiación ($p=6,92 \cdot 10^{-6}$) entre 30-70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p=1,32 \cdot 10^{-4}$) y entre 50-70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p=1,21 \cdot 10^{-3}$). Los mayores valores de td_{clo-a} ocurrieron a 30 y 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, siendo entre aproximadamente 2 veces mayores que a 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los valores de td_{clo-a} más bajos a alta irradiación coincidieron con las velocidades de crecimiento (μ) más altas de las células a 36°C así como con los valores de LPD y de MPD más bajos. Bajo este tratamiento pudo haber ocurrido un rápido crecimiento conjuntamente con una rápida producción de clo-a y una posterior fotoinhibición. Respecto a

la comparación de los valores de td_{clo-a} entre los diferentes tratamientos N:P, no se hallaron diferencias significativas ($p=0,06$) entre ellos.

Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre los valores de Q_{clo-a}

El parámetro cuota (Q_{clo-a}) se refiere a la cantidad de clo-a que produce cada célula de *M. aeruginosa*. Se obtiene del cociente entre la cantidad de clo-a y el número de células. Este parámetro permite evaluar las consecuencias de las variaciones de temperatura sobre la producción de clo-a de cada célula, pudiéndose interpretar como una respuesta de tipo fisiológica a las condiciones del medio.

Respecto a los valores de Q_{clo-a} por célula bajo los diferentes niveles de irradiación y relación N:P a una temperatura constante de 26°C, los valores iniciales estuvieron comprendidos entre 0,55-2,92 pg.cél⁻¹ y los finales, entre 0,68-0,07 pg.cél⁻¹ (**Figura 34**). En la **Figura 34**, puede observarse que las curvas de crecimiento y el cálculo de Q_{clo-a} variaron entre 9 y 20 días cuyas diferencias son atribuidas a las condiciones del ensayo.

Se hallaron diferencias muy significativas en los valores de Q_{clo-a} entre tratamientos de irradiación ($p=9,12 \cdot 10^{-11}$): entre 30-50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=1,19 \cdot 10^{-4}$) y entre 50-70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=1,19 \cdot 10^{-4}$); siendo los valores de Q_{clo-a} a 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ los más altos (0,50-3,00 pg.cél⁻¹). En este nivel de irradiación, los valores iniciales de Q_{clo-a} fueron los más elevados y fueron disminuyendo al final de la curva de crecimiento hasta 5 veces, aproximadamente (de 5,00 a 3,00 pg.cél⁻¹). A 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, si bien los Q_{clo-a} iniciales fueron elevados, en general se incrementaron en la fase exponencial tardía, más notoriamente a N:P de 10 (1,0 a 1,5 pg.cél⁻¹).

A 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, los Q_{clo-a} iniciales también fueron elevados y para las relaciones N:P10 y N:P150 los Q_{clo-a} fueron disminuyendo y alcanzaron los valores más bajos (0,07 y 0,31 pg.cél⁻¹, respectivamente). A niveles de N:P 100, los valores de Q_{clo-a} aumentaron hacia la fase exponencial tardía. En todas las curvas de crecimiento a 26°C es posible que los valores elevados de Q_{clo-a} iniciales se deban a la fase previa de aclimatación de los cultivos. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en los valores de Q_{clo-a} entre tratamientos de N:P ($p=0,8763$).

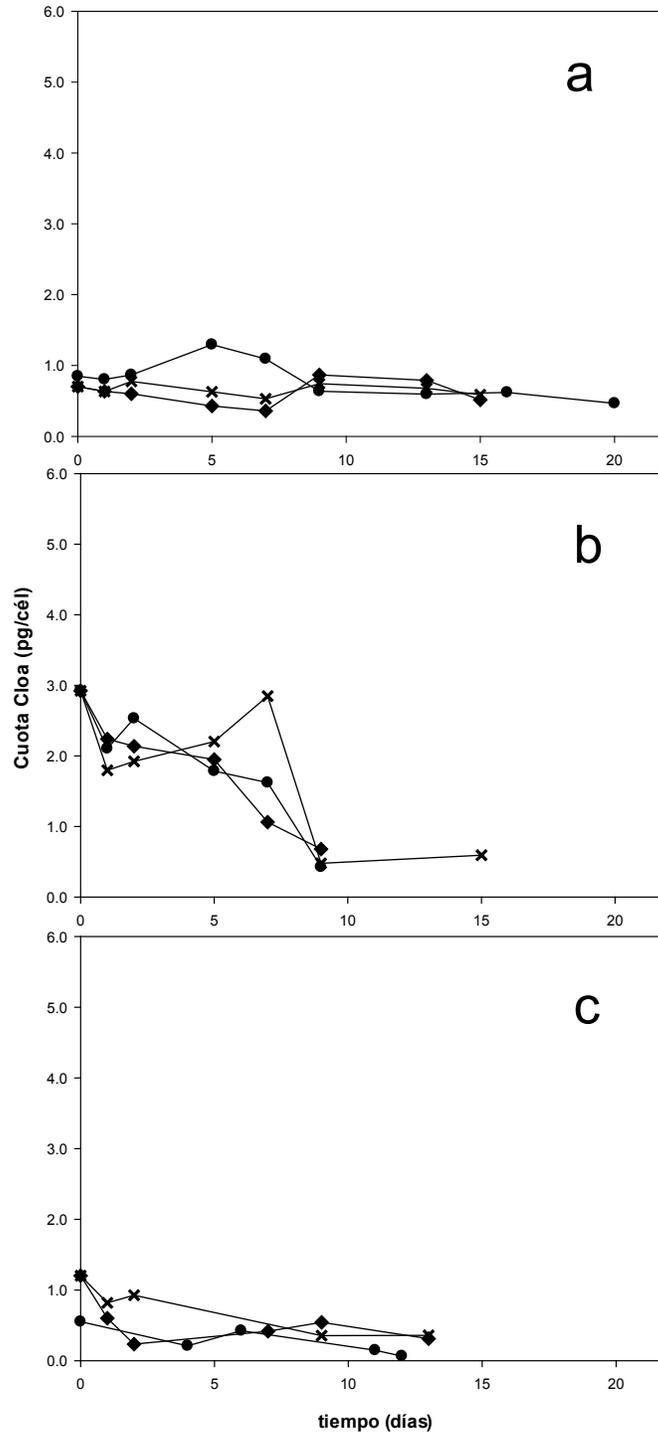


Figura 34: Evolución de $Q_{\text{clo-a}}$ por célula a 26°C . a) $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; b) $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; c) $70 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150.

Los valores de cuotas de $Q_{\text{clo-a}}$ por célula bajo los diferentes niveles de irradiación y relación N:P a una temperatura constante de 30°C tuvieron valores iniciales entre 0,66-4,48 pg.cél⁻¹ y finales entre 0,42-3,13 pg.cél⁻¹ (**Figura 35**). En la **Figura 35**, puede observarse que las curvas de crecimiento y el cálculo de $Q_{\text{clo-a}}$ variaron entre 7 y 16 días cuyas diferencias son atribuidas a las condiciones del ensayo.

Se hallaron diferencias muy significativas entre los valores de $Q_{\text{clo-a}}$ entre tratamientos de irradiación ($p=1,77.10^{-4}$): entre 30-70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($p=2,89.10^{-4}$) y entre 50-70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($p=7,47.10^{-4}$); siendo los valores de $Q_{\text{clo-a}}$ a 30 y 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ los más altos (entre 2,00 y 4,00 pg.cél⁻¹) (**Figura 35a, 35b**). En estos niveles de irradiación, los valores iniciales fueron los más elevados y fueron disminuyendo al final de la curva de crecimiento hasta 2 veces, aproximadamente. A 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y N:P 10, los $Q_{\text{clo-a}}$ fueron relativamente bajos como a irradiación 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; en cambio, a 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y relación N:P100 y 150 se observaron valores entre 3 y 6 veces mayores que a N:P 10. A 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y relación NP:100, se observó una disminución inicial de $Q_{\text{clo-a}}$ y un incremento hacia la fase exponencial tardía; en cambio para N:P150 hubo un incremento en la fase de latencia y en la exponencial inicial. A 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (**Figura 35b**), los $Q_{\text{clo-a}}$ disminuyeron en la fase de latencia y se incrementaron en la fase exponencial con valores similares para todas las relaciones N:P. Finalmente para 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (**Figura 35c**), los $Q_{\text{clo-a}}$ fueron relativamente bajos aumentan en la fase exponencial y disminuyeron hacia la fase estacionaria. Del mismo modo que en lo hallado en las curvas a 26°C, a 30°C también es posible que los valores elevados de $Q_{\text{clo-a}}$ iniciales se deban a la fase previa de aclimatación de los cultivos. Raps y col. (1983) observaron un valor de cuota máximo ($1,30 \text{ mol}.10^{-16}$) bajo irradiación de 40 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por encima y por debajo de esta irradiación, el $Q_{\text{clo-a}}$ disminuyó. Según Raps y col. (1983), *M. aeruginosa* responde a baja irradiación aumentando la eficiencia del uso de la luz. En la presente Tesis Doctoral, se hallaron similares resultados, observándose una disminución de $Q_{\text{clo-a}}$ a alta intensidad de irradiación (70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en los valores de $Q_{\text{clo-a}}$ entre tratamientos de N:P ($p=0,878$).

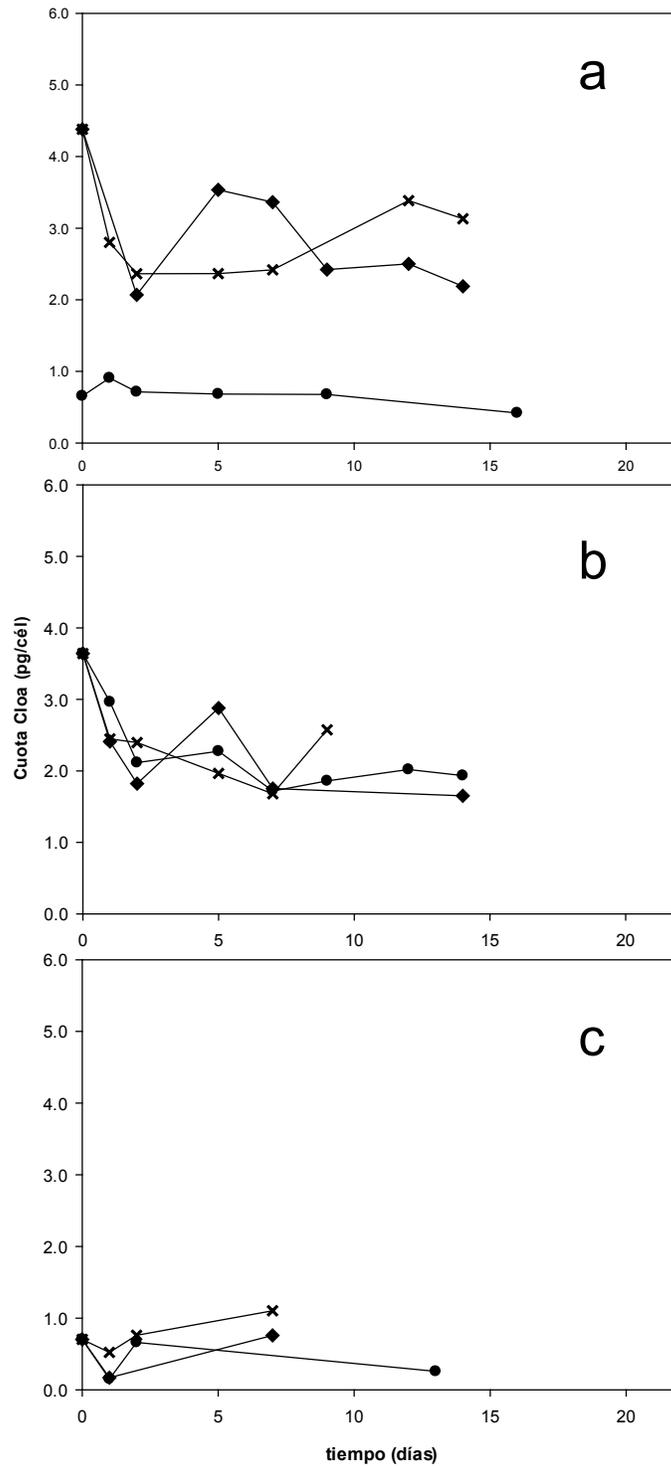


Figura 35: Evolución de Q_{clo-a} por célula a 30°C. a) 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; b) 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; c) 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150.

Los valores de $Q_{\text{clo-a}}$ por célula, bajo los diferentes niveles de irradiación y relación N:P a una temperatura constante de 36°C, presentaron niveles iniciales entre 1,8471-5,000 pg.cél^{-1} y finales entre 0,22-5,79 pg.cél^{-1} (**Figura 36**). En la **Figura 36**, puede observarse que las curvas de crecimiento y el cálculo de $Q_{\text{clo-a}}$ variaron entre 9 y 20 días cuyas diferencias son atribuidas a las condiciones del ensayo. Se hallaron diferencias significativas entre tratamientos de irradiación ($p=0,020$): entre 30-50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($p=0,030$) y entre 50-70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($p=0,038$); siendo los valores de $Q_{\text{clo-a}}$ a 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ relativamente más altos (**Figura 36b**). A este nivel de irradiación, los valores iniciales fueron altos (5,00 pg.cél^{-1}) y fueron descendiendo hacia la fase estacionaria alcanzando valores de 1,00 pg.cél^{-1} aproximadamente. A 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (**Figura 36a**), los valores iniciales estuvieron comprendidos entre 2,00-3,50 pg.cél^{-1} . A N:P 10, el cuota de clo-a por célula fue disminuyendo hasta la fase estacionaria alcanzando un valor de 0,50 pg.cél^{-1} aproximadamente. A niveles de N:P de 100 y 150, el valor inicial de $Q_{\text{clo-a}}$ fue de 3,50 pg.cél^{-1} que disminuyó en la fase exponencial media y, posteriormente, se incrementó hacia la fase estacionaria. Finalmente, para el tratamiento de irradiancia 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (**Figura 36c**), el valor inicial de $Q_{\text{clo-a}}$ fue de 3,500 pg. cél^{-1} que disminuyó hacia la fase estacionaria, alcanzando valores entre 0,22-0,95 pg.cél^{-1} . Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en los valores de $Q_{\text{clo-a}}$ entre tratamientos de N:P ($p=0,467$).

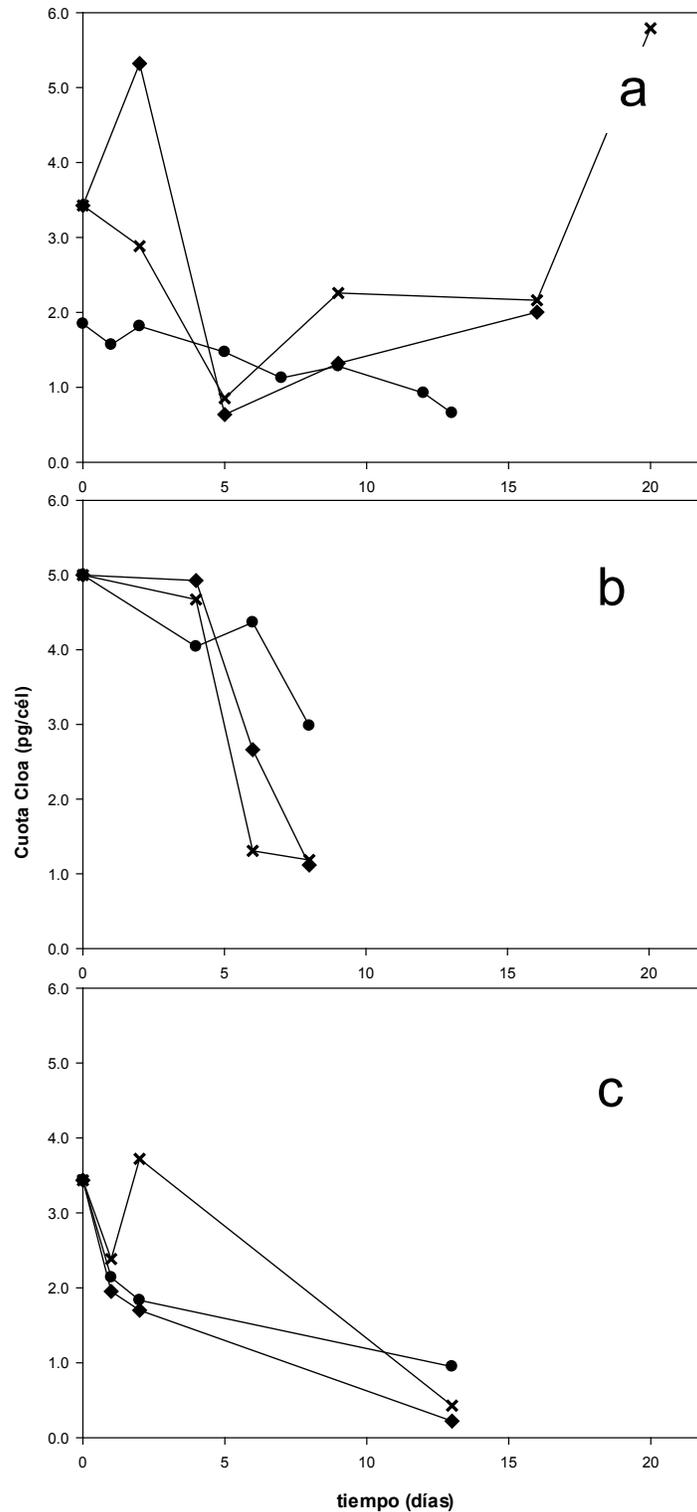


Figura 36: Evolución de Q-Clo-a por célula a 30°C. a) 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; b) 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; c) 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150.

Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre la producción de microcistina-LR

En la **Figura 37**, se observan los datos experimentales de la producción de MCs en un cultivo de *M. aeruginosa* a las distintas intensidades de irradiación y relación N:P a temperatura constante de 26°C, en condiciones de laboratorio. A 26°C, los valores iniciales de producción [D-Leu¹] MC-LR variaron entre 17-150 µg.L⁻¹; correspondientes a los valores de toxina de los inóculos de *M. aeruginosa*. Al finalizar el experimento (13-20 días), los valores de [D-Leu¹] MC-LR variaron entre 62-958 µg.L⁻¹. En todas las curvas de crecimiento, se observó un incremento de la producción de MCs respecto al valor inicial hacia la fase exponencial, alcanzando la máxima producción en la fase exponencial tardía o estacionaria (11-16 días) y, en algunos casos, posteriormente decreció. Esta observación ha sido reportada por otros autores (Gorham, 1964; Eloff y Westhuizen, 1981; Watanabe y Oishi, 1983; Watanabe y col., 1989).

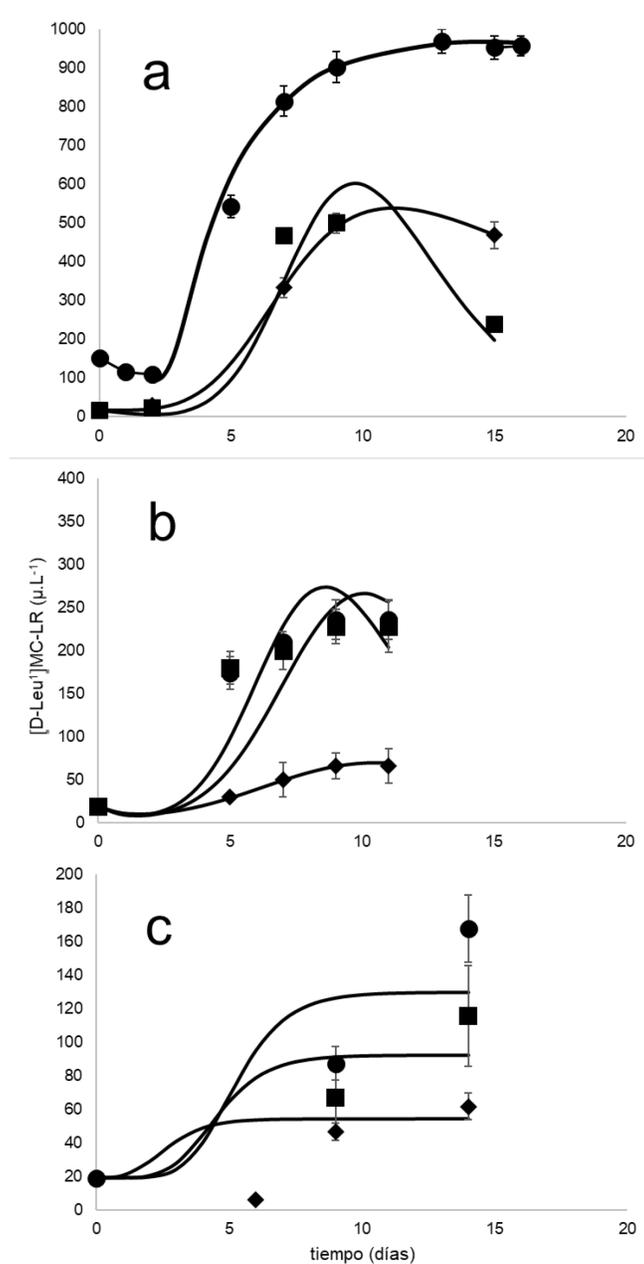


Figura 37: Modelado de la producción de [D-Leu¹] MC-LR en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden a la aplicación del modelo (Ecuación 24) de los datos experimentales a 26°C. a) 30 µmol fotones m⁻².s⁻¹; b) 50 µmol fotones m⁻².s⁻¹; c) 70 µmol fotones m⁻².s⁻¹; ● N:P 10; ■ N:P 100; ◆ N:P 150. Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

En la **Figura 37**, también se presenta la aplicación de la **Ecuación 21** (modelo de producción de toxina propuesto) para las curvas de crecimiento ensayadas a 26°C (líneas llenas). Asimismo, los parámetros

obtenidos coeficiente de producción (p) y la tasa de depleción (d_M) obtenidos al aplicar el modelo de producción de toxina se presentan en la **Tabla 14**. Se obtuvieron buenos coeficientes de determinación ($R^2=0,830-0,999$).

Tabla 14: Parámetros estimados de la aplicación del modelo de producción de MC a los datos experimentales, coeficiente de producción de [D-Leu¹] MC-LR (p) y tasa de reducción de [D-Leu¹] MC-LR (d_M).

26°C		p (fg.cél ⁻¹)	d_M (d ⁻¹)	R ²
30 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P10	63,89±3,68 ^a	1,37.10 ² ±6,19.10 ² ^a	0,987
	N:P100	9,86.10 ⁵ ±1,10.10 ⁶ ^b	5,91.10 ¹ ±3,50.10 ² ^a	0,954
	N:P150	3,54.10 ⁵ ±2,16.10 ⁶ ^b	7,23.10 ² ±3,67.10 ³ ^a	0,999
50 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P10	8,66.10 ⁵ ±3,60.10 ⁶ ^b	7,53.10 ¹ ±1,09.10 ² ^b	0,904
	N:P100	8,85.10 ⁵ ±5,90.10 ⁷ ^b	1,00±0,00 [†]	0,830
	N:P150	2,29.10 ⁵ ±6,80.10 ⁶ ^b	1,00±0,00 [‡]	0,997
70 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P10	5,37.10 ⁶ ±2,98.10 ⁷ ^b	1,70.10 ¹ ±3,61.10 ³ ^a	0,855
	N:P100	5,03.10 ⁶ ±4,62.10 ⁷ ^b	2,52.10 ¹ ±7,49.10 ² ^a	0,870
	N:P150	5,33.10 ⁶ ±4,68.10 ⁷ ^b	2,96.10 ¹³ ±2,98.10 ¹⁴ ^a	0,937

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

Se observaron diferencias muy significativas ($p=2,41.10^{-4}$) entre la producción de toxina a relación N:P 10 y 30 μmol fotones m².s⁻¹ y las curvas a N:P 150 y 50 μmol fotones m².s⁻¹; N:P 10, 100 y 150 y 70 μmol fotones m².s⁻¹ (ver **Tabla A3** en Anexos), siendo a relación N:P 10 y 30 μmol fotones m².s⁻¹ mayores los valores de producción de MCs.

Por otra parte, respecto a la intensidad de irradiación, se observaron diferencias muy significativas en la producción de MC ($p=1,83.10^{-4}$) entre 30 y 50 μmol fotones m².s⁻¹ ($p=5,25.10^{-3}$) y entre 30 y 70 μmol fotones m².s⁻¹ ($p=4,62.10^{-3}$). A baja intensidad de irradiación (30 μmol fotones m².s⁻¹), se observó la mayor producción de MCs, entre 4-8 veces más que a alta irradiación (70 μmol fotones m².s⁻¹).

Respecto a la relación N:P, también se observaron diferencias significativas en la producción de MC-LR entre los tratamientos ($p=0,01$), entre N:P de 10 y 150 ($p=0,02$). Bajo los menores valores de N (N:P 10), se observó una mayor producción de MCs, en promedio, de 4 veces.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los valores de p entre tratamientos de irradiación ($p=0,422$) y relación N:P ($p=0,422$). En los valores de d_M , se observaron diferencias significativas entre tratamientos de irradiación ($p=1,33 \cdot 10^{-3}$) entre 30 y 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=0,01$) y entre 50 y 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=3,52 \cdot 10^{-3}$). A irradiancia media (50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), se observaron los mayores d_M . Por otro lado, no hubo diferencias significativas en los d_M entre tratamientos de N:P ($p=0,80$).

En la **Figura 38**, se observan los datos experimentales de la producción de MCs en un cultivo *M. aeruginosa* bajo las distintas intensidades de irradiación y relación N:P a una temperatura constante de 30°C. A 30°C, los valores iniciales de producción [D-Leu¹] MC-LR variaron entre 17-106 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; correspondientes a los valores de toxina de los inóculos de *M. aeruginosa*. Al finalizar el experimento (13-20 días), los valores de [D-Leu¹] MC-LR variaron entre 47-430 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. En todas las curvas de crecimiento, se observó un incremento de la producción de MCs respecto a la inicial hacia la fase exponencial, alcanzando la máxima producción en la fase exponencial tardía o estacionaria (11-16 días).

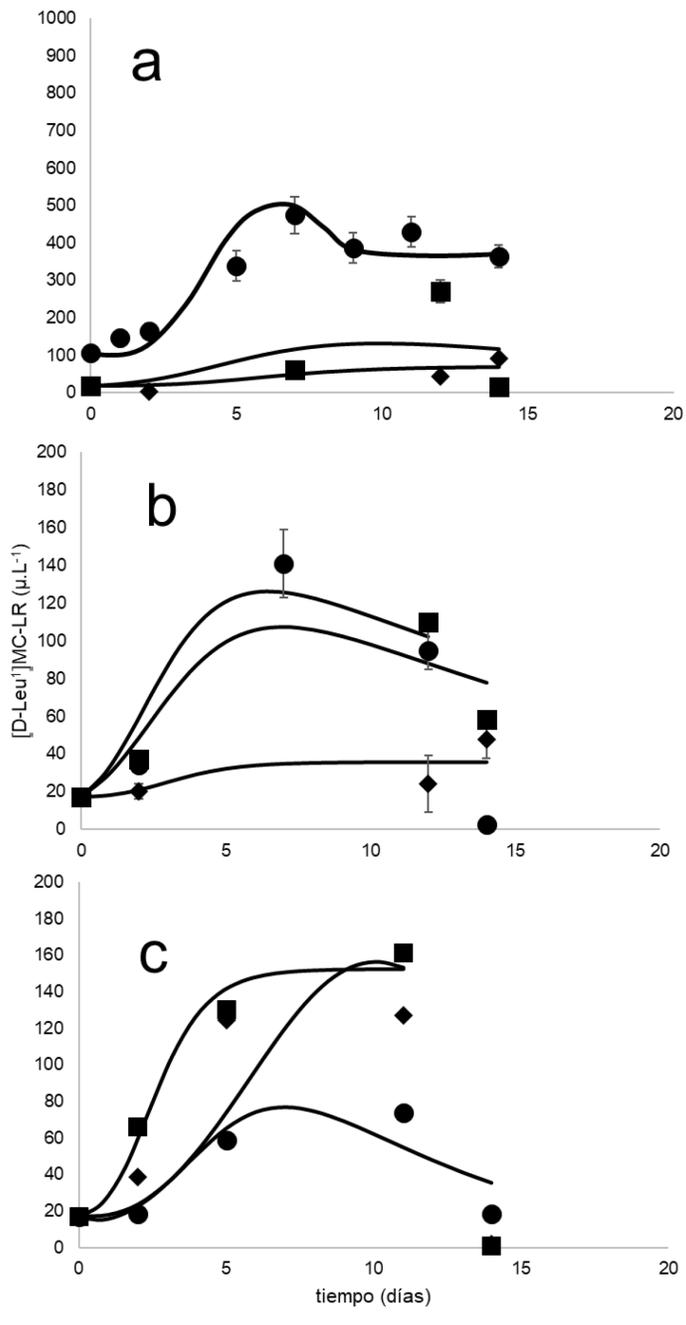


Figura 38: Modelado de la producción de [D-Leu¹] MC-LR en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden a la aplicación del modelo (Ecuación 24) de los datos experimentales a 30°C. a) 30 µmol fotones m⁻².s⁻¹; b) 50 µmol fotones m⁻².s⁻¹; c) 70 µmol fotones m⁻².s⁻¹; ● N:P 10; ■ N:P 100; ◆ N:P 150. Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

En la **Figura 38**, también se observa la aplicación de la **Ecuación 21** a los valores de producción de MC durante el crecimiento de *M. aeruginosa* ensayadas a 30°C (líneas llenas) y los parámetros obtenidos correspondientes a los coeficientes de producción (p) y a la tasa de depleción (d_M) se presentan en la **Tabla 15**. Se obtuvieron coeficientes de determinación que variaron entre $R^2=0,486-0,990$.

Tabla 15: Parámetros estimados de la aplicación del modelo a los datos experimentales, coeficiente de producción de [D-Leu¹] MC-LR (p) y tasa de reducción de [D-Leu¹] MC-LR (d_M).

30°C		p (fg.cél ⁻¹)	d_M (d ⁻¹)	R ²
30 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P10	27,9 ±8,05a	6,89.10 ⁻² ±4,88.10 ^{-2a}	0,917
	N:P100	3,26.10 ⁻⁵ ±8,59.10 ^{-6b}	6,69.10 ⁻² ±4,23.10 ^{-3a}	0,486
	N:P150	1,21.10 ⁻⁵ ±3,50.10 ^{-6b}	2,02.10 ⁻¹² ±3,45.10 ^{-13a}	0,797
50 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P10	3,66.10 ⁻⁵ ±1,23.10 ^{-6b}	5,51.10 ⁻² ±6,71.10 ^{-3a}	0,963
	N:P100	4,26.10 ⁻⁵ ±7,89.10 ^{-6b}	6,53.10 ⁻² ±5,23.10 ^{-4a}	0,898
	N:P150	3,71.10 ⁻⁶ ±6,21.10 ^{-8b}	2,54.10 ⁻¹¹ ±6,71.10 ^{-12a}	0,725
70 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P10	9,58.10 ⁻⁶ ±7,49.10 ^{-7b}	1,66.10 ⁻¹ ±7,83.10 ^{-2a}	0,882
	N:P100	1,29.10 ⁻⁵ ±1,21.10 ^{-6b}	4,60.10 ⁻¹² ±3,46.10 ^{-13a}	0,990
	N:P150	1,46.10 ⁻⁴ ±2,34.10 ^{-5b}	0,999±0,01 ^a	0,864

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

Se observaron diferencias muy significativas ($p=1,11.10^{-5}$) entre los valores de MC producida por *M. aeruginosa* durante su crecimiento en una relación de N:P 10 y 30 μmol fotones m².s⁻¹ y el resto de las curvas tuvieron valores de $p=8,90.10^{-4}-0,01$ (**Tabla A6**), siendo en la primera mayores los valores de producción de MCs.

Por otra parte, respecto a la intensidad de irradiación, se observaron diferencias muy significativas ($p=1,76.10^{-3}$) entre los valores de MC producidas en un cultivo a 30 y 50 μmol fotones m².s⁻¹ ($p=4,43.10^{-3}$) y entre 30 y 70 μmol fotones m².s⁻¹ ($p=8,89.10^{-3}$). A baja irradiación (30 μmol fotones m².s⁻¹), se observó la mayor producción de MCs, en promedio, entre 4-5 veces más que a alta irradiación.

Respecto a la relación N:P, también se observaron diferencias significativas en la producción de MC según los tratamientos ($p=0,02$), entre N:P10 y 150 ($p=0,02$). Bajo condiciones de deficiencia de N, se observó una mayor producción de MCs, en promedio, de 2-4 veces.

Por otra parte, no se hallaron diferencias significativas entre los valores de p y de d_M entre tratamientos de irradiación y N:P ($p=0,355-0,564$).

En la **Figura 39**, se observan los datos experimentales de la producción de MCs de *M. aeruginosa* a las distintas intensidades de irradiación y relación N:P a temperatura constante de 36°C, en condiciones de laboratorio. A 36°C, los valores iniciales de producción [D-Leu¹] MC-LR variaron entre 17-73 $\mu\text{g.L}^{-1}$; correspondientes a los valores de toxina de los inóculos de *M. aeruginosa*. Al finalizar el experimento (13-20 días), los valores de [D-Leu¹] MC-LR variaron entre 24-573 $\mu\text{g.L}^{-1}$. En todas las curvas de crecimiento, se observó un incremento de la producción de MCs respecto a la inicial hacia la fase exponencial (3-5 días).

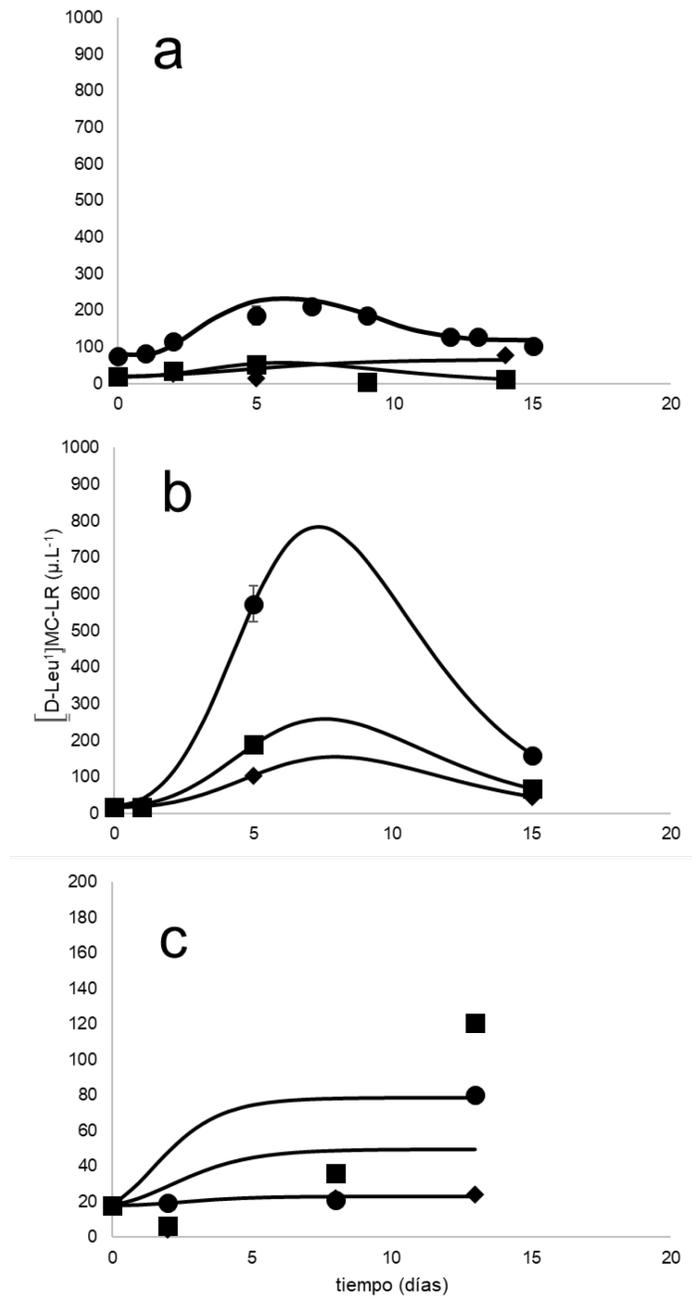


Figura 39: Modelado de la producción de [D-Leu¹] MC-LR en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden a la aplicación del modelo (Ecuación 24) de los datos experimentales a 36°C. a) 30 μmol fotones m⁻².s⁻¹; b) 50 μmol fotones m⁻².s⁻¹; c) 70 μmol fotones m⁻².s⁻¹; ● N:P 10; ■ N:P 100; ◆ N:P 150. Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

En la **Figura 39**, también se observa la aplicación de la **Ecuación 21** a la producción de MC por un cultivo de *M. aeruginosa* que crece a 36°C (líneas llenas). Los los parámetros obtenidos: coeficiente de producción (p) y la tasa de depleción (d_M) se observan en la **Tabla 16**. Se obtuvieron coeficientes de determinación ($R^2=0,601-0,999$).

Tabla 16: Parámetros estimados de la aplicación del modelo a los datos experimentales, coeficiente de producción de [D-Leu¹] MC-LR (p) y tasa de reducción de [D-Leu¹] MC-LR (d_M).

36°C		p (fg.cél ⁻¹)	d_M (d ⁻¹)	R ²
30 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P 10	31,35±2,4 ⁸	1,63.10 ¹ ±1,20.10 ^{3a}	0,926
	N:P 100	7,48.10 ⁵ ±3,40.10 ^{4b}	3,39.10 ¹ ± ^a	0,978
	N:P 150	1,87.10 ⁶ ±4,56.10 ^{6b}	2,33.10 ¹ ± ^a	0,819
50 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P 10	1,20.10 ⁶ ±5,69.10 ^{4b}	4,09.10 ¹ ±5,69.10 ^{3b}	0,999
	N:P 100	3,28.10 ⁴ ±1,24.10 ^{6b}	3,87.10 ¹ ±6,73.10 ^{2b}	0,999
	N:P 150	2,50.10 ⁴ ±3,45.10 ^{6b}	4,95.10 ¹ ±1,29.10 ^{3b}	0,999
70 μmol fotón m ² .s ⁻¹	N:P 10	2,37.10 ⁵ ±3,57.10 ^{6b}	2,23.10 ¹² ±2,51.10 ^{3a}	0,601
	N:P 100	7,70.10 ⁵ ±4,59.10 ^{6b}	4,26.10 ¹² ±2,98.10 ^{4a}	0,643
	N:P 150	2,45.10 ⁶ ±1,34.10 ^{7b}	2,24.10 ¹⁴ ±3,67.10 ^{5a}	0,952

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas.

No se observaron diferencias significativas ($p=0,07$) entre los valores de MC producidos por *M. aeruginosa* durante su crecimiento a 36°C bajo los tratamientos de diferente irradiación y relación N:P (ver **Tabla A9** en Anexos).

Por otra parte, respecto a la intensidad de irradiación, no se observaron diferencias significativas entre los valores de MC hallados ($p=0,192$). No obstante, sí se observaron diferencias significativas en los valores de MC según los tratamientos de relación N:P ($p=0,02$), entre N:P10 y 150 ($p=0,03$). A relación N:P, se observó una mayor producción de MCs, en promedio, de 3-4 veces.

Por otra parte, no se hallaron diferencias significativas en los valores de p entre tratamientos a diferentes niveles de irradiación (0,422) y N:P (0,422). Respecto a d_M , se hallaron diferencias entre tratamientos de irradiación ($p=6,33 \cdot 10^{-3}$) entre 30 y 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=0,04$) y entre 50 y 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=5,48 \cdot 10^{-3}$). A irradiancia media, se observaron los mayores d_M . Por otro lado, no hubo diferencias significativas en los d_M entre tratamientos de N:P ($p=0,923$).

Como se expuso y discutió previamente sobre los resultados de producción de MCs, en los anteriormente presentados también se observó que al incrementarse la temperatura disminuye la concentración de MC. Además, se observaron efectos en la producción de toxina vinculadas a la intensidad de irradiación y la relación N:P.

Con respecto a la irradiación, en la literatura científica, los resultados presentan controversias. Los primeros estudios revelaron que no existen grandes diferencias en la toxicidad para *Microcystis* cultivadas bajo diferentes irradiaciones (Gorham, 1964; Cood y Poon, 1988). Posteriormente, algunos trabajos mostraron que los bajos niveles de irradiación disminuyen los niveles de producción de toxina (van der Westhuizer y Eloff, 1985; Watanabe y Oishi, 1985; Utkilen y Gjølme, 1995 y Cárdenas, 2008), y otros, que, por el contrario, la producción de MCs se incrementa a baja irradiación (Jiang y col., 2007; Deblois y Juneau, 2010). Al respecto, Jiang y col. (2007) hallaron que la producción de MCs fue estimulada a bajos niveles de irradiación (40 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). En este sentido, previamente Utkilen y Gjølme (1992) determinaron, en cultivos continuos a 20°C, que la toxicidad y la tasa de producción de toxina se incrementaron linealmente hasta los 40 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Los resultados de la presente Tesis Doctoral coinciden con este último conjunto de estudios. A 26 y 30°C, se observó una mayor producción de MCs a baja irradiación, aunque, a 36°C, la producción no se encontró afectada por la variación en la intensidad de irradiación. Esto puede ser debido a un efecto combinado entre la irradiación y la temperatura. Al respecto, Rapala y col. (1997), en un estudio con *Dolichospermum*, mostraron que la temperatura y la irradiación tienen un efecto combinado.

Con respecto a los nutrientes, algunos estudios han revelado que el aumento del contenido de MCs se relaciona con las condiciones de crecimiento favorables y aumento de la oferta de nitrógeno (Orr y Jones, 1998; Lee y col., 2000), mientras que otros más recientes no han mostrado esta correlación (Lyck, 2004;

Krüger y col., 2012;). Bortoli y col. (2014) encontraron una mayor producción de MCs en condiciones de exceso de nitrógeno y no hallaron correlación entre las MCs intracelulares y el crecimiento; tampoco hallaron una producción constante de MCs por célula. Además, Camargo y Alonso (2007) mencionan que los estudios de campo sugieren que la concentración de nitrógeno se correlaciona con la concentración de MCs, los niveles máximos de MCs pueden ocurrir a concentraciones de nitrógeno entre 1,5 y 4,0 mg.L⁻¹. Por otra parte, estudios de campo realizados con *M. aeruginosa*, indicaron una correlación positiva entre el contenido de fósforo total y MC-LR (Kotak y col., 1995; Lahiti y col., 1997). Aunque, en condiciones de laboratorio esta distinción no fue significativa (Runnegar y col., 1983; Watanabe y Oishi, 1985). A diferencia de las cianobacterias que fijan el nitrógeno de las que no lo fijan, que parecen diferir en sus respuestas a la concentración externa de nitrógeno respecto a la producción de MCs; en relación a la respuesta a las concentraciones de P, generan respuestas similares no sólo en el crecimiento sino también en la producción de hepatotóxicas intracelulares, ambos aumentan al aumentar el P (Rapala y col., 1997). Oh y col. (2000) determinaron que el crecimiento de *M. aeruginosa* fue reducido en condiciones limitantes de P debido a la baja fijación de C, mientras que el contenido de MCs se incrementó, así como la producción de la forma más tóxica, MC-LR. Asimismo, observaron una correlación lineal entre la producción de MCs y la relación N:P. Lee y col. (2000) hallaron que una relación N:P de 16 fue la óptima para el crecimiento y producción de MCs para una cepa de *M. aeruginosa*. Downing y col. (2005) detectaron altas concentraciones de MCs para valores de N:P entre 18 y 51 con un óptimo a 31,1. Jiang y col., (2007) afirmaron que el crecimiento de *M. aeruginosa* y la producción de MC fue estimulado por el fósforo y el nitrógeno siendo las relaciones N:P favorables entre 16 y 64.

En la presente Tesis Doctoral, se observaron las máximas producciones de MC-LR a N:P 10, a todas las temperaturas, es decir, que el aumento de la oferta de P en el medio de cultivo evidenció un aumento en la producción de MC-LR.

Efectos de la temperatura, la irradiancia y la relación N:P sobre Q_{MC}

Los valores de Q_{MC} iniciales a 26°C variaron entre 17-80 fg.cél⁻¹ provenientes del inóculo de *M. aeruginosa* que contiene toxina (**Figura 40**); esto puede deberse a la aclimatación previa (Jähnichen y col., 2008). Los valores finales fueron menores a 20 fg.cél⁻¹. Los máximos valores ocurrieron en la fase

exponencial inicial. Se observaron diferencias muy significativas entre tratamientos de irradiación ($p=8,45 \cdot 10^{-4}$) entre 30 y 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=5,97 \cdot 10^{-4}$), siendo los Q_{MC} más bajos a alta irradiación. Del mismo modo, se hallaron diferencias muy significativas entre tratamientos de N:P ($p=7,74 \cdot 10^{-3}$) entre N:P 10 y 150 ($p=6,67 \cdot 10^{-3}$), siendo los Q_{MC} más bajos en condiciones de deficiencia de P.

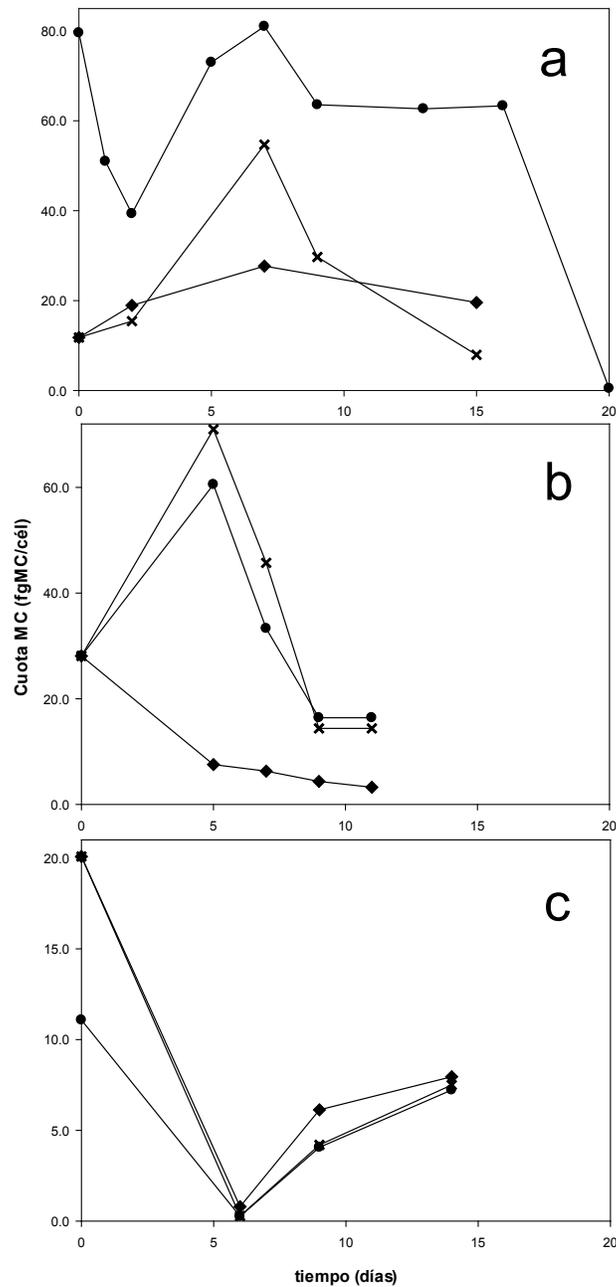


Figura 40: Evolución de los valores de Q_{MC} por célula a 26°C. a) 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; b) 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; c) 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150.

Los Q_{MC} iniciales a 30°C variaron entre 17-73 fg.cél⁻¹ provenientes del inóculo de *M. aeruginosa* que contiene toxina (**Figura 41**); esto puede deberse a la aclimatación previa (Jähnichen y col., 2008). Los valores finales fueron menores a 16 fg.cél⁻¹. Los máximos valores ocurrieron en la fase exponencial inicial. Se observaron diferencias muy significativas entre tratamientos de irradiación ($p=1,16 \cdot 10^{-2}$) entre 30 y 70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=1,11 \cdot 10^{-2}$), siendo los Q_{MC} más bajas a alta irradiación. Por otro lado, no se hallaron diferencias entre tratamientos de N:P ($p=0,490$).

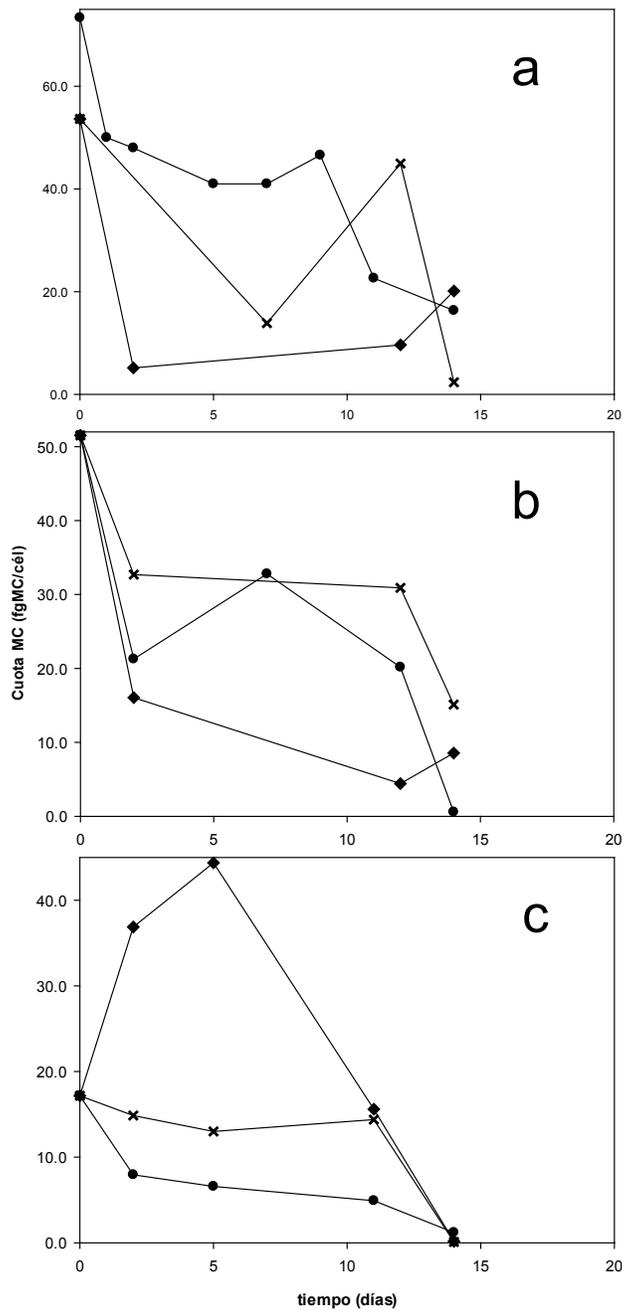


Figura 41: Evolución de Q-MC por célula a 30°C. a) 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; b) 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; c) 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150.

Los Q_{MC} iniciales a 36°C variaron entre 4-82 fg.cél⁻¹ provenientes del inóculo de *M. aeruginosa* que contiene toxina (Figura 42); esto puede deberse a la aclimatación previa (Jähnichen y col., 2008). Los

valores finales estuvieron comprendidos entre 2-119 fg.cél⁻¹. Los máximos valores ocurrieron en la fase exponencial inicial. Se observaron diferencias muy significativas entre tratamientos de irradiación ($p=6,82 \cdot 10^{-5}$) entre 30 y 50 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=1,84 \cdot 10^{-4}$) y entre 50 y 70 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p=8,37 \cdot 10^{-3}$), siendo los Q_{MC} más altos a irradiación media. Por otro lado, no se hallaron diferencias entre tratamientos de N:P ($p=0,424$).

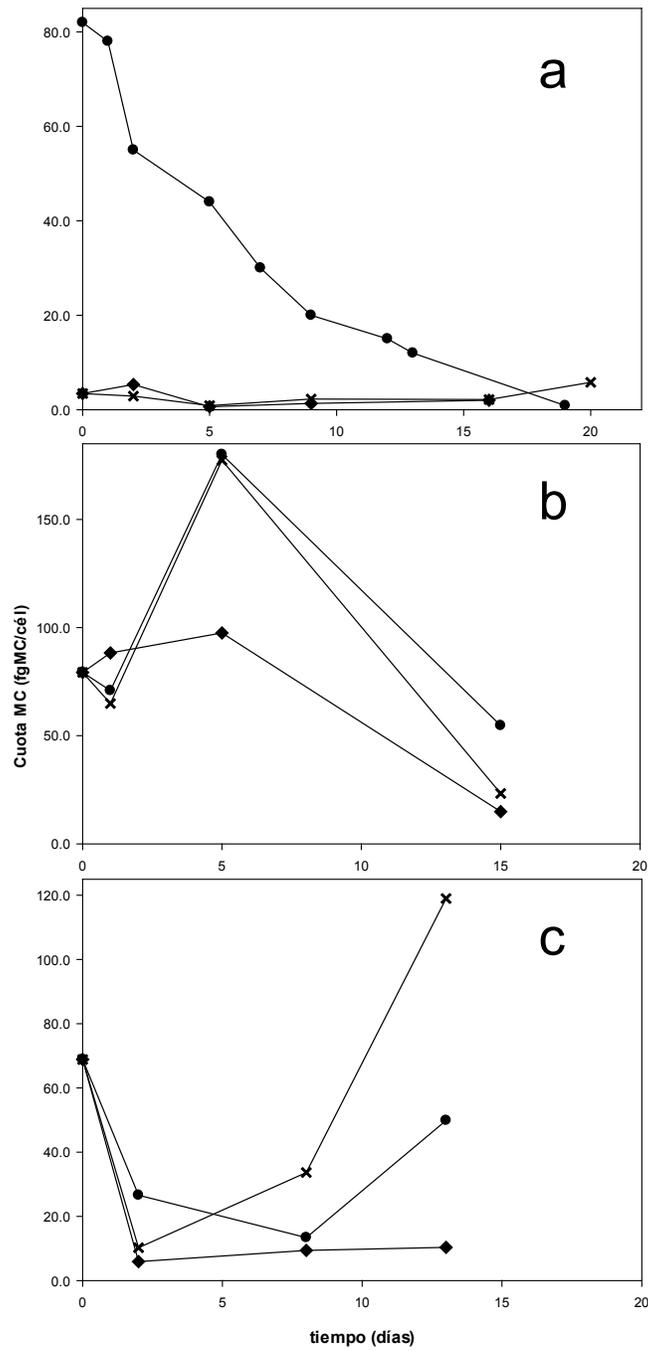


Figura 42: Evolución de Q-MC por célula a 36°C. a) 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; b) 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; c) 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; ● N:P 10; x N:P 100; ◆ N:P 150.

Interacciones de la temperatura, la irradiación y la relación N:P sobre el crecimiento y la producción de clorofila-a y microcistinas

Para evaluar los efectos conjuntos de la temperatura, la irradiación y la relación N:P sobre los parámetros de crecimiento de *M. aeruginosa*, producción de clo-a y MC, se utilizó una ecuación de tipo superficie de respuesta con 3 factores y con interacciones completas (**Ecuación 22**).

En las **Figura 43, 44 y 45**, se observa la aplicación del modelo de superficie de respuesta (**Ecuación 22**) para cada intensidad de irradiación estudiada. Se obtuvieron buenos coeficientes de determinación entre los valores experimentales y predichos para la velocidad de crecimiento (μ) con $R^2=0,912$, fase de latencia (LPD) con $R^2=0,857$, máxima densidad de población (MPD) con $R^2=0,918$, producción de clo-a (k_0) con $R^2=0,857$, producción de MCs (p) con $R^2=0,837$ y (d_M) con $R^2=0,605$ (**Figura 46**).

En la **Figura 43**, se observan los modelos de superficie-respuesta a $30 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los valores de μ máximos se observan a temperatura cercana a los 30°C independientemente de la relación N:P. De modo contrario, los valores de máximos de p ocurren a $<30^\circ\text{C}$ reduciéndose hacia 36°C . Por su parte, la LPD aumenta de la relación N:P 150 hacia N:P 10 y de 36 a 26°C . Tanto la MPD como k_0 disminuyen hacia las temperaturas más elevadas y de modo independiente a la relación N:P. Finalmente, el d_M disminuye al incrementarse la relación N:P y la temperatura.

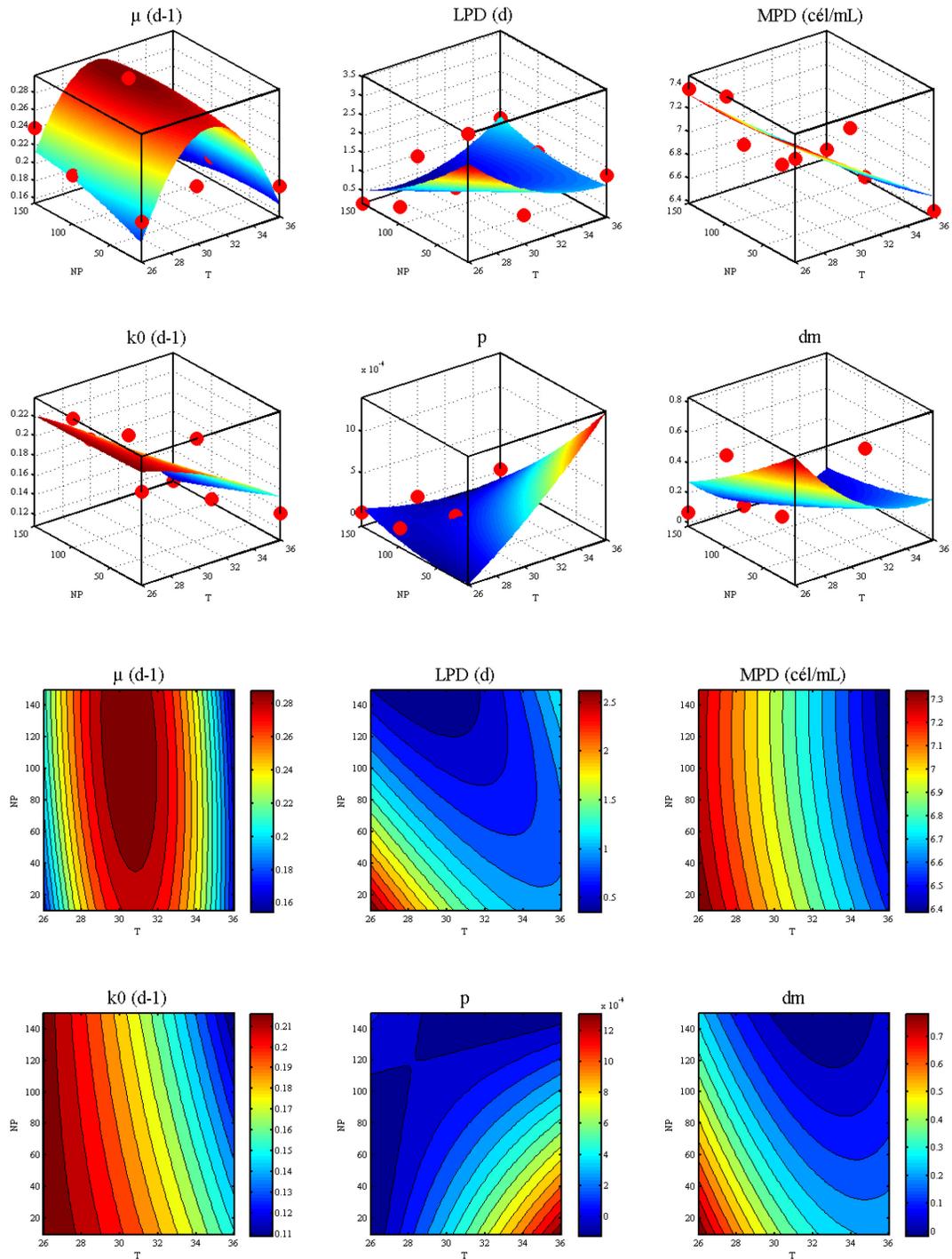
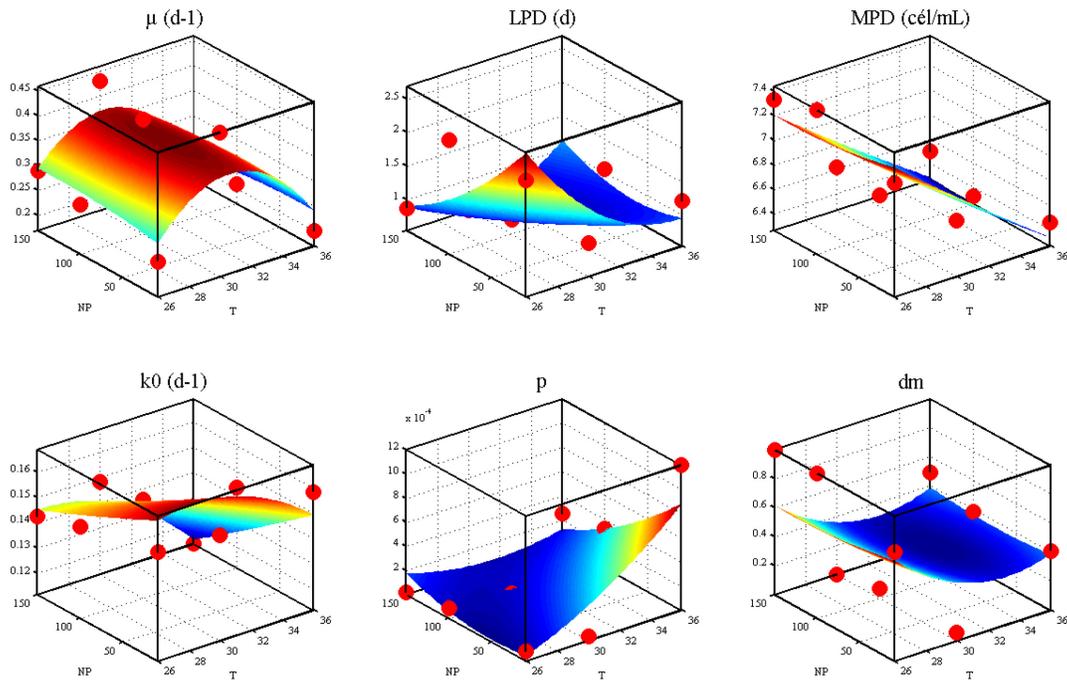


Figura 43: Superficie de respuesta a $30 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para μ , LPD, MPD, k_0 , p y dm obtenidos de la aplicación de la Ecuación 22.

En la **Figura 44**, se observan los modelos de superficie-respuesta a $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. De modo similar a la irradiación de $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ presentada en la anterior figura, los valores de μ máximos se observan a temperatura cercana a los 30°C independientemente de la relación N:P y los valores de máximos de p ocurren a $<30^\circ\text{C}$ reduciéndose hacia 36°C . Por su parte, la LPD aumenta de la relación N:P 150 hacia N:P 10 y de 36 a 26°C y la MPD disminuyen hacia las temperaturas más elevadas y modo independiente a la relación N:P. En los valores de k_0 , a diferencia de la irradiación $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se observan efectos de la relación N:P, incrementándose hacia las temperaturas y relación N:P más bajas. Finalmente, el d_M disminuye al incrementarse la temperatura sin efectos de la relación N:P.



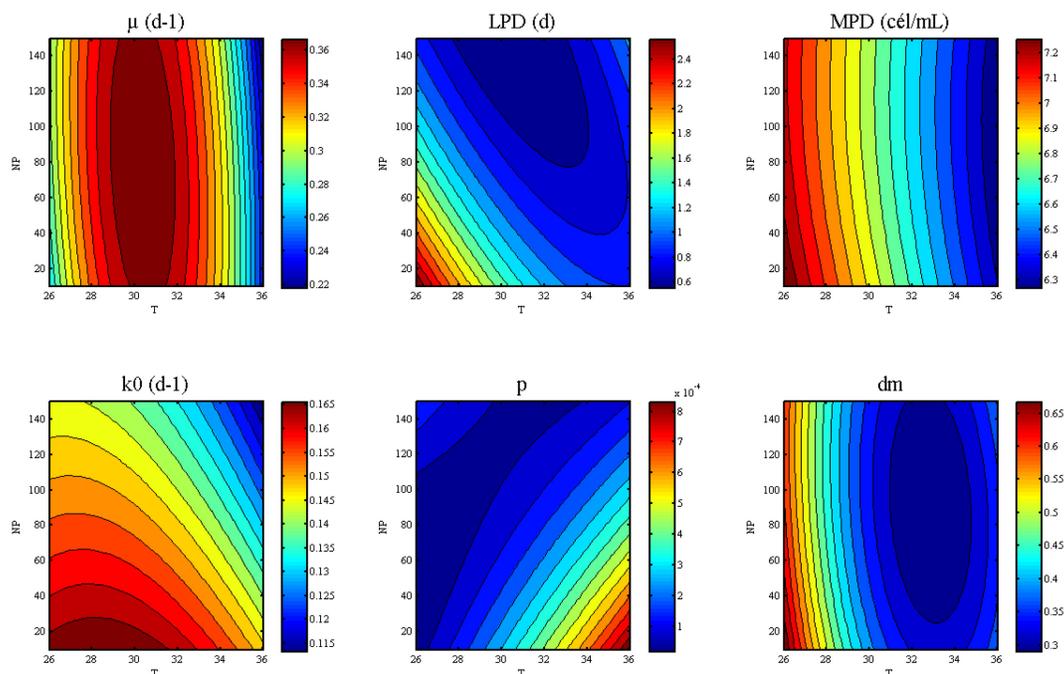


Figura 44: Superficie de respuesta a $50 \mu\text{mol foton m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para μ , LPD, MPD, k_0 , p y d_m obtenidos de la aplicación de la Ecuación 22.

En la **Figura 45**, se observan los modelos de superficie-respuesta a $70 \mu\text{mol foton m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. De modo similar a las irradiaciones de 30 y $50 \mu\text{mol foton m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, los valores de μ máximos se observan a temperatura cercana a los 30°C independientemente de la relación N:P y los valores de máximos de p ocurren a $<30^\circ\text{C}$ reduciéndose hacia 36°C y en una relación N:P cercana a 100. Por su parte, la LPD aumenta de la relación N:P 150 hacia N:P 10 y de 36 a 26°C y la MPD disminuyen hacia las temperaturas más elevadas y modo independiente a la relación N:P. En los valores de k_0 , se observa que aumentan hacia las temperaturas más altas y relación N:P más bajas. Finalmente, el d_M presenta los menores valores a 30°C y relación N:P 10.

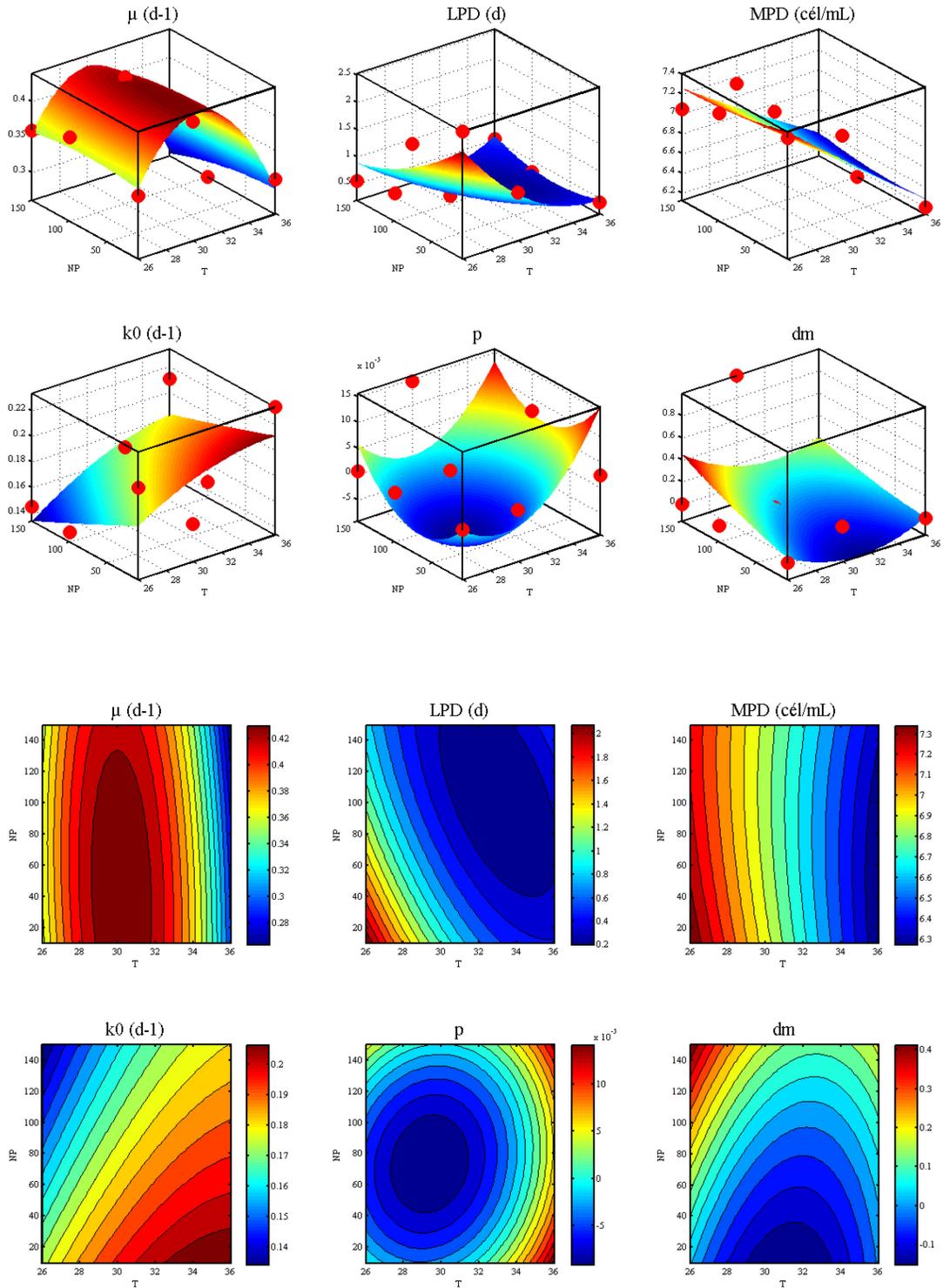


Figura 45: Superficie de respuesta a $70 \mu\text{mol foton m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para μ , LPD, MPD, k_0 , p y dm obtenidos de la aplicación de la Ecuación 22.

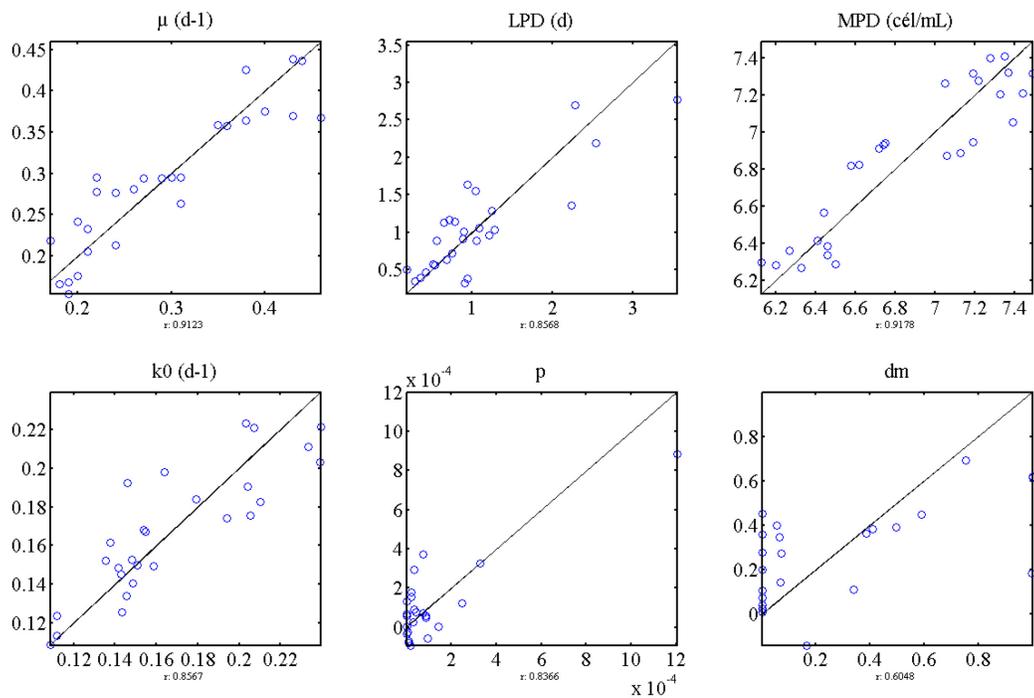


Figura 46. Correlación entre los valores experimentales y el predicho obtenidos de la aplicación de la Ecuación 22.

Una aproximación similar ha realizado Gonçalves y col. (2014), utilizando modelos de superficie-respuesta para caracterizar la respuesta de *M. aeruginosa* a diferentes factores. En dicho trabajo se utilizó la parte exponencial de la curva de crecimiento y la velocidad de crecimiento fue medida como la diferencia en el crecimiento en sucesivos tiempos. En general, estos autores observaron el incremento de μ , al incrementarse la temperatura de 15 a 25,6°C (en un rango de 15-35°C) y la intensidad de irradiación de 0 (oscuridad) a 140 $\mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (en un rango de 0-250 $\mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), alcanzando el μ máximo=1,02 d^{-1} .

A partir del modelo de superficie respuesta propuesto en la presente Tesis Doctoral, se propuso un modelo terciario a través del *Software* Matlab. Este permite predecir, dentro del rango estudiado, los parámetros de crecimiento, producción de clo-a y MCs. En la **Figura 47**, se encuentra una captura de pantalla del modelo terciario propuesto de crecimiento de *M. aeruginosa*. En el *Software*, se ingresan las condiciones de crecimiento (irradiación, temperatura y relación N:P). Obsérvese que pueden seleccionarse dos condiciones fijas y variar una condición. Además, deben ingresarse tanto el valor inicial

de la población como la cantidad de días. El *Software* permite predecir cómo serán las curvas de crecimiento en las condiciones seleccionadas. Además, permite obtener una figura de los parámetros de las curvas de crecimiento en función de la condición a variar seleccionada. Este modelo es una aproximación de cómo podrían utilizarse los datos obtenidos de los modelos primarios y secundarios en la aplicación de un *Software*.

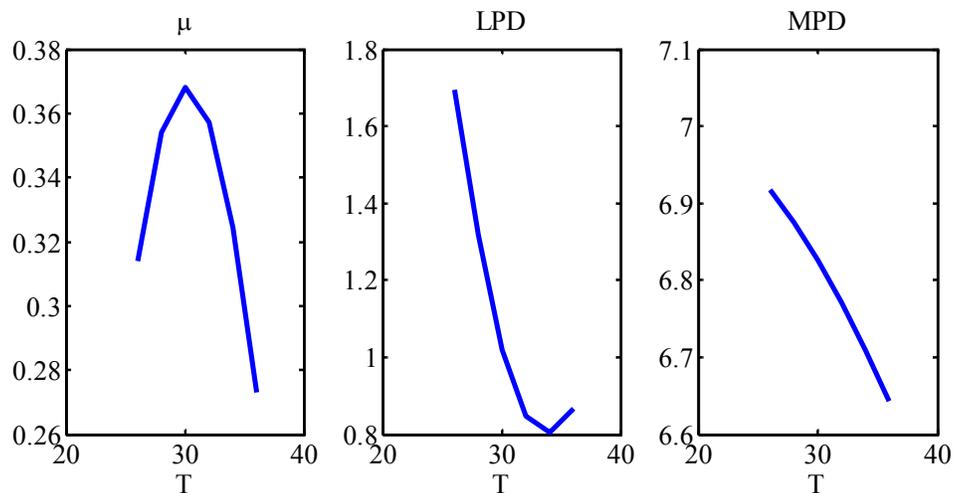
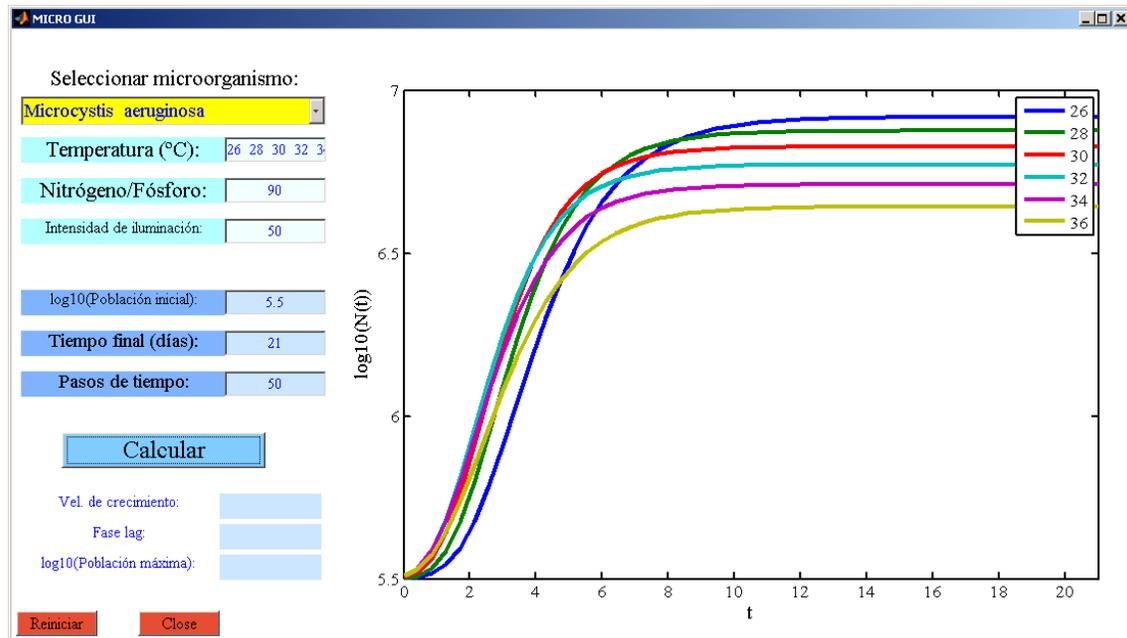


Figura 47. Captura de pantalla de la aplicación de la propuesta de modelo terciario para crecimiento de *M. aeruginosa*.

Correlación entre los factores y los parámetros de crecimiento, la producción de clorofila-a y microcistina-LR

El valor de correlación de la irradiación con la velocidad de crecimiento fue de $r=0,70$ y el tiempo de generación $r=0,62$. El de la temperatura con la MPD fue de $r= -0,90$ y el de la relación N:P con la LPD $r= -0,60$ y RLPD $r= -0,54$. En el caso de los parámetros de producción de MC, p y d_M , y de clo-a, k_0 , los valores de correlación estuvieron comprendidos entre 0,1-0,2 con los factores estudiados.

Esto permite rechazar la primera hipótesis planteada relacionada a que los parámetros de crecimiento, producción de clo-a y MC se correlacionan directamente con los factores de estudio, ya que en algunos casos las correlaciones fueron negativas y, en otros, casos los valores de correlación son muy bajos.

Vinculación de la velocidad de crecimiento y la producción de microcistina-LR

Para vincular la producción de MC-LR con el crecimiento de *M. aeruginosa*, se utilizó el modelo de Long y col. (2001) (**Ecuación 5**). A todas las condiciones estudiadas en el diseño experimental (**Figura 48 a, b, c**), se observó una relación directa entre la producción de MC por célula y la velocidad de crecimiento, es decir que al incrementarse la velocidad de crecimiento se incrementa la producción de MC por célula. Estas observaciones coinciden con el trabajo de Long y col. (2001) que realizó experimentos con cultivos continuos y en Batch con *M. aeruginosa* en condiciones de limitación de nitrógeno.

Esto permite no rechazar la hipótesis de la presente Tesis Doctoral que afirma que la velocidad de crecimiento es un proceso acoplado a la producción de toxina.

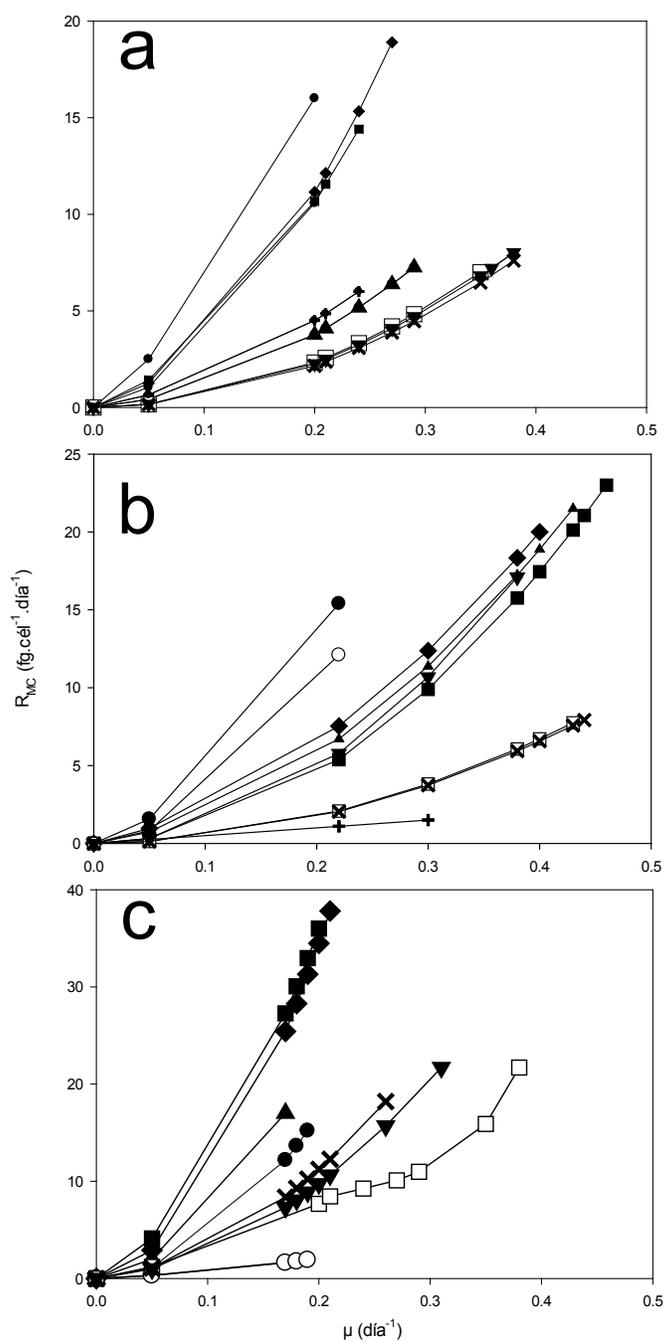


Figura 48. Aplicación de la Ecuación 5 (Long y col., 2001) a los datos experimentales de crecimiento y producción de MC. a) 26°C, b) 30°C, c) 36°C, a 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ●N:P10, +N:P100, ○N:P150; a 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ■NP:10, ◆N:P100, ▲N:P150; a 70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ □N:P10, XN:P100, ▼N:P150.

Hasta el momento, se analizaron los efectos de la temperatura, la irradiación y la relación N:P sobre el crecimiento y la producción de metabolitos de *M. aeruginosa*, en condiciones de laboratorio. Otro aspecto relevante para comprender la dinámica de *M. aeruginosa*, es que esta cianobacteria se encuentra acompañada de microorganismos de su entorno o ficosfera. En este sentido, además de que los microorganismos pueden influenciar el crecimiento y la producción de metabolitos, un aspecto interesante es su aplicación como método de bioremediación de MCs. Esta aplicación podría derivar en un tratamiento de agua sencillo, de bajo costo y efectivo que puede ser combinado con tratamientos físicos y químicos. Debido a su relevancia, a continuación, se estudiarán los microorganismos de un florecimiento de *M. aeruginosa* del río de La Plata y su potencial para bioremedar MCs.

Caracterización de la floración en el Río de La Plata

La floración tomada en el río de la Plata en fecha 10/01/2014 tuvo como género predominante a *M. aeruginosa*. Otra cianobacteria presente fue *Pseudoanabaena mucicola* que es conocida por estar asociada al mucílago de *Microcystis* (Vidal y col., 2009) Además, se observó la presencia de *Scenedesmus* sp. (clorofita), *Cyclotella* sp. (diatomea) y una diatomea pennada (**Figura 49**).

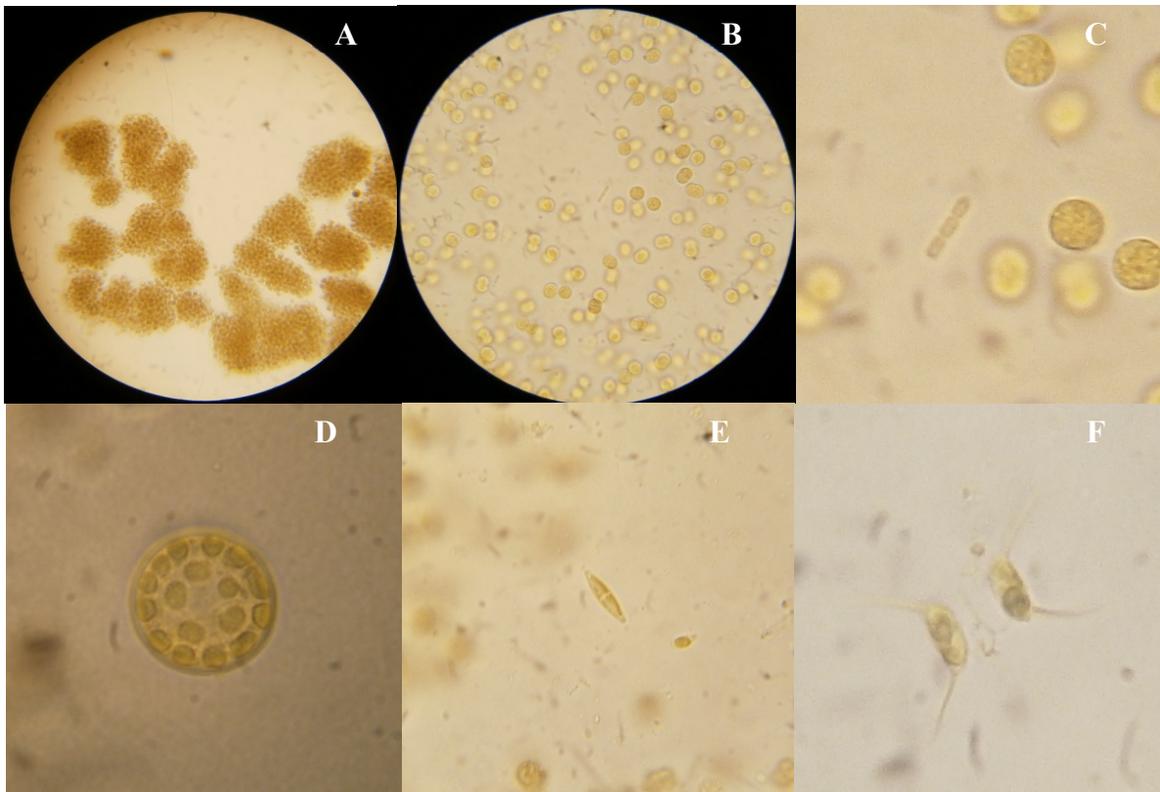


Figura 49. Fotografías del fitoplancton hallado durante la floración. Las muestras poseen una tinción con lugol al 2%. A. Colonia de *Microcystis* sp. (100X). B y C. *Microcystis* sp. y *Pseudoanabaena mucicola* (400X). D. *Cyclotella* sp. (1000X). E. *Diatomea pennada* (1000X). F. *Scenedesmus* sp. (1000X).

En el sitio, la temperatura fue 28,3°C; el pH=7,27; la conductividad eléctrica=318 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y el oxígeno disuelto= 7,7 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$.

Aclimatación y aislamiento de bacterias con potencial de remoción de microcistina-LR

A continuación, se expondrán los resultados obtenidos del período de aclimatación de los microorganismos provenientes de la floración del río de La Plata con potencial para bioremove MC-LR y el posterior aislamiento de microorganismos para ser evaluado el potencial individual de remover MC-LR.

A partir de la floración, se procedió a aclimatar a los microorganismos para, luego, realizar los ensayos de bioremediación. El período de aclimatación se llevó a cabo durante 70 días, en dónde, a partir de la muestra ambiental, se realizaron 4 repiques sucesivos adicionando una concentración de $200\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC [D-Leu¹]-LR. Durante su aclimatación, se determinaron los niveles de MC-LR y se observó una disminución de hasta el 90% respecto al inicial. En la **Figura 50**, se muestra el % de MC-LR remanente y con las flechas, que se encuentran en la parte superior de la figura, se presentan los momentos en los que se agregaron pulsos de toxina.

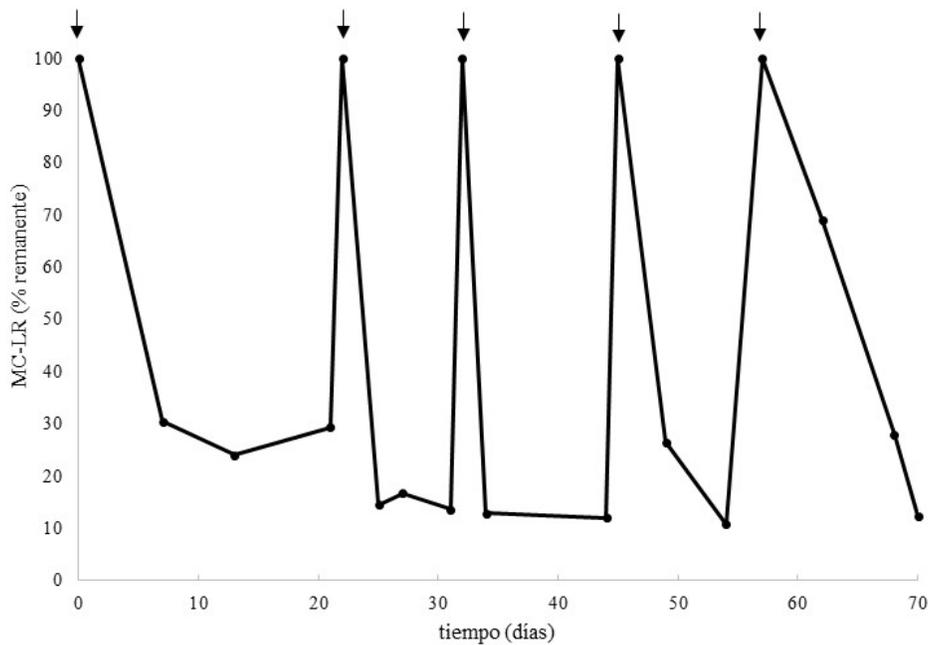


Figura 50. Concentración de MC-LR durante el período de aclimatación del consorcio de microorganismos del Río de La Plata. Las flechas indican la adición de MC [D-Leu¹]-LR.

Tras los 70 días de aclimatación de los microorganismos, se obtuvo un conjunto de microorganismos denominado consorcio y, de allí, se procedió a aislar los microorganismos que lo componen utilizando medio MSM agarizado y suplementado con MC-LR. Se aislaron 15 bacterias (bacilos) y una levadura. La prueba de tinción de Gram indicó la presencia de 2 bacilos Gram (+) y el resto, Gram (-) (**Tabla 16**).

Tabla 16. Listado de microorganismos aislados y resultados de la tinción de Gram.

Identificación	Organismo	Tinción de Gram
RLP-01	Bacilo	-
RLP-02I	Bacilo	-
RLP-02II	Bacilo	-
RLP-03I	Bacilo	-
RLP-03II	Bacilo	-
RLP-4	Bacilo	+
RLP-5	Bacilo	-
RLP-6I	Bacilo	-
RLP-6II	Bacilo	-
RLP-7	Bacilo	-
RLP-8	Bacilo	-
RLP-9I	Bacilo	-
RLP-9II	Levadura	-
RLP-10	Bacilo	-
RLP-A	Bacilo	+
RLP-C	Bacilo	-

Remoción de microcistina-LR

A continuación, se expondrán los resultados obtenidos de los ensayos de remoción de MC-LR tanto para el consorcio de microorganismos como para la bacteria con mayor potencial de remoción aislada del consorcio.

Consortio de microorganismos del Río de La Plata

Como se mencionó antes, el consorcio se refiere al conjunto de microorganismos provenientes del proceso de aclimatación de la muestra de la floración del Río de La Plata. Este consorcio de microorganismos ensayado para evaluar la remoción de MC [D-Leu¹]- LR mostró una reducción del 99,4%

al día 7 respecto a la concentración inicial. En la **Figura 51**, se observa la aplicación de la **Ecuación 23** a los datos del consorcio aislado del Río de La Plata. Se obtuvo un muy buen ajuste con un coeficiente de determinación $R^2=0,99$. El consorcio del Río de La Plata alcanzó la máxima remoción al día 7 (0,6% de MC-LR remanente equivalente a $1,2 \mu\text{g.L}^{-1}$). Resultados similares se han reportado en la literatura científica (Counsins y col., 1996; Lemes y col., 2008). En el consorcio aislado de Cousins y col. (1996), a una concentración inicial de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, removi6 el 95% de MC al día 12. En el caso del consorcio aislado por Lemes y col. (2008), a una concentración inicial de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$, alcanz6 la remoci6n total al día 14. Las diferencias en los consorcios pueden deberse a los microorganismos que los componen, a las condiciones de ensayo y los in6culos iniciales asi como las concentraciones iniciales de MC. En este sentido, es importante conducir estudios que permitan determinar las mejores condiciones de remoci6n.

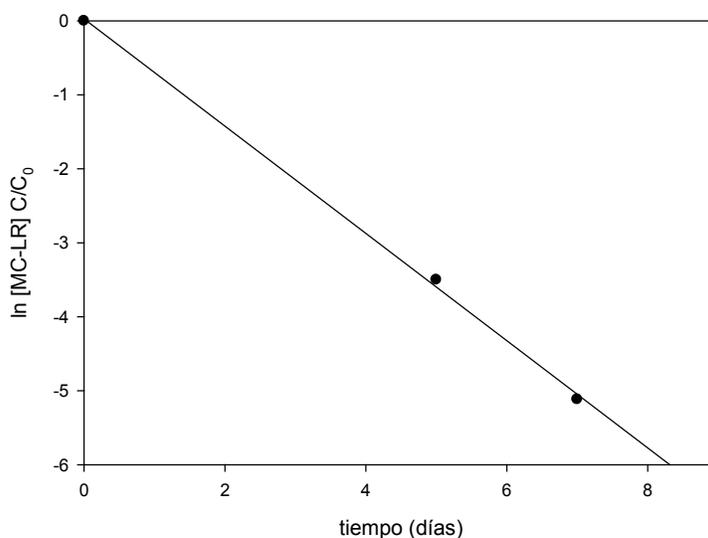


Figura 51. Remoci6n de MC-LR por el consorcio del Rio de la Plata.

Se defini6 el tiempo de remoci6n medio (trm) como el tiempo necesario para reducir la concentraci6n de MC a la mitad respecto de su concentraci6n inicial (**Ecuaci6n 24**), asumiendo que la degradaci6n de MC por microorganismos sigue una relaci6n lineal. El valor de trm hallado fue de $0,948 \pm 0,05$.

Microorganismos del Río de La Plata

Cada microorganismo aislado del consorcio del Río de La Plata, fue ensayado individualmente para estudiar su capacidad de remoción de MC-LR. De todos los microorganismos ensayados, se observó que la bacteria RLP-10 removió el mayor porcentaje (79,5%) de MC [D-Leu¹]- LR respecto al control, al día 7, dejando un remanente de 41 µg.L⁻¹.

Identificación de la bacteria

Las pruebas bioquímicas fueron realizadas sobre la bacteria RLP10 por ser la que mayor potencial de remoción presentó. Estas pruebas arrojaron que la bacteria es Gram (-), oxidasa (+), citrato (+), móvil, reducción de nitratos (+), oxidación de glucosa y xilosa (+), oxidación de manitol (-), ONPG (+), indol (-), ureasa (-) y Voges Proskauer (-).

Por otro lado, al analizar molecularmente a la bacteria, esta mostró un 99% de identidad con varias cepas de *Achromobacter xylosoxidans*. La secuencia de nucleótidos de la cepa denominada LG1 fue depositada en GenBank bajo el numero asignado MF959519 y la secuencia parcial construida gen 16S rRNA de RLP-10, que contiene 1302 pares de bases fue reconstruida como a continuación se muestra:

```
GCGAAGGGTG AGTAATGTAT CGGAACGTGC CCAGTAGCGG GGGATAACTA
CGCGAAAGCG TAGCTATACC GCATACGCCC TACGGGGGAA AGCAGGGGAT
CGCAAGACCT TGCACTATTG GAGCGGCCGA TATCGGATTA GCTAGTTGGT
GGGGTAACGG CTCACCAAGG CGACGATCCG TAGCTGGTTT GAGAGGACGA
CCAGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA
GTGGGGAATT TTGGACAATG GGGGAAACCC TGATCCAGCC ATCCCGCGTG
TGCGATGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGCAC TTTTGGCAGG AAAGAAACGT
CGCGGGTTAA TACCCCGCGA AACTGACGGT ACCTGCAGAA TAAGCACCGG
CTAACTACGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGGTGCA AGCGTTAATC
GGAATTACTG GGCGTAAAGC GTGCGCAGGC GGTTCGGAAA GAAAGATGTG
AAATCCCAGA GCTTAACTTT GGAACTGCAT TTTTAACTAC CGGGCTAGAG
TGTGTCAGAG GGAGGTGGAA TTCCGCGTGT AGCAGTGAAA TGCGTAGATA
TGCGGAGGAA CACCGATGGC GAAGCAGCCT CCTGGGATAA CACTGACGCT
CATGCACGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA
CGCCCTAAAC GATGTCAACT AGCTGTTGGG GCCTTCGGGC CTTGGTAGCG
```

CAGCTACGCG TGAAGTTGAC CGCCTGGGGA GTACGGTCGC AAGATTAAAA
 CTCAAAGGAA TTGACGGGGA CCCGCACAAG CGGTGGATGA TGTGGATTAA
 TTCGATGCAA CGCGAAAAAC CTTACCTACC CTTGACATGT CTGGAATGCC
 GAAGAGATTT GGCAGTGCTC GCAAGAGAAC CGGAACACAG GTGCTGCATG
 GCTGTCTGTC GCTCGTGTTC TGAGATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC
 GCAACCCTTG TCATTAGTTG CTACGAAAGG GCACTCTAAT GAGACTGCCG
 GTGACAAACC GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAGTCCTC ATGGCCCTTA
 TGGGTAGGGC TTCACACGTC ATACAATGGT CGGGACAGAG GGTCCGCAAC
 CCGCGAGGGG GAGCCAATCC CAGAAACCCG ATCGTAGTCC GGATCGCAGT
 CTGCAACTCG ACTGCGTGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG CGGATCAGCA
 TGTGCGGGTG AATACGTTCC CGGGTCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA

No se halló en la literatura ningún reporte sobre la capacidad de remover MCs por parte de esta bacteria. Solo se hallaron el proyecto de secuenciación denominado *Achromobacter xylosoxidans* **AXX-A Genome Sequencing Project Organism: *Achromobacter insuavis* AXX-A (Taxonomy ID 1003200)**. En este, se identificaron 4 genes que codifican para enzimas con actividad microcistinasa: 06763, 06793, 21793 y 25015. Por otra parte, el género *Achromobacter*, también, es conocido como *Alcaligenes* y ha sido reportado previamente por su capacidad de lisar células de *M. aeruginosa* (Yamamoto y col.,1993; Manage y col., 2000; Sun y col.,2015).

Remoción de Achromobacter xylosoxidans LG1

En la **Figura 52**, puede observarse la aplicación de la regresión lineal (**Ecuación 23**) de los datos de la bacteria *A. xylosoxidans* LG1. En la misma figura, se incluyeron los datos de la literatura científica disponible a los fines de comparar la bacteria aislada del Río de La Plata. Adicionalmente, en la **Tabla 18**, se encuentran los valores de k y coeficientes de determinación obtenidos con la **Ecuación 52**. Se obtuvieron buenos coeficientes de determinación entre los datos experimentales y los valores predichos que estuvieron comprendidos entre 0,80-0,99. Además, se calcularon los t_m para *A. xylosoxidans* y las bacterias recopiladas de la literatura científica (**Tabla 18**). El ANOVA y comparación de pares separó los t_m en 4 grupos. *Bacillus* sp. y *Stenotrophomonas* sp. cepa EMS fueron las bacterias que más rápidamente removieron MC-LR según la **Ecuación 24** con valores de $t_m=0,41$ y $0,42$ respectivamente. Luego, el grupo de las *Sphingomonas* sp. que se dividió en $t_m=1,12-1,27$ y $10,5-11,0$. Estas diferencias pueden

haber sido debidas a las diferentes especies y cepas del grupo que fueron utilizadas. Finalmente, el otro grupo incluyó solo a *A. xylooxidans* con $\text{trm} = 3,01$.

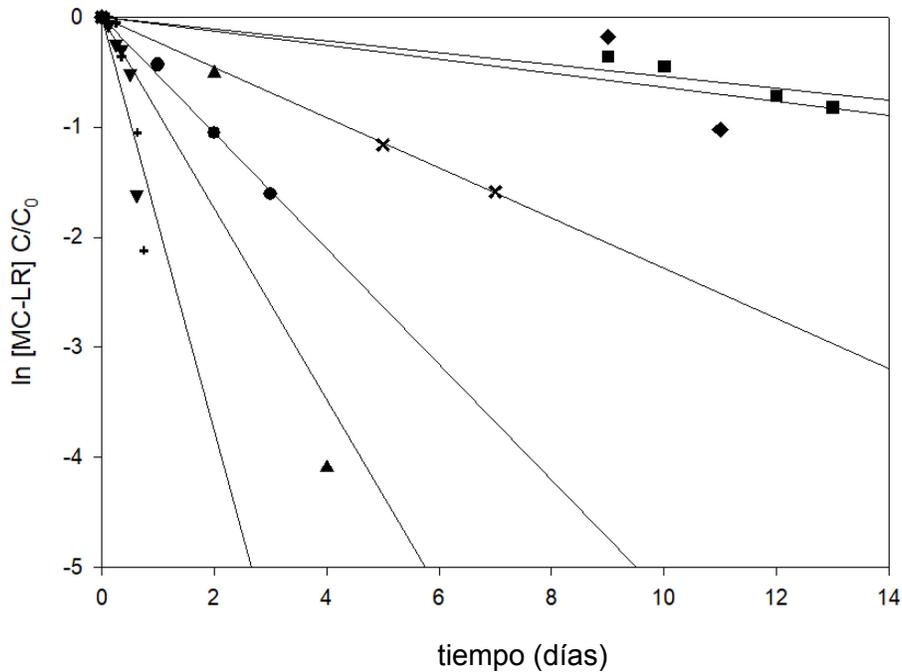


Figura 52. Aplicación de la Ecuación 23 a los datos experimentales. + *Bacillus* sp. (Hu et al., 2012), ▼ *Stenotrophomonas* sp. (Chen et al., 2010), ▲ *Sphingomonas* sp. (Ishii et al., 2004), ● *Sphingomonas* sp. (Park et al., 2001), x *A. xylooxidans*, ■ *Sphingomonas* ACM-3962 (Ho et al., 2007^b) y ♦ *Sphingopyxis* LH21 (Ho et al., 2007^b).

Tabla 18. Valores de la constante k , R^2 , trm y remoción al día 2 calculados con la Ecuación 10 y 11.

Bacterias	Referencia	k (día)	R^2	trm (día)	Remoción al día 2
<i>Bacillus</i> sp.	(Hu y col., 2012)	-1,703±0,06	0,94	0,41±0,05 ^{a**}	-4,75
<i>Stenotrophomonas</i> sp. EMS	Chen y col. (2010)	-1,659±0,05	0,94	0,42±0,04 ^{a**}	-4,15
<i>Sphingomonas</i> sp	(Ishii y col., 2004)	-0,637±0,04	0,87	1,12±0,05 ^{b**}	-1,54
<i>Sphingomonas</i> sp. Y2	(Park y col., 2001)	-0,545±0,04	0,99	1,27±0,06 ^{b*}	-1,05
<i>A. xylooxidans</i> LG1*		-0,226±0,03	0,99	3,06±0,07^{c**}	-0,45
<i>Sphingomonas</i> ACM-3962	(Ho y col., 2007 ^b)	-0,066±0,01	0,80	10,5±0,06 ^{d**}	-0,00
<i>Sphingopyxis</i> LH21	(Ho y col., 2007 ^b)	-0,063±0,01	0,91	11,0±0,08 ^{d**}	-0,07

*No alcanzó la remoción total

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre consorcios * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$.

El diseño experimental y la aplicación de las ecuaciones a los datos experimentales permitieron contrastar la hipótesis planteada. En este caso, no se rechaza la hipótesis de que las bacterias provenientes de florecimientos cianobacterianos remueven MC-LR en condiciones de laboratorio.

Diversos autores han estudiado los factores que influyen en la remoción de MCs en agua. Park y col. (2001) estudiaron los efectos de la temperatura en la remoción de MC-LR por *Sphingomonas* e indicaron que las tasas de degradación fueron fuertemente dependientes de la temperatura y la máxima tasa de degradación se consiguió a 30°C. Sugirieron, además, que la cepa Y2 puede usar MC como fuente de carbono. Es por ello que, posteriormente, Eleuterio y Batista (2010) encontraron que una fuente adicional de carbono en forma de materia orgánica naturalmente biodegradable, reduce significativamente la degradación de MCs.

Otro de los factores que influye en la remoción es el inóculo inicial de la bacteria. Kang y col. (2012), al estudiar 30 cepas de *Pseudomonas*, determinaron que la actividad para remover MCs de estas bacterias decaía al disminuir la concentración de la bacteria ($<10^6$ cél.mL⁻¹).

La influencia del pH en la remoción de MC-LR fue estudiada por Chen y col. (2010) en *Stenotrophomonas* sp. cepa EMS. Estos autores observaron que, al aumentar el pH de 5 a 9, la velocidad de remoción aumentaba, así como el porcentaje de remoción alcanzado. Por lo tanto, la tolerancia a pH alcalino de las bacterias que degradan MCs es la clave en el desencadenamiento de la rápida degradación de MC, que conduce a la desaparición de las floraciones tóxicas de agua en los ambientes acuáticos (Okano y col., 2009).

Además, la concentración inicial de MC-LR también es un factor importante (Ho y col., 2007^b). Algunos autores han reportado que existe una relación entre la exposición previa a MCs y la tasa de degradación (Park y col., 2001 y Giaramida y col., 2012). Giaramida y col. (2012) sugieren que la exposición a MCs impulsa cambios en la estructura y fisiología de los ensambles bacterianos y convierte esos de modo diferencial, desempeñando la degradación de MC-LR. Además, el carbono orgánico disuelto, los compuestos de nitrógeno y la temperatura tienen un efecto significativo en la conformación de la estructura de las comunidades bacterianas (Giaramida y col., 2012). A pesar de las diferencias en las condiciones experimentales (tipo y cantidad de inóculo, temperatura, concentración inicial de MCs, pH,

etc.), las observaciones indican que las MCs sufren una biotransformación en el ambiente mediada por bacterias heterotróficas (Christoffersen y col., 2002).

La remoción biológica puede ser efectiva, sin embargo, los factores que influyen el proceso son difíciles de controlar. Es por eso que los métodos biológicos han sido propuestos en combinación con métodos de absorción (Drikas y col., 2001) como aquellos que son practicados rutinariamente en las plantas de tratamiento de agua potable (Jones et al., 1994; Hoeger et al., 2005; Ho et al., 2007). Más recientemente, Li y Pan (2015) utilizaron microorganismos combinados con quitosano en un filtro observándose una alta eficiencia en la remoción de MCs con combinación del proceso de floculación (eliminación previa de las MCs intracelulares) y la filtración. Es por ello que, el tratamiento biológico puede ser utilizado en combinación con la ventaja de utilizar microorganismos autóctonos sin la intrusión de otros que podrían tener efectos impredecibles en el ambiente.

Conclusiones

- Se estudiaron los parámetros de crecimiento, producción de clo-a y MC-LR de una cepa autóctona de *M. aeruginosa* a través de modelos matemáticos primarios y secundarios observándose que los factores (temperatura, irradiación y relación N:P) afectaron los parámetros determinados mediante los modelos.
- La velocidad de crecimiento se incrementó con la temperatura e irradiación.
- La duración de la fase de latencia disminuyó con el aumento de la oferta de nitrógeno, no siendo significativo a altas temperaturas (36°C). También, se observó una disminución al incrementarse la temperatura.
- La máxima población se incrementó con la irradiación a temperaturas altas (30-35 °C).
- El tiempo de duplicación de la clo-a disminuyó a baja irradiación (30 μmol foton m⁻² s⁻¹) a 26-30°C y a alta irradiación (70 μmol foton m⁻² s⁻¹) a 36 °C.
- La producción de MC-LR disminuyó al incrementarse la temperatura y disminuir la relación N:P y la irradiación.

- Los modelos secundarios permitieron determinar las energías de activación de los parámetros μ y LPD con variaciones en los rangos 15-28°C y 28-35°C y la temperatura óptima, mínima y máxima de crecimiento.
- A través del modelo de Gompertz se estudió por primera vez la curva completa de crecimiento de *M. aeruginosa* y se obtuvo la energía de activación de la fase de latencia. Del mismo modo, se calculó la energía de activación de clo-a.
- Se obtuvo el primer reporte de microorganismos y *A. xylooxidans* del Río de La Plata con capacidad de remover MC-LR.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP X526), la Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PICT0861-2013) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP N°112 201101- 00959 y beca doctoral 2013-2018).

Agradecimientos

- A mis directores y al equipo de trabajo del Laboratorio de Toxicología General (FCE-UNLP).
- A Sandro Goñi (CIDCA-UNLP-CONICET), Cristina Costa (Dpto. Radiobiología, CONEA), Magdalena Pezzoni (Dpto. Radiobiología, CONEA), Cristian Oliver (CICD) y Mariela Espinosa (Gerencia de Química, CONEA).
- A Sebastián Sabatini (QB-FCEN-UBA), Fernando Momo (ICI-UNGS) y Fernando Unrein (IIB-INTECH-UNSAM).
- Al equipo de trabajo del Laboratorio IBGA (FCyT-UADER), en especial a Ricardo Juárez.
- A familiares, amigos y compañeros.

Referencias

- Aguilera, A., Echenique, R. O. (2017). Cyanobacteria nocivas de ambientes acuáticos continentales: taxonomía y ecología. En: Giannuzzi, L. (2017). Cianobacterias como determinantes ambientales de salud. Ministerio de Salud. 27-48.
- Alamni, S.A. (2012). Biodegradation of microcystin-RR by *Bacillus flexus* isolated from a Saudi freshwater lake. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19: 435-440.
- 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.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI Blast: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389–3402.
- Amé, M. V., Wunderlin, D. A. (2005). Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* population. *Water, Air, & Soil Pollution*, 168(1), 235-248.
- Amé, V., Ricardo EJ, Stephan P, Alberto WD. (2006). Degradation of microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Cordoba—Argentina). *Biodegradation*. 17:447–455.
- Amé, M.V., Galanti, L.N., Menone, M.L., Gerpe, M.S., Moreno, V.J. y Wunderlin, D.A. (2010). Microcystin–LR, –RR, –YR and –LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae*, 9: 66–73.
- Amemiya, Y.; Nakamura, O. (1986) Some properties of the sheath material. *Rep Fac Engineer, Yamanashi Univ* 37:70–75.
- Amemiya, Y., Kato, K., Nakayama, O. (1988) Extracellular products of *Microcystis* species: Formation of slime layer and DOC pool in surrounding waters. *Verb Int Ver Limnol* 23:1886–1892.
- Amemiya, Y., Kato, K., Okino, T., Nakayama, O. (1990) Changes in the chemical composition of carbohydrates and proteins in surface water during a bloom of *Microcystis* in Lake Suwa. *Ecol Res* 5:153–162.
- Andrinolo, D; Pereira, P; Giannuzzi, L; Aura, C; Massera, S; Caneo, M; Caixach, J; Barco, M., Echenique, R. (2007) Ocurrence of *Microcystis Aeruginosa* and Microcystins in Río de La Plata River (Argentina) *Acta Toxicol. Argent.* 15 (1): 8-14.

- Andrinolo, D., Sedan, D., Echenique, R. (2009). Procedimientos analíticos y métodos de detección de cianotoxinas. En: Giannuzzi, L. Cianobacterias y cianotoxinas. Identificación, toxicología, monitoreo y evaluación de riesgo. *Moglia*, Corrientes.
- Andrinolo, D., Sedan, D. (2017). Cianotoxinas. Farmacología y efectos de las principales toxinas presentes en Argentina. Microcystinas, Saxitoxinas, Anatoxinas, Cylindrospermopsinas, lipopolisacáridos. En: Giannuzzi, L. (2017). Cianobacterias como determinantes ambientales de salud. Ministerio de Salud. 49-66.
- Angelier, E. (2002). *Ecología de las aguas corrientes*. Acribia.
- Arocena, R., Conde, D. (1999). Métodos en ecología de aguas continentales. Instituto de Biología- Sección Limnología, Montevideo.
- Aubriot, L., Bonilla, S., Kruk, C. (2009). Cianobacterias: Factores que regulan su crecimiento Cap. 2. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Bonilla Ed. Programa hidrológico Internacional de la UNESCO para America Latina y el Caribe, 5-11.
- Azevedo, S. M., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, 181, 441-446.
- Babica, P., Bláha, L., Maršálek, B. (2006). Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms¹. *Journal of Phycology*, 42(1), 9-20.
- Barco, M., Lawton, L.A., Rivera, J., Caixach, J. (2005). Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1074 (1), 23–30.
- Bassanezi, R. C. (2002). Ensino-aprendizagem com modelagem matemática: uma nova estratégia. Editora Contexto.
- Bhaya, D., Schwarz, R., Grossman, A. (2002). Molecular responses to environmental stress. En: *The Ecology of Cyanobacteria*, Whitton, B. & Potts, M. Eds. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 394-442.
- Blankenship, R.E. (2014). *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 2da edition. Wiley Blackwell. British.
- Blomqvist, P., Pettersson, A., Hyenstrand, P. (1994). Ammonium-nitrogen-A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Archiv fur Hydrobiologie*, 132(2), 141-164.

- Bold, H.C., Wynne, M.J. (1985). Divisions Cyanophyta and Prochlorophyta. En: Bold, H.C. y Wynne, M.J. (eds.). Introduction to the algae. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 34-69 pp.
- Bonilla, S., Aubriot, L. (2009). Capítulo 1, Parte I. Generalidades. Biología, floraciones y distribución de las cianobacterias. En Bonilla (2009). Cianobacterias Planctónicas del Uruguay, UNESCO. 1-4.
- Bortoli, S., Oliveira-Silva, D., Krüger, T., Dörr, F. A., Colepicolo, P., Volmer, D. A., Pinto, E. (2014). Growth and microcystin production of a Brazilian *Microcystis aeruginosa* strain (LTPNA 02) under different nutrient conditions. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(4), 389-398.
- Bouland, S., Duguet, J. P., Montiel, A. (2004). Minimizing bromate concentration by controlling the ozone reaction time in a full-scale plant. *Ozone: science & engineering*, 26(4), 381-388.
- Bourne D.G., Jones G., Blakeley R., Jones A., Negri A., Riddles P (1996) Enzymatic pathway for the bacterial degradation of cyanobacterial cyclic peptide toxin MC-LR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4086–4094.
- Bourne, D.G., Riddles, P., Jones, G.J., Smith, W., Blakeley, R.L. (2001). Characterisation of a Gene Cluster Involved in Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Toxin MC-LR. *Environ Toxicol.* 16: 523-534.
- Box, J. D. (1981). Enumeration of cell concentrations in suspensions of colonial freshwater microalgae, with particular reference to *Microcystis aeruginosa*. *British Phycological Journal*, 16(2), 153-164.
- Briand, E.C., Yepremian, C., Humbert, J.F., Quiblier, C. (2008). Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environ. Microbiol.* 10, 3337–3348.
- 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.
- Buchanan, R.L. (1992). Predictive microbiology. Mathematical modeling of microbial growth in foods. ACS Symposium Series 484 Ch 24,250-260.
- Buelvas Salgado, G.A. (2013). Desarrollo y validación de modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano para estimación de la vida útil en jamón lonchado empacado al vacío. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Butterwick, C., Heaney, S. I., & Talling, J. F. (2005). Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biology*, 50(2), 291-300.

- Camargo, J.A., Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno orgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua e implicancias del cambio climático. *Ecosistemas*. 16(2):98-110 pp.
- Canabaeus, L. (1929). Über die Heterocysten und Gasvakuolen der Blaualgen und ihre Beziehung zueinander. *Pflanzenforschung*, 13, 1-48.
- Canter-Lund, H., Lund, J. (1995). *Freshwater algae: their microscopic world explored* (No. 582.26 CAN).
- Cao, H. S., Kong, F. X., Luo, L. C., Shi, X. L., Yang, Z., Zhang, X. F., Tao, Y. (2006). Effects of wind and wind-induced waves on vertical phytoplankton distribution and surface blooms of *Microcystis aeruginosa* in Lake Taihu. *Journal of Freshwater Ecology*, 21(2), 231-238.
- Cárdenas, M.A. (2008). Detección de cianobacterias toxigénicas pertenecientes al género *Microcystis* mediante marcadores moleculares y ensayos biológicos (Tesis inédita). Inst. Politécnico Nac., México.
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 72(6), 445-459.
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., ... Eaglesham, G. K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental health perspectives*, 109(7), 663.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S. y Wiegand, C. (2006). Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis* A field and laboratory study 2005. *Aquatic Toxicology*, 75: 178–190.
- Céspedes Molina, G. A. (2012). Predicción del comportamiento de *Escherichia coli* en leche cruda al elevar la temperatura hasta la pasteurización aplicando microbiología predictiva. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito.
- Chalar, G., L. De León, E. Brugnoli, J. Clemente, M. Paradiso. (2002). Antecedentes y nuevos aportes al conocimiento de la estructura y dinámica del Embalse Salto Grande. en: Fernández-Cirelli, A., G. Chalar (eds). *El agua en Iberoamérica: de la Limnología a la Gestión en Sudamérica*. CYTED, XVII. Bs.As. 123-141pp.
- Chang Fornaris, L. (1998) 6° Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CICTA 6, Cuba
- Chen, J., Xie, P., Guo, L., Zheng, L., Ni, L. (2005). Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and-RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Environmental pollution*, 134(3), 423-430.

- Chen, J., Xie, P., Zhang, D., Ke, Z., Yang, H. (2006). In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture*, 261: 1026–1038.
- Chen, J., Xie, P., Zhang, D. y Lei, H. (2007). In situ studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish e bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environmental Pollution*, 147: 150-157.
- Chen, J., Zhang, D., Xie, P., Wang, Q., Ma, Z. (2009). Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Science of the Total Environment*, 407: 3317–3322.
- Chen, J., Hu, J.B., Zhou, W., Yan, S.H., Yang, J.D., Xeu, Y.F., Shi, Z.Q. (2010). Degradation of microcystin-LR and RR by a *Stenotrophomonas* sp. strain EMS isolated from lake Taihu, China. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 896-911.
- Chorus, I., Mur, L. R. (1999). Preventative measures. En: *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and managment*. E&FN Spon. 235-273
- Chorus, I., Bartram, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, Chapman and Hall. Disponible al 20/12/2010, en: http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxicyanbact/en/
- Chow, C. W., Drikas, M., House, J., Burch, M. D., Velzeboer, R. M. (1999). The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, 33(15), 3253-3262.
- Christoffersen, K., Lyck, S., Winding, A. (2002). Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquatic Microbial Ecology*, 27(2), 125-136.
- Codd, G.A., Poon, G.K. (1988). Cyanobacterial toxins. *Proc. Phytochem. Soc. Eur.* 28, 283–296.
- Codd G. A., Ward C. J., Bell S. G. (1997) Cyanobacterial toxins: occurrence, modes of action, health effects and exposure routes,” *Archives of Toxicology. Supplement*, 19: 399– 410.
- Coll-Cardenas, F. J., Giannuzzi, L., Noia, M. A., & Zaritzky, N. E. (2001). El modelado matemático: Una herramienta útil para la industria alimenticia. *Ciencia Veterinaria*, 3(1).
- Colwell, R.R., Grims, D.J. (2000) Semantics and strategies, p. 3. In: Colwell RR, Grimes DJ (Eds.) *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. ASM Press, Washington, DC.
- Contreras Flores, C., Peña Castro, J. M., Flores Cotera, L. B., Cañizares Villanueva, R. O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(8).

- Cooper, K.E. (1963). Effect of temperature on growth lag of a *Staphylococcus* species in peptone medium. In: Kavanagh, F. (Ed.), Analytical Microbiology. Academic Press, New York, pp. 46–51.
- Cousins, I.T., Bealing, D.J., James, H.A., Sutton, A. (1996). Biodegradation of MC-LR by indigenous mixed bacterial populations. Water Res. 30:481–485.
- Crettaz Minaglia, M. C., Bordet, H. F. (2013). Aplicación de índices de estado trófico en el embalse de Salto Grande. Scientia Interfluvius, 4 (1-2): 40-53.
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. Harmful algae, 8(5), 715-725.
- Deblois, C.P., Juneau, P (2010). Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiances. Harmful algae, 9: 18:24.
- Deblois, C.P., Aranda-Rodriguez, R., Gianic, A. y Bir, D.F. (2008). Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. Toxicon, 51: 435–448.
- Diaz, R., Gamazo, C., Lopez-Goñi, I. (1995). Manual práctico de Microbiología. Allergologia et Immunopathologia, 23, 47-47.
- Downing, T. G., Meyer, C., Gehringer, M. M., Van de Venter, M. (2005). Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. Environmental toxicology, 20(3), 257-262.
- Drikas, M., Chow, C. W., House, J., Burch, M. D. (2001). Toxic cyanobacteria. American Water Works Association. Journal, 93(2), 100.
- Dziallas, C., Grossart, H.P. 2011^a. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis sp.* Environmental microbiology, 13(6), 1632-1641.
- Dziallas, C., Grossart, H.P. 2011^b. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis sp.* PLoS One, 6(9), e25569.
- Dziallas, C., Grossart, H. P. (2012). Microbial interactions with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature. Marine biology, 159(11), 2389-2398.
- Echenique, R., Giannuzzi, L., Ferrari, L., & González, D. (2003). Estudios sobre la calidad del agua de red en Bahía Blanca, Argentina. In 13° Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente (pp. 1-18).
- Echenique, R., Rodríguez, J., Caneo, M., Giannuzzi, L., Barco, M., Rivera, J., Caixach, J., Andrinolo, D. (2006). Microcystins in the drinking water supply in the cities of Ensenada and La Plata

- (Argentina). In Congresso Brasileiro de Ficología & Simposio Latino-Americano de Algas Nocivas.
- Edge, R., McGarvey, D. J., y Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants—a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189-200.
- Edwards, C., Lawton, L.A. (2009) Bioremediation of cyanotoxins. In: Laskin AI, Gadd GM, Sariaslani S (eds) *Advances in applied microbiology*. Academic Press, New York, pp 109–129.
- Eleuterio, L., Batista, J.R. (2010). Biodegradation studies and sequencing of microcystin-LR degrading bacteria isolated from a drinking water biofilter and a fresh water lake. *Toxicon*, 55: 1434-1442.
- Ellis, D., Bouchard, C., Lantagne, G. (2000). Removal of iron and manganese from groundwater by oxidation and microfiltration. *Desalination*, 130(3), 255-264.
- US EPA, 2015. Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystins Toxins.
- Fabre-Iturburúa, M.A. (2011). Flexibilidad Fenotípica de la Cianobacteria Invasora *Cylindrospermopsis Raciborskii* En Un Gradiente Lumínico. Tesis de grado. Montevideo, Uruguay.
- Falconer, I. R., Runnegar, M. T., Buckley, T., Huyn, V. L., Bradshaw, P. (1989). Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *Journal (American Water Works Association)*, 102-105.
- Falkowski, P. & Raven, J. 1997. *Aquatic photosynthesis*. Massachusetts, Blackwell Science.
- Falkowski, PG, Katz, ME, Knoll, AH, Quigg, A., Raven, JA, Schofield, O., Taylor, FJR (2004). La evolución del fitoplancton eucariótico moderno. *ciencia* , 305 (5682), 354-360.
- Fladmark, K. E., Serres, M. H., Larsen, N. L., Yasumoto, T., Aune, T., DØskeland, S. O. (1998). Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon*, 36(8), 1101-1114.
- Fleming, L. E., Rivero, C., Burns, J., Williams, C., Bean, J. A., Shea, K. A., & Stinn, J. (2002). Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae*, 1(2), 157-168.
- Flett, R. J., Schindler, D. W., Hamilton, R. D., Campbell, N. E. (1980). Nitrogen fixation in Canadian Precambrian shield lakes. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 37(3), 494-505.
- Francis, G. W., Hertzberg, S., Andersen, K., y Liaaen-Jensen, S. (1970). New carotenoid glycosides from *Oscillatoria limosa*. *Phytochemistry*, 9(3), 629-635.
- Freitas, A. M. D., Sirtori, C., Peralta-Zamora, P. G. (2008). Evaluation of advanced oxidation processes for remediation of contaminated water with geosmin and 2-MIB. *Química Nova*, 31(1), 75-78.

- Fujimoto, N., Sudo, R., Sugiura, N., Inamori, Y. (1997). Nutrient - limited growth of *Microcystis aeruginosa* and *Phormidium tenue* and competition under various N: P supply ratios and temperatures. *Limnology and Oceanography*, 42(2), 250-256.
- Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C., Song, L. (2012). The role of microcystins in maintaining colonies of bloom - forming *Microcystis spp.* *Environmental Microbiology*, 14(3), 730-742.
- Geeraerd, a H., Valdramidis, V. P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., & Van Impe, J. F. (2004). Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International journal of food microbiology*, Vol. 91(3), Pág. 229–44.
- Geng, L., Qin, B., Yang, Z. (2013). Unicellular *Microcystis aeruginosa* cannot revert back to colonial form after short-term exposure to natural conditions. *Biochemical Systematics and Ecology*, 51, 104-108.
- Gerloff, G. C., Fitzgerald, G. P.; Skoog, F. (1950). The isolation, purification, and culture of blue-green algae. *American Journal of Botany*, 216-218.
- Gerloff, G. C., Fitzgerald, G. P.; Skoog, F. (1952). The mineral nutrition of *Microcystis aeruginosa*. *American Journal of Botany*, 26-32.
- Giannuzzi, L., Pinotti, A., & Zaritzky, N. (1998). Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 39(1), 101-110.
- Giannuzzi L., Carvajal G., Corradini M. G., Araujo Andrade C., Echenique R., Andrinolo D. (2012). Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in Río de la Plata Estuary, Argentina – field study and data analysis, *J. of Toxicology*, Article ID 373618, doi:10.1155/2012/373618.
- Giannuzzi, L., Krock, B., Crettaz-Minaglia, M. C. , Rosso, L., Houghton, C., Sedan, D., ... & Hernando, M. (2016). Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 189, 22-30.
- Giaramida, L., Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B., Lawton, L.A. (2012). Bacterial communities response to microcystins exposure and nutrient availability: linking degradation capacity to community structure. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Artículo en prensa.

- Gibson, A. M., Bratchell, N., Roberts, T. A. (1988). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International journal of food microbiology*, 6(2), 155-178.
- Gompertz, B. (1825). On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 115, 513-583.
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C., y Simões, M. (2016). The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: an experimental and mathematical approach. *RSC Advances*, 6(27), 22896-22907.
- Gonzalez, M.A., Parra, O.O., Cifuentes, A.S. (1995). En: Alveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C. y Sar, E. (Eds.) 1995. *Manual de métodos ficológicos*. Editora Anibal Pinto S.A., Chile: 219-250.
- Gorham, P. R., 1964. Toxic algae. In: D. F. Jackson (ed.), *Algae and man*. Plenum Press, New York, N.Y., 307–336.
- Graham, L.E., Wilcox, L.W. (2000). Cyanobacteria (Chloroxybacteria). En: Graham, L.E. y Wilcox, L.W. (eds.). *Algae*, Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall. 97-131 pp.
- Harada, K. I. (1996). Chemistry and detection of microcystins. En: *Toxic microcystis*. CRC Press. 103-148.
- Harada, K.I., Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Ito, E., Tsuji, K. (2004). Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon*, 44, 107-109.
- Harold, F. M. (1963). ACCUMULATION OF INORGANIC POLYPHOSPHATE IN AEROBACTER AEROGENES I. Relationship to Growth and Nucleic Acid Synthesis. *Journal of bacteriology*, 86(2), 216-221.
- Harold, F. M. (1964). Enzymic and genetic control of polyphosphate accumulation in *Aerobacter aerogenes*. *Microbiology*, 35(1), 81-90.
- Harold, F. M. (1966). Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriological Reviews*, 30(4), 772.
- Heresztyn, T. y Nicholson, B.C. 2001. Determination Of Cyanobacterial Hepatotoxins Directly In Water Using A Protein Phosphatase Inhibition Assay. *Wat. Res.*, 35, (13): 3049–3056.
- Hill, W. (1996). Effects of light. *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*, 121-148.
- Himberg, K., Keijola, A. M., Hiisvirta, L., Pyysalo, H., Sivonen, K. (1989). The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study. *Water Research*, 23(8), 979-984.

- Hirschberg, J., y Chamovitz, D. (1994). Carotenoids in cyanobacteria. In *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 559-579). Springer Netherlands.
- Ho, L., Meyn, T., Keegan, A., Hoefel, B., Saint, C.P., Newcombe, G. (2006). Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. *Water Research*, 40, 768-774.
- Ho, L., Hoefel, D., Saint, C.P. y Newcombe, G. (2007^a). Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. *Water Research*, 41, 4685-4695.
- Ho, L., Gaudieux, A.L., Fanox, S., Newcombe, G. y Humpage, A.R. (2007^b). Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicology. *Toxicology*, 50: 438-441.
- Ho, L., Hoefel, D., Palazot, S., Sawade, E., Newcombe, G., Saint, C.P. y Brookes, J.D. (2010). Investigations into the biodegradation of microcystin-LR in wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 180, 628-633.
- Ho, L., Tang, T., Monis, P.T., Hoefel, D. (2012^a). Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. *Chemosphere*, 87: 1149-1154.
- Ho, L., Sawade, E., Newcombe, G. (2012^b). Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal: A review. *Water Research*, 46: 1536-1548.
- Hoeger, S.J., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R. (2005). Occurrence and elimination of cyanobacteria toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 231-242.
- Honkanen, R. E., Zwiller, J., Moore, R. E., Daily, S. L., Khatral, B. S., Dukelow, M., Boynton A. L. (1990) Characterization of Microcystin-LR, a Potent Inhibitor of Type 1 and Type 2A Protein Phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry* 265(32):19401-19404.
- Hoppe, H.G. (1981). Blue-green algae agglomeration in surface water: A microbiotope of high bacterial activity. *Kieler Meeresforsch*, 5: 291-303.
- Hu, L.B., Yang, J.D., Zhou, W., Yin, Y.F., Chen, J., Chi, Z.Q. (2009). Isolation of a *Methylobacillus sp.* that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria. *New biotechnology*, 26 (3/4), 205-211.
- Hu, L., Zhang, F., Liu, C., Wang, M. (2012). Biodegradation of microcystin by *Bacillus sp.* strain EMB. *Energy Procedia*, 16: 2054-2059.
- Hyenstrand, P., Blomqvist, P., Pettersson, A. (1998). Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems: a literature review. *Archiv für Hydrobiologie Spec. Iss. Advances in Limnology*, 51, 41-62.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2010). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 94, v.

- Ibelings BW, Bruning K, de Jonge J, Wolfstein K, Pires L M D, Postma J, Burger T. (2005). Distribution of microcystins in a lake foodweb: No evidence for biomagnification. *Microbial Ecology* 2005; 49: 487-500.
- Imai, H., Chang K., Kusaba M., Nakano S. (2009). Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii*. *Journal of plankton research* 31 (2), 171–178.
- Ishii, H., Nishijima, M., Abe, T. (2004). Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a Gram-negative aerobic bacterium. *Water Research*, 38, 2667-2676.
- Jacob, J., (1995). Phosphate deficiency increases the rate constant of thermal dissipation of excitation energy by photosystem II in intact leaves of sunflower and maize. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 417–424.
- Jacobson, L., Halmann, M. (1982). Polyphosphate metabolism in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research*, 4(3), 481-488.
- Jähnichen, S., Petzoldt, T., Benndorf, J. (2001). Evidence for control of microcystin dynamics in Bautzen Reservoir (Germany) by cyanobacterial population growth rates and dissolved inorganic carbon. *Archiv für Hydrobiologie*, 177-196.
- Jähnichen, S., Ihle, T., Petzoldt, T. (2008). Variability of microcystin cell quota: a small model explains dynamics and equilibria. *Limnologia-Ecology and Management of Inland Waters*, 38(3), 339-349.
- Jähnichen, S., Long, B. M., Petzoldt, T. (2011). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa*: Direct regulation by multiple environmental factors. *Harmful Algae*, 12, 95-104.
- Jang, M. H., Ha, K., Joo, G. J., Takamura, N. (2003). Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*, 48(9), 1540-1550.
- Jang, M. H., Jung, J. M., Takamura, N. (2007). Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and infochemical concentrations. *Limnology and Oceanography*, 52(4), 1454-1466.
- Jiang, Y., Ji, B., Wong, R. N. S., & Wong, M. H. (2008). Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. *Harmful algae*, 7(2), 127-136.
- Jiang, Y., Shao, J., Wu, X., Xu, Y., Li, R. (2011). Active and silent members in the *mlr* gene cluster of a microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China. *FEMS microbiology letters*, 322(2), 108-114.

- Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E., ... & Azevedo, S. M. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 338(13), 873-878.
- Joehnk, K. D., Huisman, J. E. F., Sharples, J., Sommeijer, B. E. N., Visser, P. M., Stroom, J. M. (2008). Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global change biology*, 14(3), 495-512.
- Jones, G., Minatol, W., Craig, K., Naylor, R. (1993). Removal of low level cyanobacterial peptide toxins from drinking water using powdered and granular activated carbon and chlorination-results of laboratory and pilot plant studies. In *Proceedings of the 15th Federal Convention of the Australian Water and Wastewater Association* (pp. 339-346).
- Jones, G. J., Orr P.T. (1994). Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.*, 28: 871–876.
- Jones, G. J., Bourne, D. G., Blakeley, R. L., Doelle, H. (1994). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Natural toxins*, 2(4), 228-235.
- Kang, Y-H, Park, C-S, Han, M-S. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 a useful bacterium capable of lysing *Microcystis aeruginosa* cells and degrading microcystins. *Appl. Phycol.*, 24: 1517-1525.
- Kato, A., Imanishi, S.Y., Tsuji, K., Harada, K. (2007). Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides. *Water Research*, 41, 1754-1762.
- Keijola, A. M., Himberg, K., Esala, A. L., Sivonen, K., Hiis - Virta, L. (1988). Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot - scale experiments. *Environmental Toxicology*, 3(5), 643-656.
- Kenefick, S.L., Hrudey, S.E., Peterson, H.G., Prepas, E.E. (1993). Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water Sci Technol.* 27:433–440.
- Kyselkova, I., MARŠÁLEK, B. (2000). Use of *Daphnia pulex*, *Artemia salina* and *Tubifex tubifex* for cyanobacterial microcystins toxicity detection. *Biologia*, 55, 637-643.
- Kirk, J. T. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge university press.
- Komárek, J. (1991). A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* 64:115–127.
- Koneman, E. W., Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.

Kormas, K. A., Lympelopoulou, D. S. (2013). Cyanobacterial toxin degrading bacteria: who are they?. BioMed Research International.

Kotak, B. G., Lam, A. K. Y., Prepas, E. E., Kenefick, S. L.; Hrudey, S. E. (1995). VARIABILITY OF THE HEPATOTOXIN MICROCYSTIN LAKES. *Journal of phycology*, 31(2), 248-263.

-LR IN HYPE

Kotak, B.G., Zurawell, R., Prepas, E., Holmes, C.F. (1996). Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1996; 53: 1974–85.

Kromkamp, J., van den Heuvel, A., Mur, L. R. (1989). Phosphorus uptake and photosynthesis by phosphate-limited cultures of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *British Phycological Journal*, 24(4), 347-355.

Krüger, G. H. J.; Eloff, J. N. (1978). The effect of temperature on specific growth rate and activation energy of *Microcystis* and *Synechococcus* isolates relevant to the onset of natural blooms. *Journal of the Limnological Society of Southern Africa*, 4(1), 9-20.

Krüger, T., Hölzel, N., Luckas, B. (2012). Influence of cultivation parameters on growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) isolated from Lake Chao (China). *Microbial ecology*, 63(1), 199-209.

Kuriama, F., Kiyomi-Kuroda, E., Bigetti-Guergoletto, Garcia, S., De Andrade, G., Kiyomi, T., Harada, K.I., Hirooka, E.Y. (2012). Potencial de biodegradação de microcistinas por microorganismos. *Eng. Sanit. Ambient*, 17 (2): 181-186.

Lahiti K, Hiisverta L. (1989). Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes—review of studies conducted in Finland. *Water Supply*. 7:149–154.

Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M., Sivonen, K. (1997). Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Research*, 31(5), 1005-1012.

Lam, A. K. Y., Prepas, E. E., Spink, D., Hrudey, S. E. (1995). Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. *Water Research*, 29(8), 1845-1854.

Laurén-Määttä C, Hietala J M, Walls M, Responses of *Daphnia pulex* populations to toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology* 1997; 37: 635-647.

Lawton, LA, Campbell, DL, Beattie, KA, Codd, GA (1990). Uso de un ensayo rápido de bioluminiscencia para detectar toxicidad por microcistina cianobacteriana. *Cartas en microbiología aplicada*, 11 (4), 205-207.

- Lee, S. J., Jang, M. H., Kim, H. S., Yoon, B. D., Oh, H. M. (2000). Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N: P ratio and growth stage. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 323-329.
- Lee, Y. J., Jung, J. M., Jang, M. H., Ha, K., Joo, G. J. (2006). Degradation of microcystins by adsorbed bacteria on a granular active carbon(GAC) filter during the water treatment process. *Journal of Environmental Biology*, 37(2), 317-322.
- Lehman, P.W., Boyer, G., Satchwell, M., Waller, S. (2008). The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco. *Estuary Hydrobiol.* 600, 187– 204.
- Lemes GAF, Kersanach R, Pinto LS, Dellagostin OA, Yunes JS, Mattheinsen A. (2008). Biodegradation of microcystins by aquatic Burkholderia sp. from a south Brazilian coastal lagoon. *Ecotoxicol Environ Saf.* 69:358–365.
- Lick. 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *Journal Of Plankton Research*, 26 (7): 727-736.
- Limei, S. H. I., Yuanfeng, C. A. I., Hualin, Y. A. N. G., Peng, X. I. N. G., Pengfu, L. I., Lingdong, K. O. N. G., Fanxiang, K. O. N. G. (2009). Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria. *Journal of Environmental Sciences*, 21(11), 1581-1590.
- Li, J., Shimizu, K., Utsumi, M., Nakamoto, T., Sakharkar, M. K., Zhang, Z., Sugiura, N. (2011). Dynamics of the functional gene copy number and overall bacterial community during microcystin-LR degradation by a biological treatment facility in a drinking water treatment plant. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(6), 695-701.
- Li, H., Pan, G. (2014). Enhanced and continued degradation of microcystins using microorganisms obtained through natural media. *Journal of microbiological methods*, 96, 73-80.
- Li, H., Pan, G. (2015). Simultaneous removal of harmful algal blooms and microcystins using microorganism-and chitosan-modified local Soil. *Environmental science & technology*, 49(10), 6249-6256.
- 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.

- Lu, Z., Sebranek, J. G., Dickson, J. S., Mendonca, A. F., Bailey, T. B. (2005). Application of predictive models to estimate *Listeria monocytogenes* growth on frankfurters treated with organic acid salts. *Journal of food protection*, 68(11), 2326-2332
- Lürling, M., Eshetu, F., Faassen, E.J., Kosten, S., Huszar, V.L.M. (2013). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshw. Biol.* 58 (3), 552–559.
- Ma, M., Liu, R., Liu, H., Qu, J., Jefferson, W. (2012). Effects and mechanisms of pre-chlorination on *Microcystis aeruginosa* removal by alum coagulation: significance of the released intracellular organic matter. *Separation and purification technology*, 86, 19-25.
- MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana.
- MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S. Cohen, P., Codd, G. A. (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264:187-192.
- Magalhães V F, Soares R M, Azevedo S. (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*; 39: 1077-1085.
- Magalhães, V.F., Marinho M.M., Domingos, Oliveira, P.C.A., Costaa S.M., Azevedo, L.O. y Azevedo, S.M.F.O. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 42: 289–295.
- Maghsoudi, E., Fortin, N., Greer, C., Duy, S. V., Fayad, P., Sauvé, S., Prévosta, M., Dorner, S. (2015). Biodegradation of multiple microcystins and cylindrospermopsin in clarifier sludge and a drinking water source: effects of particulate attached bacteria and phycocyanin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 409-417.
- Manage, P.M., Kawabata, Z.I., Nakano, S.I. (2000). Algicidal effect of the bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. *Aquat. Microb. Ecol.*, 22: 111-117.
- Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B.K., Lawton, L.A. (2009). Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (21), 6924-6928.
- Manage, P.M., Edwards, C., Lawton, L.A. (2010). Bacterial degradation of microcystin. N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe (Eds). *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*, Terrapub, 97–104.
- MARGALEF, R., PLANAS, D., ARMENGOL, J., VIDAL, A., PRAT, N., GUISET, A., ..., ESTRADA, M. (1976). *Limnología de los embalses españoles*, Dirección General de Obras Públicas. Centro de Estudios Hidrográficos.

- Marker, A.F.H., Crowther, C.A., Gunn, R.J.M., (1980). Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14, 52–69.
- Maruyama, T., Kato, K., Yokoyama, A., Tanaka, T., Hiraishi, A., Park, H.D. (2003). Dynamics of microcystin-degrading bacteria in mucilage of *Microcystis*. *Microb. Ecol.*, 46, 279-288.
- Maruyama, T., Park, H.D., Ozawa, Z., Tanaka, Y., Sumino, T., Hamana, K., Hiraishi, A., Kato, K. (2006). *Sphingosinicella microcystinivorans* Gen. Nov., Sp. Nov., a microcystin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 85-89.
- McDonald, K., Sun, D. W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International journal of food microbiology*, 52(1), 1-27.
- McElhiney, J., Lawton, L. A. (2005). Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and applied pharmacology*, 203(3), 219-230.
- McMeekin, T. A., Mellefont, L. A., Ross, T. (2007). Predictive microbiology: past, present and future. *Modelling microorganisms in food*, 1, 7-11.
- McQueen, D. J., Lean, D. R. S. (1987). Influence of water temperature and nitrogen to phosphorus ratios on the dominance of blue-green algae in Lake St. George, Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(3), 598-604.
- Mehnert, G., Leunert, F., Cirés, S., Jöhnk, K. D., Rucker, J., Nixdorf, B., Wiedner, C. (2010). Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *Journal of Plankton Research*, 32(7), 1009-1021.
- Meissner, S., Fastner, J., Dittmann, E. (2013). Microcystin production revisited: conjugate formation makes a major contribution. *Environ. Microbiol.* 15 (6), 1810–1820.
- Meissner, S., Steinhauser, D., Dittmann, E. (2014). Metabolomic analysis indicates a pivotal role of the hepatotoxin microcystin in high light adaptation of *Microcystis*. *Environ. Microbiol.* 17(5), 1497–1509.
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T. (2003). The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *Int. J. FoodMicrobiol.* 83, 281–293.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baures, E., Thomas, O. (2013). State of Knowledge and Concerns on Cyanobacterial Blooms and Cyanotoxins. *Environmental International*, 59:303.
- Meriluoto, J., Gueimonde, M., Haskard, A., Spoof, L., Sjövall, O., Salminen, S. (2005). Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by human probiotics. *Toxicon*, 46, 111-114.
- Miao, H., Tao, W. (2009). The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal. *Separation and Purification Technology*, 66(1), 187-193.

- Molina, M. y Giannuzzi, L. (1999). Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Food research international*, 32(10), 677-682.
- Momo, F. R. C., Capurro, A. F. (2006). *Ecología matemática: principios y aplicaciones*. Ediciones Cooperativas.
- Morales, E. A., Rivera, S. F., Vildoza, L. H., Pol, A. (2017). Floración algal nociva (FAN) producida por cianobacterias en la laguna Alalay, Cochabamba, Bolivia. *Acta Nova*, 8(1), 50-75.
- Moreno, I., Repetto, G., Cameán, A. (2003). Interés toxicológico de las microcistinas. *Rev. Toxicol.* (2003) 20: 159-165.
- Mowe, M. A., Porojan, C., Abbas, F., Mitrovic, S. M., Lim, R. P., Furey, A., Yeo, D. C. (2015). Rising temperatures may increase growth rates and microcystin production in tropical *Microcystis* species. *Harmful Algae*, 50, 88-98.
- Müller, P., Li, X-P., Niyogi, K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125:1558-1566.
- Myers, J., Kratz, W. A. (1955). Relations between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue-green alga. *The Journal of General Physiology*, 39(1), 11-22.
- Neilan, B. A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R. A., Schaub, V., Sivonen, K., Brner, T. (1999) Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxigenicity of Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 181(13):4089-4097.
- Niedermeyer, T. (2013). Microcystin Congeners Described in the Literature. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.880756>.
- Nybom, S.M.K., Salminen, S.J., Meriluoto, J.A.O. (2008). Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. *Toxicon*, 52, 214-220.
- Nybom, S.M.K., Dziga, D., Heikkila, J.E., Kull, T.P.J., Salminen, S.J., Meriluoto, J.A.O. (2012). Characterization of microcystin-LR removal process in the presence of probiotic bacteria. *Toxicon*, 59: 171-181.
- Oh, H. M., Rhee, G. Y. (1991). A comparative study of microalgae isolated from flooded rice paddies: light-limited growth, C fixation, growth efficiency and relative N and P requirement. *Journal of applied phycology*, 3(3), 211-220.
- Oh, H. M., Lee, S. J., Jang, M. H.; Yoon, B. D. (2000). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 176-179.

- Okano K., Shimizu K., Kawauchi Y., Maseda H., Utsumi M., Zhang Z., Neilan B., Sugiura N. (2009) Characteristics of a Microcystin-Degrading Bacterium under Alkaline Environmental Conditions. *Journal of Toxicology*, Article ID 954291, doi:10.1155/2009/954291.
- Okada, M., Sudo, R., Aiba, S. (1982). Phosphorus uptake and growth of blue - green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(1), 143-152.
- Oliver, R. L., Ganf, G. G. (2000). Freshwater blooms. In *The ecology of cyanobacteria* (pp. 149-194). Springer Netherlands.
- OMS. (2003). Algae and cyanobacteria in fresh water. In: *Guidelines for safe and recreational water environments*. Vol 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 136-158.
- Orr, P. T., Jones, G. J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen - limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and oceanography*, 43(7), 1604-1614.
- Ouzounidou, G. (1995). Cu-ions mediated changes in growth, chlorophyll and other ion contents in a Cu-tolerant *Koeleria splendens*. *Biologia plantarum*, 37(1), 71-78.
- Paerl, H. W., Huisman, J. (2008). Blooms like it hot. *Science*, 320(5872), 57-58.
- Paerl, H. W., Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental microbiology reports*, 1(1), 27-37.
- Palacio-Bohórquez, D. (2016). EFECTO DE LOS ESPECTROS DE LUZ AZUL, ROJA Y VERDE EN LA MULTIPLICACIÓN CELULAR Y SÍNTESIS BIOQUÍMICA DE *Rhodomonas* spp. Y *Tetraselmis* spp. EN CONDICIONES IN VITRO. Tesis de grado. Guayaquil, Ecuador.
- Papineau, D., Walker, J. J., Mojzsis, S. J., Pace, N. R. (2005). Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4822-4832.
- Park, H.D., Sasaki, Y, Maruyama, T, Yanagisawa, E., Hiraishi, A., Kato, K. (2001). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ Toxicol*, 16, 337-343.
- Perez, S., Aga, D. S. (2005). Recent advances in the sample preparation, liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(7), 658-670.
- Pérez, D. S., Soraci, A. L., Tapia, M. O. (2008). cianobacterias y cianotoxinas: rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. *Analecta Veterinaria*, 28.

- Peterson, H. G., Hrudey, S. E., Cantin, I. A., Perley, T. R., Kenefick, S. L. (1995). Physiological toxicity, cell membrane damage and the release of dissolved organic carbon and geosmin by *Aphanizomenon flos-aquae* after exposure to water treatment chemicals. *Water Research*, 29(6), 1515-1523.
- Pflugmacher, S. (2002). Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin - LR, in aquatic ecosystems. *Environmental toxicology*, 17(4), 407-413.
- Plastino y Mansilla. (2004). Capítulo: Luz y fotosíntesis. Werlinger, Camilo. *Biología marina y oceanografía: conceptos y procesos*. Gobierno de Chile, Consejo Nacional del Libro y la Lectura.
- Plummer, J. D., Edzwald, J. K. (2002). Effects of chlorine and ozone on algal cell properties and removal of algae by coagulation. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 51(6), 307-318.
- Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T. S., Ward, C. J., ..., Codd, G. A. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 352(9121), 21-26.
- Qi, Y., Rosso, L., Sedan, D., Giannuzzi, L., Andrinolo, D., Volmer, D. A. (2015). Seven new microcystin variants discovered from a native *Microcystis aeruginosa* strain—unambiguous assignment of product ions by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(2), 220-224.
- Quesada, A., Carrasco, D., Cirés, S. (2006). *Cianobacterias en aguas de consumo y recreo: un problema de todos*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid, 1-10.
- Ramani, A., Rein, K., Shetty, K.G., Jayachandran, K. (2012). Microbial degradation of microcystin in Florida's freshwater. *Biodegradation*.
- Rao, I., (1997). The role of phosphorus in photosynthesis. In: Pessaraki, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 173–194.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., & Niemelä, S. I. (1997). Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2206-2212.
- Rapala, J., Berg, K. A., Lyra, C., Niemi, R. M., Manz, W., Suomalainen, S., Paulin, L., Lahti, K. (2005). *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1563-1568.
- Raps, S., Wyman, K., Siegelman, H. W., Falkowski, P. G. (1983). Adaptation of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to light intensity. *Plant Physiology*, 72(3), 829-832.

- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 154, 1222–1226.
- Redfield, A. C. (1934). On the proportions of organic derivatives in a sea water and their relation to the composition of plankton. James Johnstone memorial volume, 177-192.
- Reynolds, C. S., Walsby, A. E. (1975). Water - blooms. *Biological reviews*, 50(4), 437-481.
- Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of plankton research*, 24(5), 417-428.
- Rhee, G. Y. (1980). Continuous culture in phytoplankton ecology. *Adv. in Aquatic Microbiology*, 151-203.
- Rios-Jacinavicius, F., Gama-Jr., W.A., Azevedo, M.T.P., Sant'Anna, C.L. (2013) Manual para cultivo de cianobactérias. Publicações Virtuais, Instituto de Botânica, São Paulo, 32 pp. Disponible en: http://botanica.sp.gov.br/files/2013/09/virtuais_4cianobact%C3%A9rias.pdf.
- Rippka, R., Deruells, J., Waterbury, J.B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61.
- Robarts, R. D., Zohary, T. (1984). *Microcystis aeruginosa* and underwater light attenuation in a hypertrophic lake (Hartbeespoort Dam, South Africa). *The Journal of Ecology*, 1001-1017
- Robarts, R. D., Zohary, T. (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom - forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21(3), 391-399.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M. (1998). The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 83–92.
- Roset, J., Aguayo, S., Muñoz, M.J. (2001) Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología*. 18:65-71.
- Ross, T. (1999). Predictive Food Microbiology Models in the Meat Industry (MSRC.003). Meat and Livestock, Australia.
- Ross, C., Santiago-Vázquez, L., Paul, V. (2006). Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 78(1), 66-73.
- Rosso, L., Sedan, D. Y., Kolman, M. D. L. A., Caixach, J., Flores, C., Oteiza, J. M., ...Andrinolo, D. (2014). *Microcystis aeruginosa* strain [D-Leu1] Mcyst-LR producer, from Buenos Aires province, Argentina.

- Runnegar, M. T. C., Falconer, I. R., Jackson, A. R. B.; McInnes, A. (1983). Toxin production by *Microcystis aeruginosa* cultures. *Toxicon*, 21, 377-380.
- Saito, T., Okano, K., Park, H. D., Itayama, T., Inamori, Y., Neilan, B. A., Burns, B., Sugiura, N. (2003). Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiology Letters*, 229(2), 271-276.
- Saitou, T., Sugiura, N., Itayama, T., Inamori, Y., Matsumura, M. (2002). Degradation of microcystin by biofilm in practical treatment facility. *Water science and technology*, 46 (11-12), 237-244.
- Saitou, T., Sugiura, N., Itayama, T., Inamori, Y., Matsumura, M. (2003). Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 52(1), 13-18.
- Salomon, P. S., Janson, S., Graneli, E. (2003). Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. *Harmful Algae*, 2: 261–272.
- Sathya, K., Saranya, P., Swarnalatha, S., Mandal, A. B., Sekaran, G. (2015). Removal of microcystin-RR, a membrane foulant using exocellular polymer from *Enterobacter ludwigii*: Kinetic and isotherm studies. *Desalination*, 369, 175-187.
- Scheffer, M. (2004). *Ecology of shallow lakes*. Springer Science & Business Media.
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, 195(4275), 260-262.
- Schreurs, H. (1992). *Cyanobacterial dominance relations to eutrophication and lake morphology*. Amsterdam.
- Scott, W.E., Barlow, D.J., Hauman, J.H. (1981). In *The Water Environment: Algal Toxins and Health*, p. 49-69 (Carmichael, W., Ed.). New York: Plenum Press.
- Šejnohová, L. (2008). *New findings in peptide production, taxonomy and autecology by cyanobacterium Microcystis*. PHD Thesis. Průhonice, Czech Republic.
- Shen, P. P., Shi, Q., Hua, Z. C., Kong, F. X., Wang, Z. G., Zhuang, S. X., Chen, D. C. (2003). Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Environment International*, 29(5), 641-647.
- Shen, H., Niu, Y., Xie, P., Tao, Min, Yang, X. (2011). Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshwater Biol.* 56, 1065–1080.
- Shetty, P. H., Jespersen, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology* 17: 48–55

- Shimizu, K., Maseda, H., Okano, K., Itayama, T., Kawauchi, Y., Chen, R., Utsumi, M., Zhang, Z., Sugiura, N. (2011). How microcystin -degrading bacteria express microcystin degradation activity. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 16(3), 169-178.
- Sivonen, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate orthophosphate, and bacteria on growth and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2658–2666.
- Smith, V. H. (1983). Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science(Washington)*, 221(4611), 669-671.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G. (1969). *Statistical Methods*, 6th edition University Press. Systat Software Inc. SYSTAT: getting started, Iowa (Krakow, Poland: Systat Software Inc.).
- Soares, R.M., Magalhães, V.F., Azevedo, S.M.F.O. (2004). Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 70: 1–10.
- Solter, P. F., Beasley, V. R. (2013). Phycotoxins. In Haschek and Rousseaux's *Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* (pp. 1155-1186).
- SVIRČEV, Z., KRSTIČ, S., Miladinov-Mikov, M., BALTIČ, V., VIDOVIČ, M. (2009). Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27(1), 36-55.
- Svrcek, C., Smith, D. W. (2004). Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 3(3), 155-185.
- Sun, D. wen. (2012). *Handbook of Food Safety Engineering* (Pág. 1 – 855). Wiley Blackwell Online Library.
- Takenaka, S., Watanabe, M.F. (1997). Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 34:4, 749-757.
- Thostrup L, Christoffersen K. (1999). Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*. *Archiv für Hydrobiologie*, 145: 447–467.
- Tian, D., Zheng, W., Wei, X., Sun, X., Liu, L., Chen, X., ... & Wang, X. (2013). Dissolved microcystins in surface and ground waters in regions with high cancer incidence in the Huai River Basin of China. *Chemosphere*, 91(7), 1064-1071.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Ed. Médica Panamericana.

- Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M. F., Suzuki, M., Harada, K. I. (1994). Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. *Environmental Science & Technology*, 28(1), 173-177.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H. D., ... & Yu, S. Z. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17(6), 1317-1321.
- Utkilen, H., Gjørlme, 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.
- Valiei, A.I., 1995. Producers and processes involved in primary production. In: *Marine Ecological Processes*, second ed. Springer-Verlag, New York, pp. 3–35.
- Van der Westhuizen, A. J., Eloff, J. N. (1985). Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*, 163(1), 55-59.
- Van der Westhuizen, A. J., Eloff, J. N., Kruger, G. H. J. (1986). Effect of temperature and light (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Archiv für Hydrobiologie*, 108(2), 145-154.
- Van Hannen, E.J., Mooij, W., van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Laanbroek, H.J. (1999). Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2478–2484.
- Várkonyi, Z., Masamoto, K., Debreczeny, M., Zsiros, O., Ughy, B., Gombos, Z., I., Domonkos, T., Farkas, H. Wada y Szalontai, B. (2002). Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: an FTIR spectroscopic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2410-2415.
- Vela, L., Sevilla, E., Martín, B., Pellicer, S., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L. (2007). Las microcistinas. *Rev. Real Academia de Ciencias* 62, 135–146.
- Venrick, E. L. (1995). Muestreo y submuestreo del fitoplancton marino y dulceacuícola. *Manual de métodos ficológicos*, Universidad de Concepción, Chile, 199-218.
- Vermaas, W.F.J. (2001). Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* / & 2001 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net

- Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K. (2002). Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial ecology*, 43(4), 443-454.
- Vidal, L., Fabre, A., Gabito, L., Kruk, C., Gravier, A., Britos, A., Pérez, M.C., Aubriot, L., Bonilla, S. (2009). PARTE III – IDENTIFICACIÓN. CAP. 10 – FICHAS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES. En Bonilla (ed.). *Cianobacterias planctónicas del Uruguay*.
- Vidal, L., Pérez, M. del C. (2009). Capítulo 9, Parte III-Identificación. Claves taxonómicas. En Bonilla (2009). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay*, UNESCO. 41-44.
- VIERLING, E., ALBERTE, R. S. (1980). Functional organization and plasticity of the photosynthetic unit of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiologia Plantarum*, 50(2), 93-98.
- Villafañe, V. E., Reid, F. M. H. (1995). Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Concepción, 169-185.
- Visser P., Ibelings, B., Mur, L., Walsby A. (2005). The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. En: *Harmful Cyanobacteria*, Huisman, J., Matthijs C. & Visser, P. Eds. Dordrecht, Springer, 109-142.
- Visser, P. M., Verspagen, J. M., Sandrini, G., Stal, L. J., Matthijs, H. C., Davis, T. W., Paerl, H.W. y Huisman, J. (2016). How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 145-159.
- Walsby, A. E., Hayes P. K. (1989) Gas vesicle proteins. Review article. *Biochemistry Journal*. 264 (313-322).
- Walsh, K., Jones, G. J., Dunstan, R. H. (1997). Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa*. *Phytochemistry*, 44(5), 817-824.
- Walters, R. (2005). Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 56: 435-447.
- Wang, J., Wu, P., Chen, J., Yan, H. (2010)^b. Biodegradation of microcystin-RR by a new isolated *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Biotechnology and Bioengineering Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18 (1): 108-112.
- Wang, Z., Li, D., Li, G., Liu, Y. (2010)^c. Mechanism of photosynthetic response in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 to low inorganic phosphorus. *Harmful Algae*, 9(6), 613-619.
- Wang, W., Zhang, Y., Shen, H., Xie, P., Yu, J. (2015). Changes in the bacterial community and extracellular compounds associated with the disaggregation of *Microcystis* colonies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 62-66.

- Wang, X., Utsumi, M., Gao, Y., Li, Q., Tian, X., Shimizu, K., Sugiura, N. (2016). Influences of metal ions on microcystin-LR degradation capacity and dynamics in microbial distribution of biofilm collected from water treatment plant nearby Kasumigaura Lake. *Chemosphere*, 147, 230-238.
- Watanabe, M. F.; Oishi, S. (1985). Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental microbiology*, 49(5), 1342-1344.
- Watanabe, M. F., Harada, K. I., Matsuura, K., Watanabe, M.; Suzuki, M. (1989). Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). *Journal of applied phycology*, 1(2), 161-165.
- Watanabe M F, Tsuji K, Watanabe Y, Harada K I, Suzuki M. (1992). Release of a heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. *Nat. Toxins* 1: 48–53.
- Watkinson, A. J., o'Neil, J. M., & Dennison, W. C. (2005). Ecophysiology of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae) in Moreton Bay, Australia. *Harmful Algae*, 4(4), 697-715.
- Welch, W. A. (1963). Potassium permanganate in water treatment. *Journal (American Water Works Association)*, 55(6), 735-741.
- Wicks, R. J., Thiel, P. G. (1990). Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. *Environmental Science & Technology*, 24(9), 1413-1418.
- Wu, Y., Li, L., Gan, N., Zheng, L., Ma, H., Shan, K., ... Song, L. (2014). Seasonal dynamics of water bloom-forming *Microcystis* morphospecies and the associated extracellular microcystin concentrations in large, shallow, eutrophic Dianchi Lake. *Journal of Environmental Sciences*, 26(9), 1921-1929.
- Wu, X., Wang, C., Tian, C., Xiao, B., Song, L. (2015). Evaluation of the potential of anoxic biodegradation of intracellular and dissolved microcystins in lake sediments. *Journal of hazardous materials*, 286, 395-401.
- Xing, P., Kong, F.X., Cao, H.S., Zhang, M., Tan, X. (2007). Variations of bacterioplankton community composition during *Microcystis spp.* bloom in a shallow eutrophic lake. *Journal of Freshwater Ecology*, 22: 61–67.
- Yan, H., Pan, G., Zou, H., Li, X., Chen, H. (2004). Effective removal of microcystins using carbon nanotubes embedded with bacteria. *Chinese Science Bulletin*, 49(16), 1694-1698.
- Yan, H., Wang, H., Wang, J., Yin, C., Ma, S., Liu, X. y Yin, X. (2012^a). Cloning and expression of the first gene for biodegrading MC-LR by *Sphingopyxis sp.* USTB- 05. *Journal of Environmental Sciences*, 24 (10): 1816-1822.

- Yan, H., Wang, J., Chen, J., Wei, W., Wang, H. y Wang, H. (2012^b). Characterization of the first step involved in enzymatic pathway for microcystin-RR biodegraded by *Sphingopyxis sp.* USTB-05. *Chemosphere*, 87: 12-18.
- Yang Z., Geng L., Wang W., Zhang J. (2012). Combined effects of temperature, light intensity, and nitrogen concentration on the growth and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* in batch culture. *Biochemical Systematics and Ecology* 41:130–135.
- Yang, F., Zhou, Y., Yin, L., Zhu, G., Liang, G., Pu, Y. (2014). Microcystin-degrading activity of an indigenous bacterial strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* MC-LTH2 isolated from Lake Taihu. *PloS one*, 9(1), e86216.
- Young, F. M., Thomson, C., Metcalf, J. S., Lucocq, J. M., Codd, G. A. (2005) Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *Journal of Structural Biology* 151:208-214.
- Zehnder, A., Gorham, P. R. (1960). Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Canadian Journal of Microbiology*, 6(6), 645-660.
- Zevenboom, W., Mur, L. R. (1984). Growth and photosynthetic response of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in relation to photoperiodicity and irradiance. *Archives of microbiology*, 139(2), 232-239.
- Zilliges, I., Kehr, J.C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness under oxidative stress conditions. *PLoS One* 6 (3) doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017615> e17615.
- Zhang, M., Pan, G., Yan, H. (2010). Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis sp.* USTB-05. *Journal Environmental Sciences*, 22 (2): 168-175.
- Zhang, M. L., Yan, H., Pan, G. (2011). Microbial degradation of microcystin-LR by *Ralstonia solanacearum*. *Environmental technology*, 32(15), 1779-1787.
- Zhou, L., Yu, H., Chen, K. (2002). Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed Environ Sci*, 15(2), 166-171.
- Zhu, X., Shen, Y., Chen, X., Hu, Y. O., Xiang, H., Tao, J., Ling, Y. (2016). Biodegradation mechanism of microcystin-LR by a novel isolate of *Rhizobium sp.* TH and the evolutionary origin of the *mlrA* gene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 115, 17-25.
- Zohary, T., Robarts, R. D. (1992). Bacterial numbers, bacterial production, and heterotrophic nanoplankton abundance in a warm core eddy in the Eastern Mediterranean. *Marine ecology progress series*, 133-137.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. Applied and environmental microbiology, 56(6), 1875-1881.

Zwietering, M. H., De Koos, J. T., Hasenack, B. E., De Witt, J. C., Van't Riet, K. (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. Applied and Environmental Microbiology, 57(4), 1094-1101.

Anexos

Tabla 1A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en los recuentos celulares a 26°C.

26°C		30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		
		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150
30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10		0,9842	1,000	0,8790	0,9999	0,9940	0,9986	1,000	0,9858
	NP100	1,418		0,9848	0,2836	0,8478	0,6374	1,0000	0,9911	0,5573
	NP150	0,08940	1,409		0,8764	0,9999	0,9937	0,9987	1,000	0,9852
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	2,031	3,449	2,040		0,9902	0,9997	0,4591	0,8409	1,000
	NP100	0,7134	2,131	0,7223	1,318		1,000	0,9520	0,9996	0,9999
	NP150	1,225	2,642	1,234	0,8064	0,5112		0,8181	0,9887	1,000
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	0,9920	0,4259	0,9830	3,023	1,705	2,217		0,9995	0,7514
	NP100	0,1208	1,297	0,1118	2,152	0,8341	1,345	0,8712		0,9761
	NP150	1,395	2,812	1,404	0,6364	0,6812	0,1700	2,387	1,515	

Tabla 2A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en la concentración de Clo-a a 26°C.

26°C		30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		
		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150
30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10		0,9432	1,000	0,9808	1,000	1,000	0,8133	0,9906	0,6803
	NP100	1,758		0,9050	0,3723	0,9899	0,9265	0,1320	0,4397	0,07796
	NP150	0,1774	1,935		0,9916	1,000	1,000	0,8727	0,9965	0,7575
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	1,463	3,221	1,286		0,9141	0,9868	0,9998	1,000	0,9974
	NP100	0,4345	1,323	0,6119	1,898		1,000	0,6273	0,9459	0,4770
	NP150	0,08515	1,843	0,09227	1,378	0,5196		0,8433	0,9940	0,7182
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	2,230	3,987	2,052	0,7664	2,664	2,144		0,9992	1,000
	NP100	1,308	3,066	1,131	0,1552	1,742	1,223	0,9216		0,9934
	NP150	2,549	4,307	2,372	1,086	2,984	2,464	0,3197	1,241	

Tabla 3A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en la concentración de MCs a 26°C.

26°C		30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		
		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150
30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10		0.2222	0.1321	0.07378	0.0691	0.00717	0.01127	0.00794	0.00558
	NP100	3.676		1	0.9998	0.9997	0.8696	0.9295	0.885	0.8273
	NP150	4.051	0.3746		1	1	0.9543	0.9814	0.9619	0.9311
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	4.428	0.7518	0.3772		1	0.9903	0.9975	0.9926	0.9822
	NP100	4.469	0.7923	0.4177	0.0405		0.9921	0.9981	0.9941	0.9851
	NP150	5.729	2.053	1.678	1.301	1.261		1	1	1
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	5.493	1.817	1.442	1.065	1.024	0.2363		1	1
	NP100	5.676	2	1.626	1.248	1.208	0.05297	0.1833		1
	NP150	5.86	2.183	1.809	1.432	1.391	0.1303	0.3666	0.1833	

Tabla 4A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en los recuentos celulares a 30°C.

30°C	30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
------	---	---	---

		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150
30 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10		0,005679	0,00439	0,004859	0,001606	0,003685	0,3893	0,04493	0,08851
	NP100	5,616		1	1,000	1,000	1,000	0,7304	0,9985	0,9862
	NP150	5,733	0,1170		1,000	1,000	1,000	0,6784	0,9966	0,9771
50 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	5,687	0,07095	0,04609		1,000	1,000	0,6992	0,9975	0,9811
	NP100	6,186	0,5706	0,45360	0,4997		1,000	0,4659	0,9694	0,8989
	NP150	5,812	0,1962	0,07919	0,1253	0,3744		0,6419	0,9946	0,9688
70 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	3,179	2,436	2 553	2,507	3,007	2,633		0,9837	0,9980
	NP100	4,606	1,009	1,126	1,080	1,580	1,206	1,427		1,000
	NP150	4,226	1,389	1,506	1,460	1,960	1,585	1,047	0,3797	

Tabla 5A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en la concentración de Clo-a a 30°C.

30°C		30 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			50 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			70 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150
30 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10		0,9646	0,9958	1,000	1,000	0,9992	0,6877	0,8842	0,7567
	NP100	1,617		1,000	0,9589	0,9302	0,6837	0,1028	0,2249	0,1325
	NP150	1,161	0,4562		0,9946	0,9874	0,8623	0,2056	0,3936	0,2552
50 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	0,4196	1,659	1,203		1,000	0,9994	0,7065	0,8957	0,7738
	NP100	0,2067	1,824	1,367	0,1648		0,9999	0,7761	0,9340	0,8355
	NP150	0,9247	2,542	2,085	0,8827	0,7179		0,9657	0,9973	0,9818
70 μmol fotón $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	2,533	4,150	3,693	2,491	2,326	1,608		1,000	1,000
	NP100	2,012	3,629	3,173	1,970	1,805	1,087	0,5208		1,000
	NP150	2,373	3,990	3,534	2,331	2,167	1,449	0,1593	0,3615	

Tabla 6A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en la concentración de MCs a 30°C.

30°C		30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		
		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150
30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	0.01257	0.00098		0.00242	0.00214	0.00056	0.00089	0.00567	0.00292
	NP100	5.448		0.988	0.9994	0.9991	0.9566	0.9846	1	0.9998
	NP150	6.792	1.344		1	1	1	1	0.9991	1
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	6.313	0.8651	0.4787		1	0.9997	1	1	1
	NP100	6.376	0.9281	0.4157	0.06301		0.9998	1	1	1
	NP150	7.111	1.662	0.3184	0.7971	0.7341		1	0.9928	0.9993
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	6.846	1.397	0.0536	0.5323	0.4693	0.2648		0.9986	0.9999
	NP100	5.869	0.4202	0.9236	0.4449	0.5079	1.242	0.9772		1
	NP150	6.215	0.7667	0.5771	0.09844	0.1614	0.8956	0.6307	0.3464	

Tabla 7A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en los recuentos celulares a 36°C.

36°C		30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		
		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150
30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,6209	0,3663	0,7158
	NP100	0,006318		1,000	1,000	1,000	1,000	0,6239	0,3689	0,7186
	NP150	0,1714	0,1777		1,000	1,000	0,9997	0,5402	0,2991	0,6381
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	0,2660	0,2597	0,4374		1,000	1,000	0,7408	0,4834	0,8226
	NP100	0,3741	0,3677	0,5454	0,1080		1,000	0,7850	0,5338	0,8592
	NP150	0,6257	0,6194	0,7971	0,3597	0,2516		0,8726	0,6520	0,9261
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	NP10	2,678	2,671	2,849	2,412	2,304	2,052		1,000	1,000
	NP100	3,237	3,230	3,408	2,971	2,863	2,611	0,5590		0,9998
	NP150	2,470	2,463	2,641	2,204	2,096	1,844	0,2081	0,7671	

Tabla 8A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en la concentración de Clo-a a 36°C.

36°C		30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$			70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		
		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150

30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	1,000	0,8973	0,9483	0,4861	0,4861	0,1805	0,1637	0,1326	
	NP100	0,5805	0,9864	0,9961	0,7504	0,7504	0,3771	0,3495	0,2960	
	NP150	1,961	1,381	1,000	0,9984	0,9984	0,9270	0,9117	0,8740	
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	1,724	1,144	0,2374		0,9931	0,9931	0,8652	0,8434	0,7928
	NP100	2,968	2,388	1,007	1,244		1,000	0,9996	0,9993	0,9981
	NP150	2,968	2,388	1,007	1,244	1,000		0,9996	0,9993	0,9981
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	3,798	3,217	1,836	2,074	0,8294	0,8294		1,000	1,000
	NP100	3,865	3,285	1,904	2,141	0,8971	0,8971	0,06771		1,000
	NP150	4,006	3,425	2,044	2,282	1,038	1,038	0,2083	0,1406	

Tabla 9A. Valores de p resultantes de la comparación de a pares de Tukey en la concentración de MCs a 36°C.

36°C		30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
		NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150	NP10	NP100	NP150
30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10		0.677	0.7719	0.9873	0.9815	0.8699	0.7738	0.8618	0.5982
	NP100	2.557		1	0.1646	0.9964	1	1	1	1
	NP150	2.331	0.2258		0.2226	0.9993	1	1	1	1
50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	1.354	3.911	3.685		0.5706	0.3134	0.224	0.304	0.1284
	NP100	1.438	1.119	0.8929	2.792		1	0.9993	0.9999	0.9905
	NP150	2.05	0.5065	0.2806	3.405	0.6122		1	1	0.9999
70 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	NP10	2.326	0.2308	0.004959	3.68	0.8879	0.2757		1	1
	NP100	2.077	0.48	0.2542	3.431	0.6387	0.02643	0.2492		0.9999
	NP150	2.732	0.175	0.4008	4.086	1.294	0.6815	0.4058	0.655	