

Tesina de Grado en Bioquímica

Efectos de la salinidad y la intensidad de luz en el desempeño de una cianobacteria tóxica

Sofía Fernández

Orientadora: Dra. Sylvia Bonilla

Laboratorio de ejecución: Sección Limnología, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Fecha de entrega: 10/02/2025

Tribunal: Dra. Pilar Irisarri (Facultad de Agronomía), Dra. Luciana Fleitas (Facultad de Ciencias) y Dra. Sylvia Bonilla.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutora, la Dra. Sylvia Bonilla, por su inagotable motivación y apoyo a lo largo de esta etapa de mi carrera. Desde el primer momento, me impresionó su constante disposición para orientarme, guiarme y compartir sus valiosos conocimientos. Gracias por brindarme innumerables oportunidades para crecer tanto académicamente como personalmente. También quiero agradecer a todos los integrantes de la sección de Limnología, cuyo continuo apoyo y disposición para ayudar han sido fundamentales. A Natalia por ayudarme con el análisis de mis experimentos.

A mis padres, mi hermana, mi novio y toda mi familia, por ser el pilar más importante, les agradezco profundamente por estar siempre a mi lado, apoyándome en cada paso de este camino. Su cariño y paciencia han sido esenciales para alcanzar esta meta.

A mis amigas y amigos, gracias por acompañarme en este trayecto, por escucharme, aconsejarme y estar ahí en los momentos de dudas y alegrías.

Finalmente, a mis mascotas, Michi y Rocco, por ser la mejor compañía durante mis largas tardes de estudio. Su amor incondicional fue la motivación necesaria para mi carrera.

A todas y todos, gracias por estar presentes en este capítulo tan importante de mi vida.

Tesis parcialmente financiada, Proyecto IM-UDELAR programa Maggiolo #42

Resumen

La salinidad y la intensidad lumínica son factores altamente variables en los ecosistemas acuáticos costeros y pueden influir en el desempeño de las cianobacterias formadoras de floraciones. Estas condiciones también afectan el contenido de pigmentos, como la clorofila *a* y la ficocianina, teniendo implicancias directas para el monitoreo ambiental, especialmente en ambientes dinámicos como los estuarios. En este estudio, se evaluó el efecto de la salinidad y la intensidad lumínica sobre *Microcystis* cf. *aeruginosa* (cepa MVCC42), una cianobacteria tóxica aislada de una floración en el Río de la Plata. A partir de estudios piloto, se diseñó un experimento factorial con dos niveles de intensidad lumínica (15 y 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y cuatro concentraciones de NaCl (0, 2, 4 y 8 g/L), totalizando 32 unidades experimentales. Además, se diseñó y optimizó un protocolo para la extracción y cuantificación de ficocianina de la cepa MVCC42. Los resultados indicaron que la intensidad lumínica fue el factor más determinante en el desempeño del organismo, con tasas de crecimiento y abundancia celular significativamente mayores en condiciones de alta intensidad lumínica. La salinidad afectó negativamente el crecimiento, probablemente asociado al estrés osmótico en la actividad fotosintética, tamaño de las colonias y disminuyendo en casi un 40% contenido de los pigmentos fotosintéticos, especialmente a concentraciones de NaCl ≥ 4 g/L. Existió una interacción entre ambos factores influyendo negativamente sobre las variables medidas. Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en el contenido de microcistinas intracelulares por célula bajo las condiciones experimentales, lo que sugiere que la cantidad de toxinas estaba vinculada a la abundancia celular. Este estudio aporta evidencia sobre los efectos combinados de factores abióticos, como la luz y la salinidad, en *Microcystis aeruginosa* y su efecto en el contenido de pigmentos utilizados para el monitoreo ambiental.

Abstract

Salinity and light intensity are highly variable factors in coastal aquatic ecosystems and can influence the performance of bloom-forming cyanobacteria. These conditions also affect pigment content, such as chlorophyll *a* and phycocyanin, having direct implications for environmental monitoring, especially in dynamic environments such as estuaries. In this study, the effect of salinity and light intensity on *Microcystis* cf. *aeruginosa* (strain MVCC42), a toxic cyanobacterium isolated from a bloom in the Río de la Plata, was evaluated. Based on pilot studies, a factorial experiment was designed

with two levels of light intensity (15 and 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and four NaCl concentrations (0, 2, 4, and 8 g/L), totalizing 32 experimental units. In addition, a protocol for the extraction and quantification of phycocyanin from strain MVCC42 was designed and optimized. The results indicated that light intensity was the most determining factor in the organism's performance, with significantly higher growth rates and cell abundance under high light intensity conditions. Salinity negatively affected growth, probably associated with osmotic stress in photosynthetic activity, colony size, and a decrease of almost 40% in photosynthetic pigment content, especially at NaCl concentrations ≥ 4 g/L. There was an interaction between both factors, negatively influencing the measured variables. However, no significant changes in intracellular microcystin content per cell were detected under the experimental conditions, suggesting that the amount of toxins was linked to cell abundance. This study provides evidence on the combined effects of abiotic factors, such as light and salinity, on *Microcystis aeruginosa* and its effect on pigment content used for environmental monitoring.

Tabla de contenido

1. Introducción.....	6
1.1. Características generales de las cianobacterias	6
1.2. Fotosíntesis y pigmentos	7
1.3. Factores abióticos: nutrientes y salinidad	9
1.4. Eutrofización y floraciones.....	10
1.5. El género Microcystis.....	11
1.6. Monitoreo ambiental	12
1.7. Floraciones en el Río de la Plata.....	13
2. Hipótesis y objetivos.....	14
2.1. Objetivos específicos.....	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Determinación de las curvas de crecimiento	15
3.2. Análisis y determinación de pigmentos.....	16
3.2.1. Protocolo de extracción y cuantificación de la ficocianina por espectrofotometría	16
3.3. Experimento factorial con luz y salinidad.....	18
3.3.1. Seguimiento del experimento	20
3.3.2. Determinación de la clorofila a y ficocianina por fluorescencia.....	21
3.3.3. Determinación de actividad fotosintética y cianotoxinas	21
3.3.4. Análisis estadísticos de los datos	22
4. Resultados	23
4.1. Crecimiento	23
4.2. Pigmentos.....	26
4.3. Morfología de las colonias	28
4.3.1. Análisis de cianotoxinas	29
4.4. Resultados metodológicos.....	30
4.4.1. Crecimiento de la cepa	30
4.4.2. Protocolo para la cuantificación de ficocianina	31
5. Discusión	33
5.1. Crecimiento, morfología y toxinas	33
5.2. Pigmentos.....	35
5.3. Implicancias ambientales.....	36
5.4. Discusión de los resultados metodológicos	37
5.4.1. Experimento con BG11 diluido y prueba piloto.....	37
5.4.2. Protocolo de ficocianina.....	37
6. Conclusiones	38
7. Bibliografía.....	38
8. Anexo	44

1. Introducción

El fitoplancton se define como el conjunto de microorganismos fotosintéticos que contienen clorofila *a* (clo *a*) y están adaptados para vivir en suspensión, parcial o completamente en la columna de agua (Reynolds, 2006). Son la fracción fotoautótrofa del plancton, actúan como productores primarios en ecosistemas pelágicos marinos y continentales, posicionándolos en los niveles iniciales de las tramas tróficas (Graham et al., 2022; Kalff, 2001). El fitoplancton ha desarrollado adaptaciones evolutivas para explotar de manera eficiente la luz y mantenerse en la zona eufótica, aquella donde la fotosíntesis es mayor que la respiración. Estas adaptaciones incluyen diversas características morfológicas, como el pequeño tamaño y los niveles de organización simple, la presencia de gránulos de aceite en las células, el mucílago, los flagelos y variaciones morfológicas que aumentan el área de rozamiento, las cuales contribuyen a disminuir la densidad celular y, por lo tanto, reducen la velocidad de sedimentación (Kalff, 2001). El fitoplancton está compuesto por una serie de grupos filogenéticamente muy distantes, dentro de los cuales las cianobacterias son uno de los que ha alcanzado mayor diversidad en los ecosistemas límnicos. También podemos encontrar microalgas eucariotas como las clorofitas, crisofitas, diatomeas, criptofitas, euglenófitas y dinoflagelados (Reynolds, 2006).

1.1. Características generales de las cianobacterias

Las cianobacterias son los organismos con fotosíntesis aeróbica más antiguos, encontrándose en la mayoría de los ambientes iluminados, principalmente ecosistemas acuáticos (Schopf, 2012). Antiguamente fueron denominadas algas verde-azules, debido principalmente a que poseen una serie de pigmentos denominados ficobiliproteínas (Whitton & Potts, 2012).

Las cianobacterias exhiben una gran diversidad morfológica (figura 1), pueden encontrarse como células individuales o pares de células por estar en división, colonias o filamentos. La morfología celular puede ser esférica o cilíndrica, y poseen una pared celular típica de bacterias gramnegativas, compuesta por una capa de peptidoglicano. Además, presentan una envoltura externa de lipopolisacáridos, con componentes químicos distintivos que no se encuentran en otras bacterias de este grupo (Graham et al., 2022). Los distintos órdenes filogenéticos reflejan diferencias de origen evolutivo y morfologías, los más frecuentes en las cianobacterias planctónicas son las Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales y Synechococcales (Wehr et al., 2015), sin embargo, en los últimos años se han propuesto nuevos órdenes basados en el análisis filogenómicos y polifásicos (Strunecky et al., 2023).

Algunas especies de cianobacterias filamentosas son capaces de producir células especializadas denominadas heterocitos, las cuales, tienen como principal función la fijación de nitrógeno atmosférico (Whitton & Potts, 2012). Estas mismas también pueden producir células de resistencia a condiciones adversas denominadas acinetes, que le permiten mantenerse en un estado de latencia (espora) y crecer cuando las condiciones son favorables (Graham et al., 2022). Por otro lado, a diferencia de otros microorganismos del fitoplancton, las cianobacterias son las únicas que flotan mediante vacuolas de gas, las cuales les permiten realizar migraciones verticales para optimizar tanto la captura de luz como de nutrientes (Bonilla & Pick, 2017).

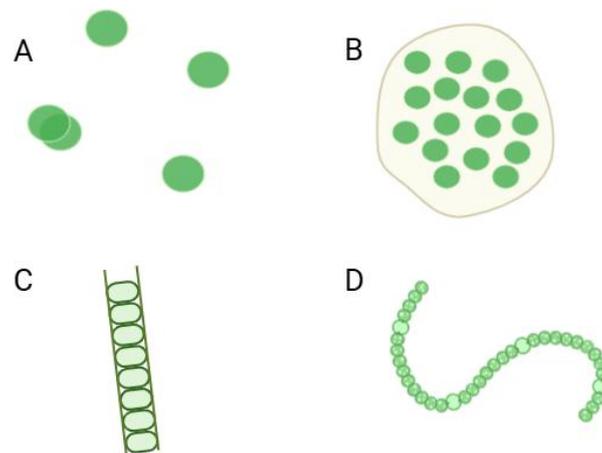


Figura 1: Principales niveles de organización biológica encontrados en las cianobacterias formadoras de floraciones. (a) Forma unicelular, (b) colonias, (c) filamentos sin heterocitos y (d) filamento con heterocitos (Fuente: elaboración propia).

1.2. Fotosíntesis y pigmentos

La luz es un factor crucial que influye directamente en el crecimiento de las cianobacterias, ya que tanto la intensidad, la calidad como la duración de la exposición a la luz afectan su desarrollo y supervivencia (Oliver et al., 2012; Xu et al., 2023). Parte de la energía lumínica fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés) que llega al agua se refleja en la superficie, mientras que otra parte penetra en la columna de agua. La intensidad de luz se atenúa exponencialmente con la profundidad, debido a la absorción por el agua y otras partículas (incluidas algas y cianobacterias) y la dispersión causada por partículas no algales (NAP), microorganismos y materia orgánica disuelta (CDOM), lo que se denomina “propiedades inherentes del agua” y que explican entonces la atenuación de la luz en el agua (Reynolds Colin, 2006; Wetzel, 2001).

Las cianobacterias captan la energía lumínica mediante las ficobiliproteínas (complejos proteicos unidos a cromóforos llamados ficobilinas), donde los principales son la

ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina (Whitton & Potts, 2012). Los centros de reacción que contienen *clo a* en el Fotosistema I (PSI) y el Fotosistema II (PSII) son muy similares entre las microalgas y las cianobacterias. Sin embargo, las principales antenas o complejos recolectores de luz (LHC, Light harvesting complex, en inglés) que capturan la radiación PAR difieren considerablemente (Oliver et al., 2012). En las microalgas el complejo LHC es parte integral de la membrana del tilacoide y está compuesto principalmente por *clo a* y clorofilas accesorias. Por el contrario, para las cianobacterias los LHC son las ficobiliproteínas, que se encuentran insertadas en la membrana tilacoidal en una estructura llamada ficobilisoma (PBS) (figura 2) (Graham et al., 2022; Oliver et al., 2012). Las ficobiliproteínas permiten a las cianobacterias maximizar la eficiencia fotosintética en diversos ambientes donde la luz puede variar, particularmente a intensidades de luz bajas (Oliver et al., 2012; Zhao et al., 2012). La ficocianina, que absorbe energía en la región azul-verde del espectro (Abs máx: 620 nm), es el pigmento más abundante en las cianobacterias de ecosistemas límnicos, proporcionando su característico color azul verdoso. Mientras que todos los PBS contienen aloficocianina y ficocianina, la ficoeritrina, que absorbe en la región verde-amarilla (Abs máx: 560 nm), aparece generalmente en menor proporción, pero su presencia permite a algunas cianobacterias maximizar la eficiencia fotosintética al captar luz en longitudes de onda donde la ficocianina es menos efectiva (Oliver et al., 2012). Si bien es menos frecuente, existen algunas cianobacterias planctónicas ricas en ficoeritrina, donde se destacan *Planktothrix rubescens* que forma floraciones en el metalimnion y picocianobacterias de ambientes extremos (Bonilla & Pick, 2017). Además, las ficobilinas, al igual que la *clo a*, tienen la capacidad de fluorescer. La energía de excitación del fotón puede disiparse de tres maneras: perderse como calor, utilizarse en la fotosíntesis o emitirse como fluorescencia. Esta última propiedad es la base del monitoreo ambiental mediante el uso de pigmentos (Cremella, 2017).

Las cianobacterias tienen una ventaja sobre las microalgas eucariotas gracias a su capacidad de adaptarse a intensidades de luz que van desde muy bajas hasta extremadamente altas, lo que les permite prosperar en condiciones donde la luz subacuática es limitada o fluctúa significativamente (Aubriot et al., 2009). Procesos como la fotoaclimatación y la fotoadaptación son cruciales para su supervivencia en entornos donde la intensidad y la distribución espectral puede cambiar rápidamente. Si bien los términos parecen similares, la fotoadaptación le permite a la célula inducir cambios temporales y reversibles en el aparato fotosintético, para reducir la luz captada y mejorar la liberación de energía en forma de calor previniendo el daño a altas irradiancias (Oliver et al., 2012). En contraparte, la fotoaclimatación otorga cambios globales en el sistema fotosintético debido a la exposición prologada a una

nueva condición lumínica, y este implica degradación y nueva síntesis de diferentes componentes del fotosistema (Oliver et al., 2012).

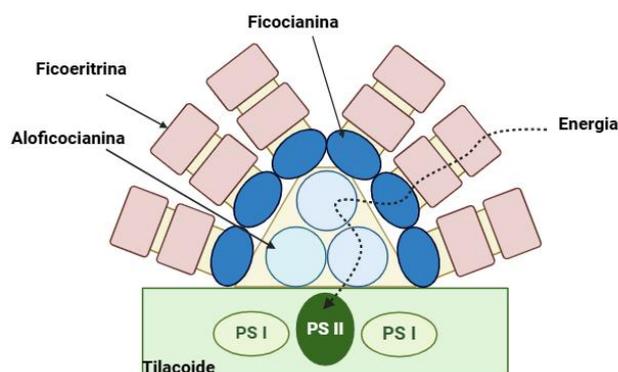


Figura 2: Representación esquemática del ficobilisoma, basada en (Graham et al., 2022). Donde PSI (fotosistema 1) y PSII (fotosistema 2). La proporción de moléculas de ficoeritrina y ficocianina varían según las especies, cepas y condiciones lumínicas. La flecha punteada indica el recorrido de la energía para realizar fotosíntesis (Fuente: elaboración propia).

1.3. Factores abióticos: nutrientes y salinidad

Existen varios factores que pueden influir en el crecimiento de las cianobacterias, por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, incorporados en sus formas disueltas (principalmente amonio y fosfato, también nitrato) (Scheffer, 1998). Estos son componentes esenciales para el crecimiento del fitoplancton, y algunas cianobacterias poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a través de la enzima nitrogenasa, que se activa en casos en que el nitrógeno inorgánico soluble sea limitante. La fijación de nitrógeno convierte el gas nitrógeno (N_2) en amoníaco (NH_3) o ion amonio (NH_4^+), este último esencial para el metabolismo celular (Graham et al., 2022; Reynolds, 2006). En cianobacterias, este proceso ocurre principalmente en los heterocitos (aunque hay otros mecanismos), células especializadas rodeadas de una capa de mucílago que limitan la entrada de oxígeno, ya que la nitrogenasa es altamente sensible a este gas (Oliver et al., 2012). Además, factores ambientales como los niveles de amonio o nitrato regulan la activación de la fijación de nitrógeno en estas células (Graham et al., 2022). Por otro lado, el fósforo es un nutriente fundamental que contribuye a aumentar la productividad primaria en los cuerpos de agua. En condiciones naturales, es el elemento que se encuentra en concentraciones limitantes, aunque también puede serlo el nitrógeno, particularmente en zonas costeras (Mazzeo et al., 2010). Cuando se produce un enriquecimiento de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, en los cuerpos de agua, pueden desencadenarse diversas consecuencias en el ecosistema, incluido un proceso conocido como eutrofización (Scheffer, 1998). Este fenómeno suele provocar un crecimiento

desmedido de la biomasa del fitoplancton debido al exceso de nutrientes que favorecen su desarrollo (Reynolds, 2006).

Las especies límnicas que forman floraciones suelen encontrarse también en las zonas costeras, tolerando salinidades bajas o intermedias (Bonilla et al., 2009). Varios estudios han demostrado los efectos negativos de la salinidad en las cianobacterias límnicas, especialmente en el género *Microcystis*. Se ha observado una disminución en la tasa de crecimiento, una reducción en el contenido de clo *a* (Georges Des Aulnois et al., 2020; Zhang et al., 2013), así como cambios en la morfología de las colonias, alterando su tamaño y estructura (Bormans et al., 2023). Además, se reporta un aumento en la producción de ciertos metabolitos como respuesta al estrés salino, lo que podría actuar como un mecanismo de protección (Zhang et al., 2013). La salinidad puede inducir cambios en la expresión de genes relacionados con la osmorregulación, como la producción de solutos compatibles que equilibran la presión osmótica, facilitando la supervivencia en condiciones salinas extremas, permitiéndoles competir con otros microorganismos (Reignier et al., 2024). Por otro lado, si bien la salinidad ha demostrado ser un factor determinante, experimentos en cianobacterias que combinan salinidad e intensidad de luz evidencian que la luz es un factor más relevante para modular su crecimiento y contenido de ficocianina (Hotos, 2021).

1.4. Eutrofización y floraciones

En muchas partes del mundo, la eutrofización comenzó a acelerarse como consecuencia a la urbanización e industrialización hacia la mitad del siglo XX (Ibelings et al., 2021). Desde entonces se fueron produciendo floraciones masivas de cianobacterias en cuerpos de agua epicontinentales, e incluso en estuarios como el mar Báltico (Huisman et al., 2018). Las floraciones (blooms) disminuyen la diversidad biológica en los diferentes niveles tróficos y generando grandes consecuencias, ya que algunas especies de cianobacterias son capaces de producir toxinas nocivas, las cuales representan un riesgo para la salud humana (Ibelings et al., 2021; Izaguirre et al., 1982). Las cianotoxinas (metabolitos secundarios) pueden actuar sobre diferentes órganos blanco, teniendo distintos mecanismos de acción y generar efectos hepatotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos y dermatotóxicos, hasta la inhibición general de la síntesis proteica (Ibelings et al., 2021). En algunas ocasiones, las floraciones superficiales de cianobacterias forman espumas, cuando las células se acumulan y son arrastradas por el viento hacia áreas específicas del cuerpo de agua (Bonilla & DeLeón, 2009). Estos eventos afectan significativamente la calidad del agua, generando olores y apariencia desagradables, además de concentraciones elevadas de cianotoxinas. El riesgo aumenta si las espumas no se disuelven rápidamente por

acción del viento o las olas, ya que esto puede provocar lisis celular masiva, liberando grandes cantidades de cianotoxinas al ambiente acuático (Ibelings et al., 2021). Además de la producción de toxinas, también se generan compuestos volátiles aromáticos que dan mal sabor, olor y aspecto visual al agua (Izaguirre et al., 1982). Por este motivo, el monitoreo ambiental resulta esencial para anticipar y gestionar los riesgos asociados a las floraciones (Ibelings et al., 2021).

1.5. El género *Microcystis*

Uno de los géneros de cianobacterias planctónicas más comunes reportadas en floraciones tóxicas es *Microcystis*. Pertenece al orden Chroococcales y a la familia Microcystaceae. Este género se caracteriza por sus células esféricas que forman colonias irregulares, poseen un mucilago fino e incoloro de polisacáridos (glicoaminoglicanos), generalmente homogéneo, delimitado o difuso y fluido (figura 3A y 3B) (Komárek & Anagnostidis, 2008). Las colonias pueden variar su tamaño, siendo microscópicas o macroscópicas (> 1 mm en diámetro), dependiendo en la etapa del ciclo vegetativo que se encuentren y las condiciones hidrológicas del cuerpo de agua (Whitton, 2012). Si bien la especie más citada es *Microcystis aeruginosa*, en muchos casos se la define como el complejo *Microcystis aeruginosa* o *Microcystis cf. aeruginosa* (*M cf. Aeruginosa*), debido a su similitud morfológica con especies cercanas (Piccini et al., 2024). *Microcystis* posee vesículas de gas, estructuras huecas y cilíndricas que están formadas por agregados de proteínas permeables al aire, y que le permite regular su posición en la columna de agua (Graham et al., 2022). Las cianotoxinas, metabolitos volátiles y las sustancias que alteran el sabor del agua producidos por *Microcystis* afectan negativamente al ecosistema y pueden generar importantes pérdidas económicas (Chorus & Testai, 2021). *Microcystis* es conocido por producir hepatotoxinas, como las microcistinas, que impactan negativamente las comunidades de macroinvertebrados, pero también en fauna silvestre terrestre, animales domésticos o ganado y afectar la salud humana (Brena et al., 2023; Šejnohová & Maršálek, 2012). Dado que *Microcystis* es uno de los géneros más comunes en el mundo y puede formar floraciones extremadamente densas, es fundamental implementar un monitoreo ambiental.

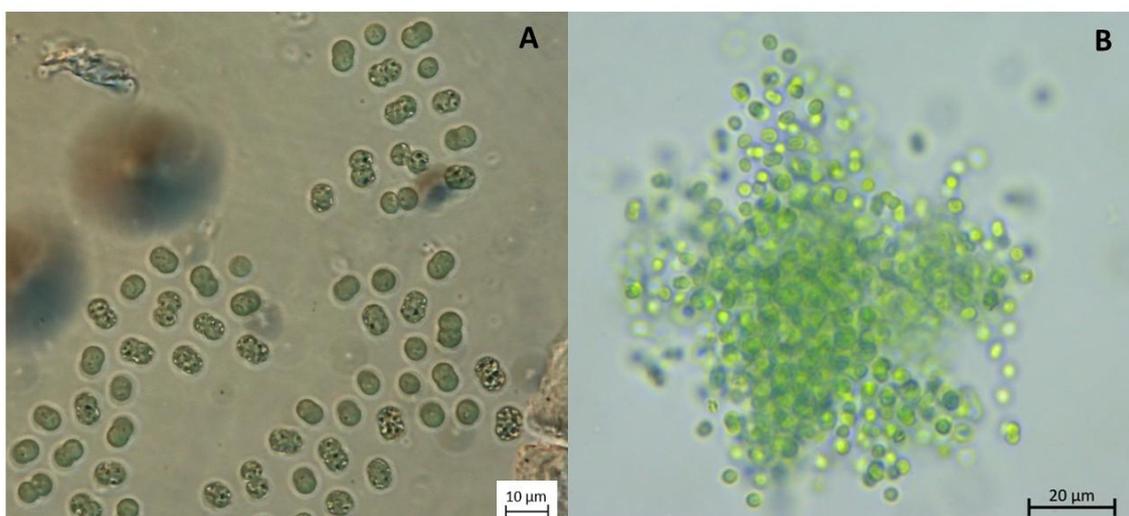


Figura 3: **A** - Colonia de *Microcystis* cf. *aeruginosa* donde se observan células con vacuolas de gas (“puntos negros” y aspecto rugoso) microfotografía a 1000 aumentos (con contraste de fase Nomarski). **B** – Micrografía campo claro de colonia de *Microcystis* cf. *aeruginosa* a un aumento de 400. Fotos: S. Fernández.

1.6. Monitoreo ambiental

Los pigmentos son herramientas quimiotaxonómicas útiles para el monitoreo ambiental, usadas para el análisis de fitoplancton desde 1970 (Jeffrey, 2005). La presencia y concentración de estos pigmentos fotosintéticos, como la clo *a* y la ficocianina, se utilizan en estudios de monitoreo ambiental para detectar y cuantificar la biomasa de las cianobacterias (proxy de biomasa). Existen tres grandes aproximaciones para cuantificar estos pigmentos con relevancia para el monitoreo ambiental. La primera, es la que se basa en identificación de las señales de reflectancia de los cuerpos de agua para reconstruir la concentración de clo *a* superficial, a través del análisis de imágenes satelitales (Maciel et al., 2023). La segunda se basa en la propiedad de fluorescencia de los pigmentos, que se miden usando fluorómetros *in situ*, dispositivos que permiten medir la fluorescencia emitida por los pigmentos *in vivo*. La tercera aproximación ha sido utilizada por décadas en estudios de limnología y oceanografía y consiste en extraer los pigmentos y determinar su concentración mediante mediciones de absorbancia (Cremella, 2017; Lawton et al., 2021).

La clo *a* ha sido uno de los pigmentos utilizados para el monitoreo ambiental, siendo el pigmento principal del fitoplancton (Haakonsson et al., 2024). Esta no es un indicador directo de la presencia de cianobacterias, ya que también se encuentra en otras especies de fitoplancton, como las microalgas, lo que puede dificultar su uso para la detección de las cianobacterias. En los últimos años han surgido estudios que proponen el uso de la ficocianina como un indicador más preciso para el monitoreo de

las cianobacterias (Ogashawara, 2020; Rong-hua et al., 2009). Sin embargo, estos pigmentos pueden variar según las condiciones ambientales a las que están expuestas (Kelly et al., 2023; Yang et al., 2023). Además, experimentos en diferentes especies de cianobacterias muestran diferencias en contenido por célula de estos pigmentos (V. Acuña com. pers.).

Como se mencionó anteriormente, la salinidad es un factor que afecta el desarrollo de las cianobacterias, incluyendo a *M. aeruginosa* (Tonk et al., 2007), para la cual se ha demostrado que el estrés salino puede afectar la producción de ficocianina (Rezayian et al. (2019). Por lo tanto, las variaciones en el contenido celular de estos pigmentos podrían influir en la precisión de las mediciones ambientales, fundamentalmente, tanto en el uso de fluorómetros de medición *in situ*, como en métodos basados en la detección satelital que usen señales de estos pigmentos. Nuestro estudio busca aportar información biológica sobre los cambios pigmentarios asociados a los factores de luz y salinidad, que puede redundar en la mejora de la calidad de los monitoreos y enfrentar estos desafíos con mayor eficacia.

1.7. Floraciones en el Río de la Plata

El Río de la Plata tiene la quinta cuenca más grande del mundo ($3.16 \times 10^6 \text{ km}^2$) y drena el segundo caudal más grande de América del Sur (García-Alonso et al., 2019). Este estuario tiene una gran relevancia ambiental y económica, proporcionando cantidad de servicios ecosistémicos, como la pesca, el turismo, el transporte y el suministro de agua potable. Sin embargo, actualmente sufre un proceso de eutrofización que condiciona el uso de estos servicios (García-Alonso et al., 2019). Es un sistema dinámico, con grandes cambios de salinidad influenciados por el aporte de agua dulce proveniente de las descargas de dos grandes ríos, Río Uruguay y Río Paraná (Pedocchi et al., 2022).

Las floraciones en el Río de la Plata aparecen reportadas en forma dispar desde la década del 90` (De Leon & Yunes, 2000; Ferrari & Vidal, 2006; Kruk et al., 2019) pero más recientemente se destacan densas floraciones de gran magnitud como la ocurrida en 2019, encontrándose el complejo *M. aeruginosa* desde hace décadas en este estuario (Aubriot et al., 2020). El origen de dichas floraciones está asociada al arrastre del agua desde los embalses eutróficos del Río Negro y del Río Uruguay hacia aguas abajo hasta alcanzar las costas del Río de la Plata (Aubriot et al., 2020; Zabaleta et al., 2023). Investigaciones recientes revelan, además, que el complejo tóxico *M. aeruginosa* ha experimentado una diversificación ecológica a lo largo de la costa del Río de la Plata, adaptándose a diferentes niveles de temperatura, turbidez y salinidad,

con el resultado de diversas poblaciones que pueden presentar diferente toxicidad (Martínez de la Escalera et al., 2017).

La salinidad es una de las variables clave que determina los grupos dominantes del fitoplancton en este estuario (Ferrari & Vidal, 2006; Pedocchi et al., 2022). Por ejemplo, a salinidades menores a 0,5 UPS (Unidades Prácticas de Salinidad) y una temperatura mínima de 19 °C, dominan las cianobacterias en la comunidad de fitoplancton en zonas costeras de San José (Bonilla et al., 2024; Haakonsson et al., 2020). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios que exploren cómo la variación de la luz y la salinidad afectan el contenido celular de la ficocianina, cloa *a* y toxinas en *M. aeruginosa*. Como hemos mencionado, comprender esta relación podría tener implicancias directas en el monitoreo ambiental basado en la detección de pigmentos.

2. Hipótesis y objetivos

La evaluación del efecto de la luz en conjunto con la salinidad sobre diversas variables de respuesta de *M cf. aeruginosa*, como el contenido de ficocianina y la adecuación general del organismo en cuanto a la actividad fotosintética, el crecimiento, las variaciones de tamaño y el contenido de toxinas (microcistinas), es de interés, ya que es una cianobacteria frecuentemente presente formando floraciones en el Río de la Plata. De acuerdo a los antecedentes mencionados nos llevan a proponer estas hipótesis:

- La intensidad de luz es más importante que la salinidad para modular el crecimiento y contenido de ficocianina en *M cf. aeruginosa*.
- La cuota celular de toxinas cambia según condición de salinidad.

Como **objetivo general** se propone evaluar los factores ambientales, intensidad de luz y salinidad como forzantes del desempeño y concentración de ficocianina en una cepa de *M cf. aeruginosa*.

2.1. Objetivos específicos

- 1) Determinar el efecto del aumento de la salinidad en el contenido de ficocianina, morfología y variables que indican el desempeño.
- 2) Analizar los efectos de la intensidad lumínica en el contenido de ficocianina, morfología y variables que indican el desempeño.
- 3) Determinar la interacción entre los factores, luz y salinidad, y cómo influyen en las variables de respuesta de la cepa.

- 4) Evaluar la influencia de la salinidad y la luz en la cuota celular de microcistinas totales.

3. Materiales y métodos

Se utilizó la cepa de *M cf. aeruginosa* (MVCC42), la cual fue aislada del estuario del Río de la Plata, específicamente de la localidad de Punta del Tigre y depositada en el cepario de la Sección Limnología del Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales (IECA), Facultad de Ciencias. El rango de salinidad encontradas generalmente en Punta del Tigre es entre 0 – 25 UPS.

3.1. Determinación de las curvas de crecimiento

Los cultivos de cianobacterias se mantienen en medio mineral BG11, el más ampliamente utilizado para este grupo de organismos (Andersen, 2005) y también usado para el cepario de la Sección Limnología. Debido a que el medio BG11 tiene una salinidad basal de 1 UPS, se buscó utilizar un medio diluido como control, de forma de reducir la salinidad inicial del medio de cultivo. Para eso, se realizó un experimento por triplicado para determinar si había diferencias en la tasa de crecimiento de la cepa MVCC42 usando el medio de cultivo BG11 diluido al 50% (BG11 ½) frente a la condición de referencia BG11 sin diluir (Andersen, 2005), usando como antecedentes datos del laboratorio. Las condiciones experimentales incluyeron temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperiodo de 12:12 luz:oscuridad, e intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se llevó a cabo también un experimento piloto para determinar la tolerancia de la cepa a la salinidad. Para esto, se prepararon medios de cultivo BG11 con diferentes concentraciones de NaCl (0, 5 y 8 g/L) estos valores fueron elegidos por estudios anteriores en *M cf. aeruginosa* (Bormans et al., 2023; Georges Des Aulnois et al., 2020; Zhang et al., 2013). Como medio base, se utilizó el BG11 ½ que sirvió tanto como condición control (0 g/L de NaCl) como base para la preparación de los medios con las concentraciones de sal experimentales. Se midió la salinidad de los medios tras la adición de NaCl y se evidenció que los valores obtenidos correspondían a las concentraciones esperadas. Por lo tanto, en adelante, la concentración de NaCl se consideró equivalente a la salinidad del medio.

Las condiciones experimentales incluyeron temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperiodo de 12:12 luz:oscuridad, e intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para determinar la tasa de crecimiento de la cepa, se midió diariamente la irradiancia PAR, que atravesaba las cajas de cultivo utilizando un compartimiento oscuro estanco

equipado con una fuente de luz led blanca (Bonilla et al., 2023.) Las cajas de cultivo se midieron a la misma hora durante la duración de los experimentos (11 días). La PAR se midió con un radiómetro LI-COR 250A, equipado con un Sensor Cuántico Microesférico USg-SQS/L (Walz GmbH, Alemania). Las medidas de absorbancia fueron luego calculadas utilizando el cálculo de la transmitancia como el valor medido por la densidad óptica del radiómetro sobre el valor medido para el blanco. Finalmente, se calculó la absorbancia (utilizado como indicador indirecto de biomasa) para cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia} = -\log T$$

Donde:

- T es el valor de la transmitancia previamente calculada

Esto permitió calcular la tasa de crecimiento específica (μ) (Bonilla et al., 2023), utilizando la fórmula:

$$\mu(d^{-1}) = \frac{\ln([X]_i) - \ln([X]_{i-1})}{t_i - t_{i-1}}$$

Donde:

- t es el tiempo en días
- i el día
- X absorbancia

3.2. Análisis y determinación de pigmentos

3.2.1. Protocolo de extracción y cuantificación de la ficocianina por espectrofotometría

La ficocianina es un pigmento hidrosoluble, que puede liberarse en el ambiente luego de la lisis celular (figura 4A) por lo tanto, su extracción debe ser realizada en un medio acuoso, como lo es el buffer fosfato. El protocolo de extracción de ficocianina se desarrolló y optimizó a través de la concentración de la muestra (filtración o centrifugación), junto con la evaluación de distintos métodos de extracción, como congelación-descongelación y sonicación (figura 5). Para estas pruebas se utilizó el cultivo de *M. cf. aeruginosa* en medio BG11 ½. Los métodos consistieron en el uso de un buffer fosfato salino a una concentración de 0.01 M de fosfato y 0.15 M de NaCl, con pH= 7,45 (Yéprémian et al., 2017). Para la centrifugación, se evaluaron varios

tiempos de centrifugado, obteniendo el más adecuado. Consistió en una velocidad de 40,000 RPM durante 8 minutos, seguido de un reposo de la muestra en hielo durante 5 minutos y una segunda centrifugación de 8 minutos, para controlar la temperatura de los tubos, formándose así un pellet que contenía las células. Posteriormente, se realizaron cinco ciclos de congelado y descongelado de la muestra en oscuridad para lograr la lisis celular y la liberación del pigmento. Finalmente, se agregó el buffer salino (en volúmenes que variaron de 2 a 5 ml, dependiendo de la concentración del tratamiento), luego la muestra se pasó por un vórtex para homogeneizar el extracto y se realizó la última centrifugación a 40,000 RPM durante 5 minutos. Finalmente se filtraron todas las muestras utilizando filtros GF/C para la clarificación y se obtuvo el extracto (figura 4B). Por otro lado, también se probaron métodos de filtración y sonicado para la concentración de las células, como se describía en (Yéprémian et al., 2017), usando la misma cantidad de buffer, cultivo y réplicas, aunque estos no resultaron tan eficientes como la centrifugación.

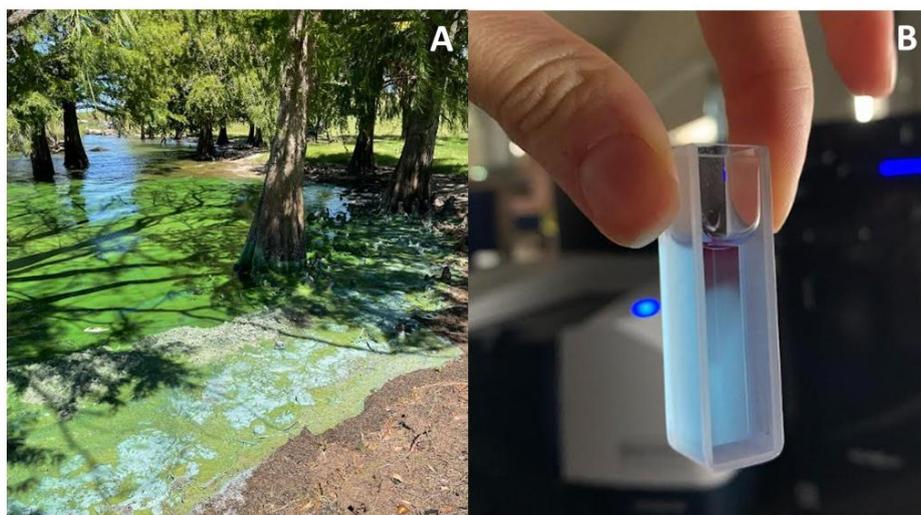


Figura 4: (A) Floración de cianobacterias en el embalse del Palmar en 2024. La lisis celular provocó la liberación de ficocianina al medio, evidenciada por la coloración azul verdosa del agua. (B) Extracto de ficocianina en solución acuosa de buffer fosfato salino (pH 7,45), obtenido mediante centrifugación y ciclos de congelación-descongelación. (Fotos - Sofía Fernandez).

Las muestras obtenidas se midieron espectrofotométricamente, realizando un barrido de absorción de 400 a 800 nm (tomando datos cada 1 nm) y se determinó la concentración de ficocianina (Yéprémian et al., 2017) usando absorbancia a 619 nm (máximo promedio de todos los tratamientos, previamente los valores fueron corregidos con la absorbancia 750 nm), con la siguiente ecuación:

$$Ficocianina (mgL^{-1}) = \frac{(Abs\ 619 - Abs\ 650) \times Ve}{7.38 \times Vs \times I}$$

Donde:

- V_e = volumen del extracto del buffer (mL)
- V_s = volumen de la muestra (L)
- l = paso óptico de la cubeta (cm)
- $7.38 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ = Coeficiente de extinción molar

Protocolo para extracción de ficocianina

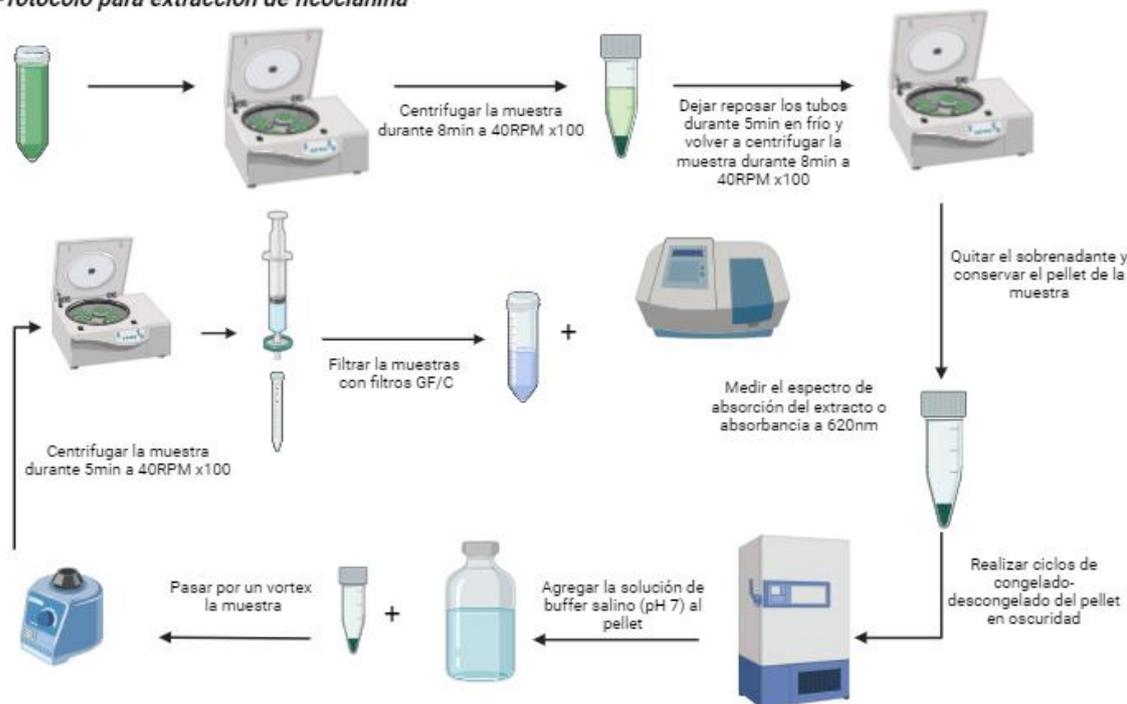


Figura 5: Esquema del protocolo diseñado para la extracción de ficocianina en la cepa de estudio. (Fuente: Elaboración propia)

3.3. Experimento factorial con luz y salinidad

El experimento factorial incluyó cuatro diferentes niveles de salinidad (0, 2, 4 y 8 g/L de NaCl) y dos niveles de intensidad lumínica PAR (alta: $43\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y baja: $13\text{-}15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), manteniendo un fotoperiodo de 12:12 horas luz:oscuridad, y una temperatura constante de 25°C (figura 6). Los medios de cultivo (BG11 50%) fueron realizados utilizando NaCl, agregada en la concentración necesaria antes de esterilizar los medios en el autoclave.

Para asegurar que la cepa se encontraba en fase exponencial de crecimiento al inicio del experimento, se realizaron repiques sucesivos y una curva de crecimiento previa en medio BG11 $\frac{1}{2}$. Como resultado de este proceso, se obtuvo un cultivo inicial en un matraz de 1 litro con 400 mL de cultivo en fase exponencial. A partir de este, se inocularon 90 mL en cada medio de cultivo con su respectiva salinidad, garantizando una concentración inicial homogénea en todos los frascos del tratamiento (figura 6A).

Para lograr las dos condiciones de intensidad de luz se utilizaron mallas negras de mosquitero, para hacer fundas donde se colocaron las cajas correspondientes al tratamiento de luz baja. Se utilizaron cajas de cultivos de 200 mL con 100 mL de cultivo, colocadas acostadas para minimizar el sombreado y las mismas se fueron rotando de posición durante el experimento para evitar el efecto borde. Todas las muestras fueron aclimatadas inicialmente a una intensidad lumínica de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 72 horas. Posteriormente, las muestras asignadas al tratamiento de baja intensidad lumínica fueron cubiertas con dos mallas negras, con el fin de reducir la cantidad de luz que recibían. Por otro lado, las muestras correspondientes al tratamiento de alta intensidad lumínica permanecieron expuestas directamente a la luz, sin la adición de ninguna malla (figura 6B). Se realizó un seguimiento de las 32 unidades experimentales, cuatro réplicas por tratamiento, midiendo el crecimiento durante 11 días como se describió anteriormente. Al final del experimento se tomaron muestras para analizar las variables de respuesta: abundancia celular, concentración de *clo a*, ficocianina, toxinas y morfología de las colonias.

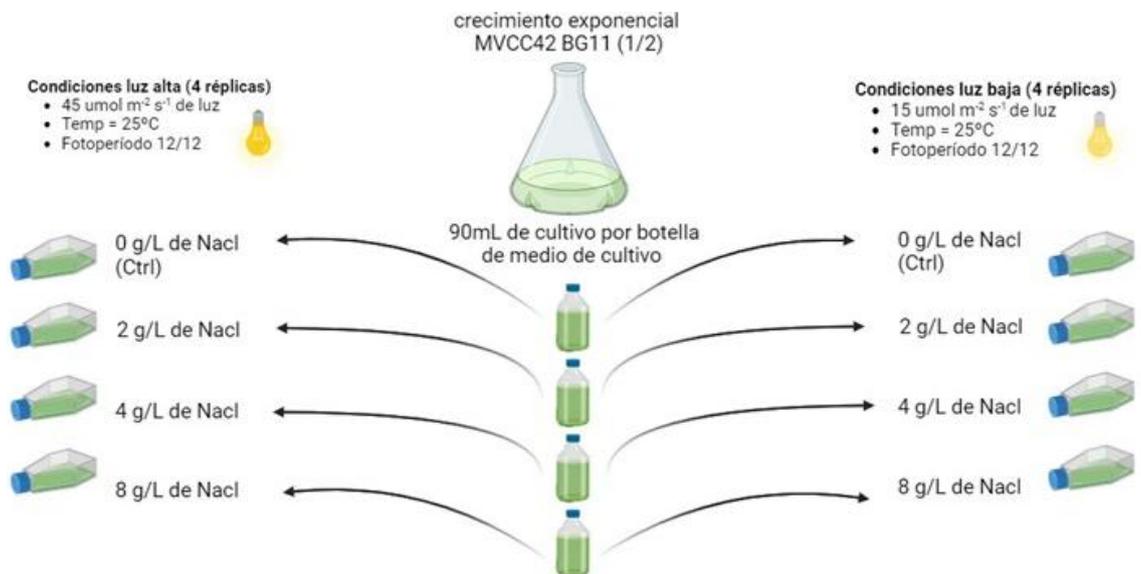


Figura 6: (A) Diseño experimental para evaluar el efecto de cuatro niveles de salinidad (0, 2, 4 y 8 g/L de NaCl) y dos intensidades lumínicas (alta: 45 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$ y baja: 15 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$) en *M. cf. aeruginosa*. (B) Cajas de cultivo durante el experimento factorial, con mallas negras se encuentran los tratamientos de luz baja.

3.3.1. Seguimiento del experimento

Para evaluar la integridad celular y la morfología de las colonias de la cepa en los diferentes tratamientos y se analizaron las muestras en un microscopio óptico con campo claro. Se tomaron muestras integradas por tratamiento que contenida 2 ml de las cuatro replicas. Las muestras se analizaron frescas o fijadas con glutaraldehído al 1%. Se procedió a medir el largo y ancho de las colonias para posteriormente calcular el área de cada una (μm^2). En el caso de los conteos celulares, las muestras se fijaron con Lugol y luego se sonicaron utilizando una amplitud de 20 (kHz) y un pulso continuo de hasta 2 minutos (2 ciclos de 1 minuto con descanso de 30 segundos) para poder disgregar las colonias, facilitando así el conteo celular. Cuando la biomasa era muy

elevada, se realizaron las diluciones apropiadas. El conteo celular se llevó a cabo utilizando una cámara de Sedgwick-Rafter de 1 mL, en microscopio invertido Nikon, contando un mínimo de 5 campos con un aumento de 40X o 60X usando contraste de fase y asegurando al menos el conteo de 400 células en total por cámara.

Se evaluó la variación en el tamaño celular, midiendo 20 células en cada muestra. El volumen celular fue de $4 \pm 0,3 \mu\text{m}^3$, no registrándose diferencias entre tratamientos. Por lo tanto, se utilizó el indicador de abundancia celular para evaluar luego los cambios pigmentarios y de contenido de toxinas.

3.3.2. Determinación de la clorofila a y ficocianina por fluorescencia

La cuantificación de la clorofila *a* en cada una de las muestras, a tiempo final, se realizó utilizando el PhycoLabAnalyser (PhycoLA, bbe Moldaenke), que se basa en la fluorescencia *in vivo* de los pigmentos. Este equipo excita los pigmentos, como la clorofila *a* y la ficocianina, mediante LEDs de distintos colores, permitiendo la asignación a las diferentes clases de algas, sin la necesidad de preparar las muestras mediante filtración o uso de disolventes. Basado en curvas de calibración, el equipo devuelve los resultados en $\mu\text{g/L}$ de clorofila *a*. Para evitar errores asociados a la alta biomasa (mayores a $200 \mu\text{g/L}$), en las muestras más concentradas se realizaron diluciones adecuadas antes de proceder con la medición.

Al final del experimento, la ficocianina *in vivo* se midió utilizando un fluorómetro de mano AQUAFLUOR (Turner). Para garantizar lecturas precisas, las muestras con alta concentración de cianobacterias fueron diluidas adecuadamente mediante las diluciones pertinentes. Se utilizó un estándar sólido para calibrar el equipo, asegurando que las mediciones se encontraran dentro del rango de calibración del dispositivo. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF).

3.3.3. Determinación de actividad fotosintética y microcistinas

Para el análisis de la actividad fotosintética se utilizó el equipo PhycoLabAnalyser, el cual se basa en la fluorescencia variable de las células y estima el estrés de la actividad fotosintética. Para ello se mide entonces la fluorescencia basal (F_0) y la fluorescencia “máxima” re-emitida por las células luego de recibir un flash lumínico (pulso) (F_m). La fluorescencia dependerá de los centros de reacción disponibles, lo que se reduce al aumentar el estrés. Con estos dos parámetros se calcula la relación F_v/F_m que disminuye al aumentar el estrés fotosintético, método utilizado ampliamente en plantas. Este dispositivo da un valor denominado “parámetro de Genty” (Genty et al., 1989) que expresa la relación F_v/F_m en un porcentaje (%), siendo máximo

cercano al 75% y disminuyendo de acuerdo al grado de estrés; y se calcula según la siguiente ecuación:

$$Genty = 100 \times \frac{Fv(Fm - F0)}{Fm} [\%]$$

Donde:

- F0: Fluorescencia “basal” sin luz de background
- Fm: Fluorescencia en respuesta a pulso de luz (flash)

Las muestras más concentradas fueron previamente diluidas.

Las microcistinas totales se analizaron mediante la técnica de ELISA de competencia indirecto (por ser moléculas pequeñas) utilizando anticuerpos policlonales (Pírez et al., 2013). En este caso la absorbancia de la muestra analizada va a ser inversamente proporcional a la concentración del analito problema (microcistinas). Se utilizó una solución estándar de MC-LR, variante más frecuente y tóxica, para realizar la curva de calibración y los resultados se expresaron en ($\mu\text{g/L}$). Posteriormente se calculó la cuota de toxina por célula (femptogramos/cel).

3.3.4. Análisis estadísticos de los datos

Se estandarizaron las variables de respuesta, concentración de la clo *a* y ficocianina, fluorescencia relativa de la ficocianina, concentración de microcistinas totales por célula, para evaluar los cambios de dichas variables en cada tratamiento. Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (factores: salinidad y luz) con cada variable de respuesta. Los datos fueron transformados en caso de no cumplir con los supuestos de homocedasticidad y normalidad. Si la transformación no lograba cumplir con los supuestos, se realizaron pruebas no paramétricas, como el test de Kruskal-Wallis, o un ANOVA con permutaciones cuando se deseaba evaluar ambos factores simultáneamente.

Se ajustó un modelo lineal para correlacionar la concentración de ficocianina (expresada en $\mu\text{g/L}$) con las mediciones de fluorescencia de ficocianina (URF). La relación entre ambas variables fue evaluada utilizando el coeficiente de determinación (R^2) para determinar la precisión del modelo.

Todos los gráficos y análisis estadísticos se realizaron con el programa R (RStudio versión 4.4.1), usando los paquetes, ggplot, car, dplyr, ggsignif, entre otros.

4. Resultados

4.1. Crecimiento

Se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la cepa MVCC42 en respuesta a los factores analizados (figura 7). Durante los primeros tres días existió una fase de latencia para ambas condiciones de luz alta (LA) y luz baja (LB), pero luego, las mayores diferencias de crecimiento se encontraron con respecto a este factor. Esto se observó, por ejemplo, en el control para LA, donde hay una mayor pendiente y por ende un mayor crecimiento con respecto al control en LB. A su vez esto se relaciona con la abundancia final (figura 8), observándose una tendencia consistente con los resultados anteriores, donde el control de LA fue la condición con mayor abundancia celular. No se encontró ningún efecto en el primer nivel de sal (2 g/L de NaCl), sin embargo, el crecimiento se vio fuertemente afectado en los niveles 4 y 8 g/L, donde se registró una disminución en la absorbancia (indicador indirecto de biomasa) con respecto al control en ambas condiciones de luz. La tasa de crecimiento refleja y apoya los resultados anteriores (tabla 1 y 2), donde se evidencian las mismas tendencias entre tratamientos.

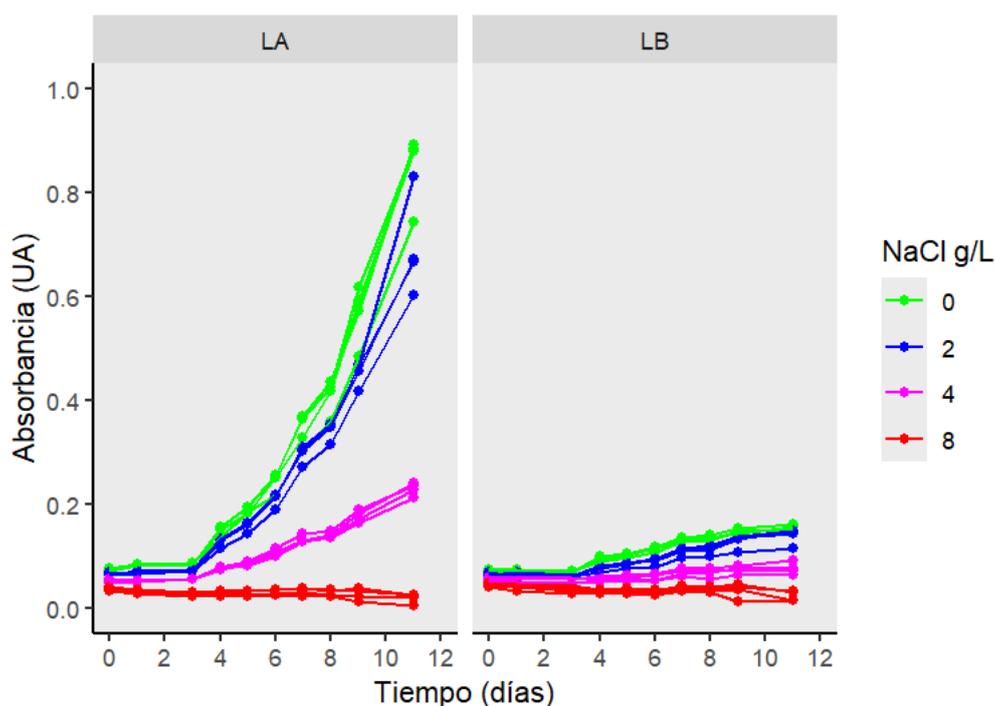


Figura 7: Crecimiento de *M. cf. aeruginosa*, se muestra la absorbancia (UA) en función del tiempo (días) para el experimento factorial, luz alta (LA, panel izquierdo) y luz baja (LB, panel derecho) y cuatro niveles de salinidad (líneas de colores), con cuatro réplicas por condición experimental.

Tabla 1: Tasa de crecimiento máxima de *M. cf. aeruginosa*, valores promedio y su desviación estándar entre paréntesis, según los niveles de salinidad (0, 2, 4 y 8 g/L de NaCl) e intensidades de luz (LA: alta y LB: baja).

NaCl (g/L)	Luz alta (LA) μ /d	Luz baja (LB) μ /d
0	0.594 (0.028)	0.299 (0.059)
2	0.573 (0.066)	0.190 (0.064)
4	0.324 (0.047)	0.166 (0.039)
8	0.104 (0.047)	0.192 (0.054)

Tabla 2: Resultados del análisis ANOVA con permutaciones de dos vías para los datos de tasas máximas considerando los factores luz, salinidad y su interacción; (***) $p \leq 0.001$. *Nota: GL: Grados de libertad, R Sum sq: Variabilidad explicada por cada factor/interacción, R Mean sq: Suma de cuadrados dividida por los grados de libertad*

Variable	GL	R Sum sq	R Mean sq	P valor
Luz	1	0.279	0.279	2.2×10^{-16} ***
Salinidad	3	0.433	0.144	2.2×10^{-16} ***
Luz:Salinidad	3	0.254	0.085	2.2×10^{-16} ***

En el tiempo final del experimento se encontraron efectos altamente significativos de la luz (ANOVA, $p = 2 \times 10^{-16}$), salinidad (ANOVA, $p = 2 \times 10^{-16}$) y la interacción de ambos factores (ANOVA, $p \leq 0.0001$) en la abundancia celular (figura 8, tabla 3). Observamos que en LA, la abundancia celular disminuyó significativamente con respecto al control frente al incremento de la salinidad en todos los niveles. Comparando los controles, la abundancia celular fue 22 veces menor en LB con respecto a LA. En LB, solo se encontraron diferencias significativas entre el control y las concentraciones de 4 y 8 g/L de NaCl (figura 8).

Se midió la actividad fotosintética relativa, la cual, en general estuvo entre (50 – 66 %), excepto en el tratamiento de mayor salinidad (8 g/L), donde se encontraron valores por debajo del 30% (figura 9). La luz no tuvo un efecto significativo, sin embargo, la salinidad sí provocó estrés en la actividad fotosintética (Kruskal-Wallis, LA $p = 0.005$ y LB $p = 0.005$).

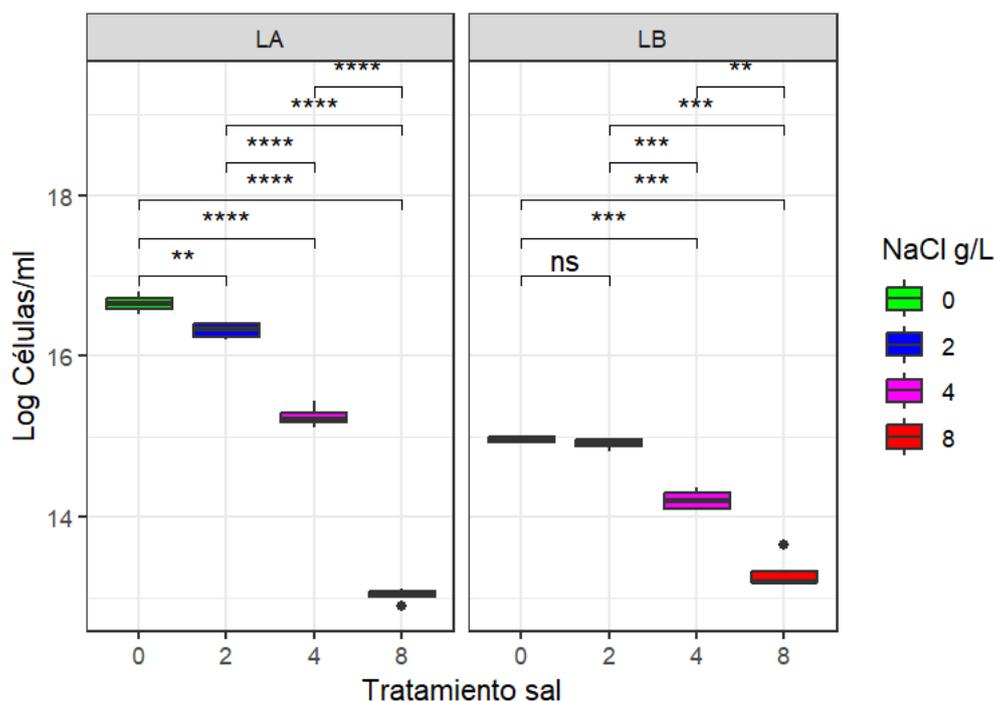


Figura 8: Boxplot de la abundancia celular con datos transformados (log células/ml) de *M. cf. aeruginosa* bajo dos condiciones lumínicas (luz alta: LA y luz baja: LB) y cuatro niveles de NaCl (0, 2, 4, y 8 g/L, indicados con diferente color). Se indican el nivel de significancia estadística entre cada tratamiento: ns = no significativo, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$ y (****) $p \leq 0.0001$.

Tabla 3: Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos transformados del conteo celular (log células/ml), considerando los factores luz, salinidad y su interacción; (***) $p \leq 0.001$.

Nota: **GL:** Grados de libertad, **R Sum sq:** Variabilidad explicada por cada factor/interacción, **R Mean sq:** Suma de cuadrados dividida por los grados de libertad

Variable	GL	Sum sq	Mean sq	F- statistic	P valor
Luz	1	7.44	7.43	445.31	2×10^{-16} ***
Salinidad	3	34.92	11.64	696.97	2×10^{-16} ***
Luz:Salinidad	3	4.56	1.52	91.06	2.98×10^{-13} ***

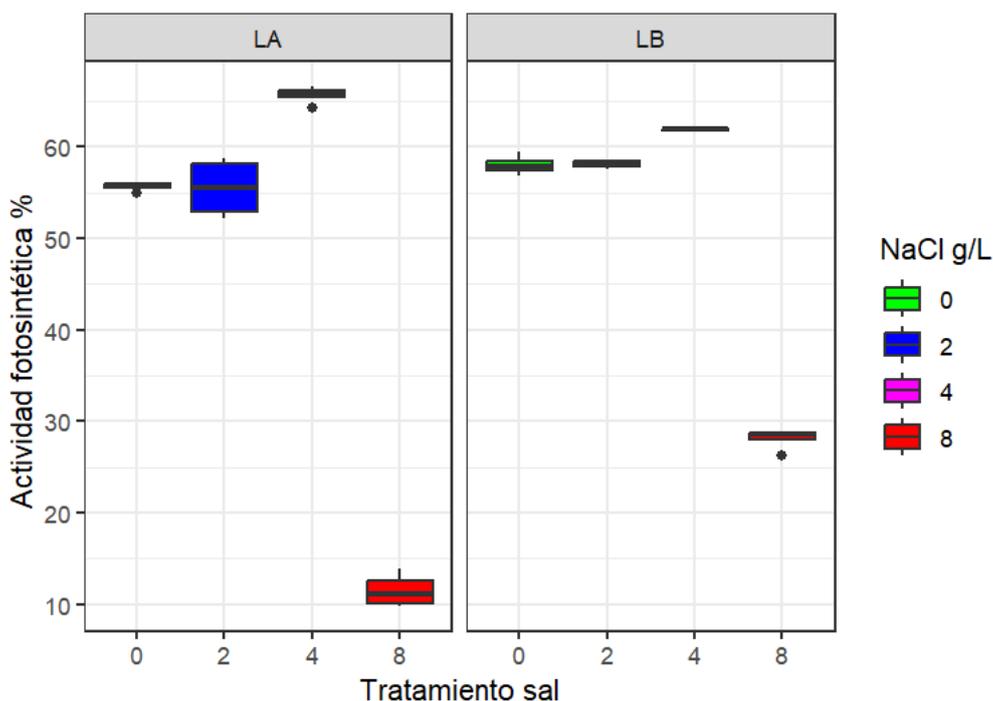


Figura 9: Boxplot del porcentaje de la actividad fotosintética de *M. cf. aeruginosa* en el tiempo final del experimento factorial, bajo dos condiciones lumínicas (luz alta (LA) y luz baja (LB)) y cuatro niveles de NaCl (0, 2, 4, y 8 g/L, indicados con diferentes colores).

4.2. Pigmentos

Se evaluó el cambio en el contenido celular y las concentraciones de los pigmentos de interés en tiempo final. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de clo *a* por célula (cloa/cel) para el factor luz, mientras que el efecto de la salinidad resultó altamente significativo (tabla 4). Para LA, se observó una disminución en el contenido de clo *a* conforme aumenta la concentración de NaCl, con diferencias significativas respecto al control en todos los niveles de salinidad, aumentando de 2 g/L NaCl ($p \leq 0.05$) a los tratamientos de 4 y 8 g/L ($p \leq 0.01$). En LB, solo el tratamiento con 8 g/L NaCl presentó una disminución significativa en la cloa/cel con respecto al control ($p \leq 0.01$) (figura 10). Además, se observó que el efecto de la salinidad en el cloa/cel varía según la condición lumínica, evidenciado por la interacción significativa entre la luz y la salinidad (Tabla 4).

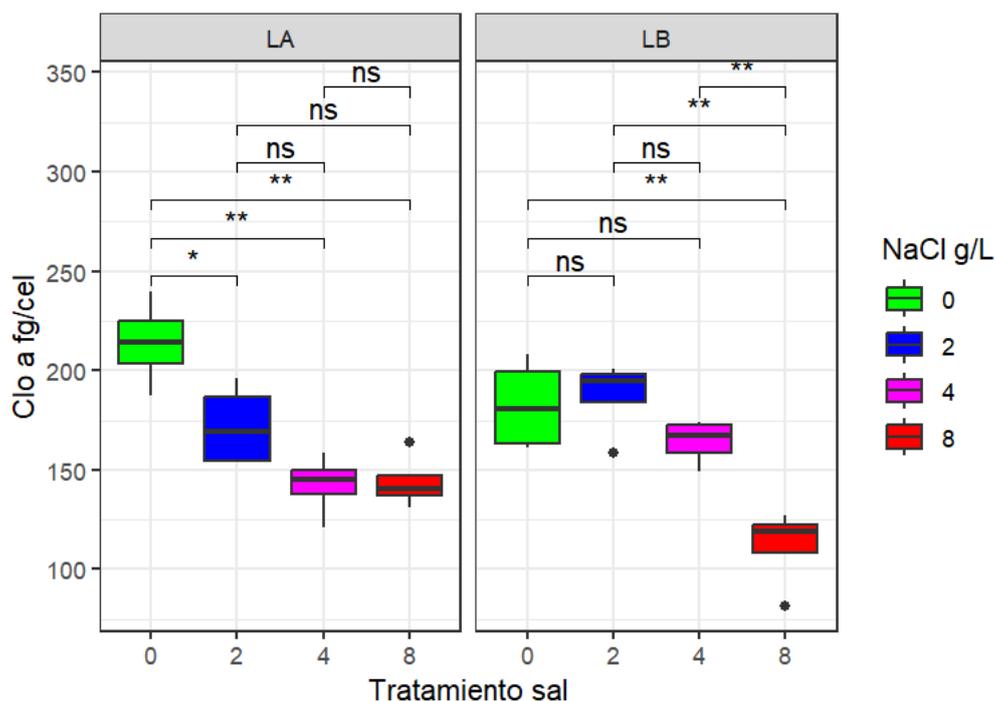


Figura 10: Boxplot para la concentración de clorofila *a* (fg/célula) en *M. cf. aeruginosa* bajo dos condiciones lumínicas (luz alta (LA) y luz baja (LB)) y cuatro niveles de NaCl (0, 2, 4, y 8 g/L, indicados con diferentes colores). Se indican el nivel de significancia estadística entre cada tratamiento: ns = no significativo, (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$.

Tabla 4: Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de clorofila *a* (fg/célula) considerando los factores luz, salinidad y su interacción; ns = no significativo, (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$. Nota: **GL:** Grados de libertad, **R Sum sq:** Variabilidad explicada por cada factor/interacción, **R Mean sq:** Suma de cuadrados dividida por los grados de libertad

Factor	GL	Sum sq	Mean sq	F- statistic	P valor
Luz	1	12	12	0.04	0.841 ns
Salinidad	2	10761	5380	17.90	5.25×10^{-5} ***
Luz:Salinidad	2	3446	1723	5.73	0.012 *

No se encontró un efecto significativo del factor luz sobre la fluorescencia de ficocianina por célula, sin embargo, tanto la salinidad como su interacción con la luz, influyeron de forma altamente significativa en el contenido celular de dicho pigmento (Tabla 5). En la condición luz alta (LA) todos los tratamientos con distintos niveles de concentración de NaCl mostraron diferencias significativas respecto al control (0 g/L). Estas diferencias fueron más marcadas para los tratamientos con mayor concentración de NaCl (4 g/L y 8 g/L) (figura 11). En el caso de la luz baja (LB) se encontraron diferencias significativas solamente en los tratamientos de 4 g/L y 8 g/L, mientras que el tratamiento con 2 g/L mostró una disminución en la fluorescencia de ficocianina, aunque sin alcanzar significancia estadística en comparación con el control (figura 11). Por último en la figura 1S del punto 8 de este trabajo (8. Anexo) en ambos pigmentos

para los tratamientos de LA, (ficocianina y clo *a*) se observa casi una disminución del 40 % en su contenido con respecto al control.

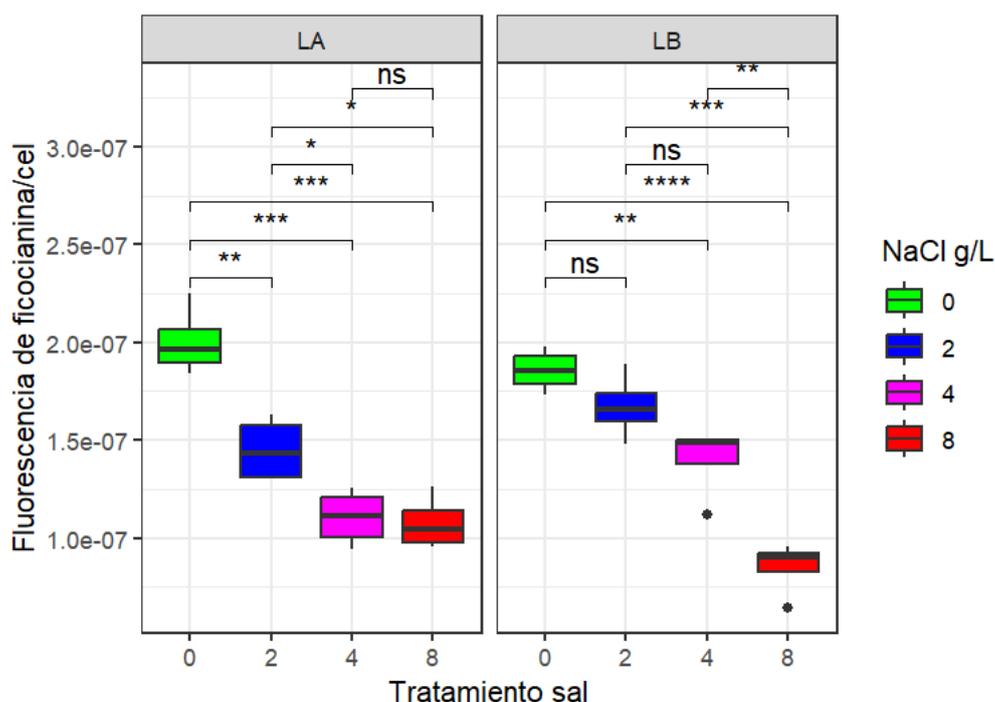


Figura 11: Boxplot para la fluorescencia de ficocianina por célula en *M. cf. aeruginosa* bajo dos condiciones lumínicas (luz alta: LA y luz baja: LB) y cuatro niveles de NaCl (0, 2, 4, y 8 g/L, indicados con diferentes colores). Se nivel de significancia estadística entre cada tratamiento: ns = no significativo, (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$, (****) $p \leq 0.0001$.

Tabla 5: Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de fluorescencia de ficocianina por célula considerando los factores luz, salinidad y su interacción; ns = no significativo, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$. Nota: **GL:** Grados de libertad, **R Sum sq:** Variabilidad explicada por cada factor/interacción, **R Mean sq:** Suma de cuadrados dividida por los grados de libertad.

Factor	GL	Sum sq	Mean sq	F- statistic	P valor
Luz	1	5.6×10^{-16}	5.6×10^{-16}	2.22	0.154 ns
Salinidad	2	1.4×10^{-14}	7.1×10^{-15}	28.49	2.65×10^{-6} ***
Luz:Salinidad	2	3.1×10^{-15}	1.5×10^{-15}	6.22	0.009 **

4.3. Morfología de las colonias

El tamaño de las colonias de *M. cf. aeruginosa* (μm^2), varió significativamente en los diferentes tratamientos (figura 12). Tanto para la luz como la salinidad se encontraron efectos significativos (ANOVA $p \leq 0.001$), sin interacción entre ambos factores (ANOVA, $p = 0.535$). Las colonias con mayor área fueron registradas en LA, en todos los niveles de salinidad. Las medianas para los controles de LA y LB fueron de 375 y 218 μm^2 respectivamente. Además, en los tratamientos de 8 g/L tanto en LA como en LB, se registraron células dispersas sin formación de colonias.

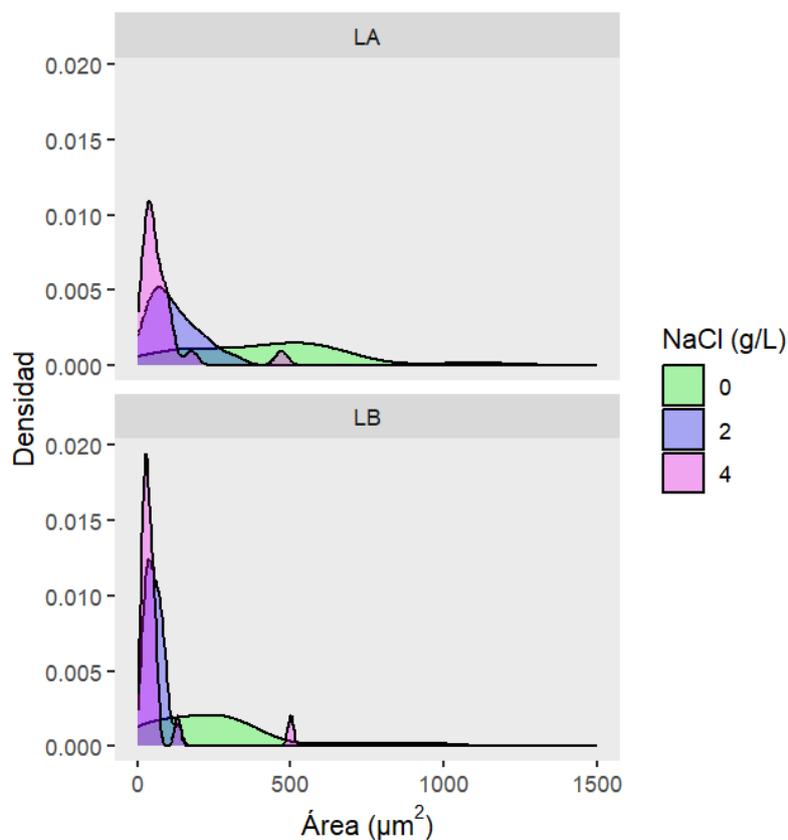


Figura 12: Gráfico de densidad de distribución para el área de las colonias en *M. cf. aeruginosa* en los dos niveles de luz (luz alta, LA, panel superior y luz baja, LB, panel inferior) y tres niveles de NaCl (0, 2, 4 g/L, indicados con diferentes colores). No se encontraron colonias en los tratamientos de 8 g/L.

4.3.1. Análisis de cianotoxinas

No se observaron cambios en el contenido de microcistinas totales por célula (Tabla 6) en el análisis realizado con dos réplicas.

Tabla 6: Resultados promedio y su desvío para el análisis de microcistinas totales por célula para el experimento factorial en *M. cf. aeruginosa*. (n=2). Para ambas intensidades de luz, LA (luz alta) y LB (luz baja).

NaCl (g/L)	fg/cel LA	fg/cel LB
0	34 (20.0)	30 (4.6)
2	29 (6.1)	31 (3.0)
4	30 (20.0)	33 (6.5)
8	20 (5.0)	33 (2.3)

4.4. Resultados metodológicos

4.4.1. Crecimiento de la cepa

Se observó que la respuesta del cultivo en medio BG11 sin diluir como él que fue diluido en un 50% fue similar a lo largo del tiempo sin diferencias en el crecimiento (figura 13).

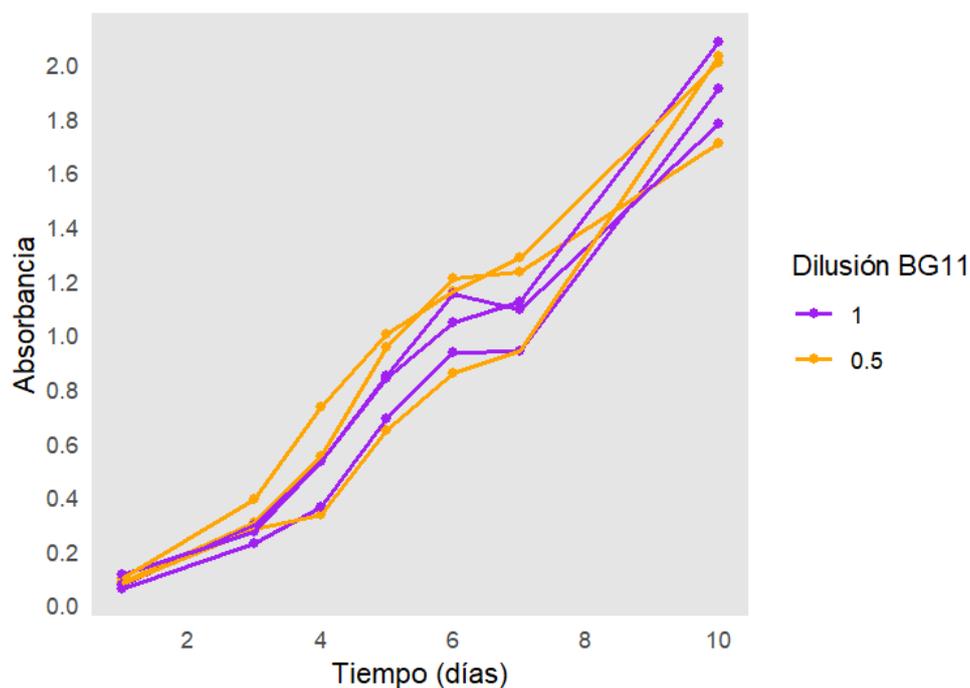


Figura 13: Curva de crecimiento para *M. cf. aeruginosa*, se muestra la absorbancia en función de los días en medio BG11 sin diluir (violeta: 1) y diluido al 50% (naranja: 0.5) para cada réplica (n=3).

En el experimento piloto con tres niveles de salinidad (figura 14), se observó un incremento en la absorbancia a lo largo del tiempo en todos los tratamientos, indicando crecimiento celular. Sin embargo, a partir del día 10, las muestras con 8 g/L de NaCl mostraron un cambio de color y una disminución en la absorbancia, lo que sugiere un proceso de senescencia de la población. En contraste, las muestras sin NaCl (0 g/L) presentaron la mayor tasa de crecimiento, alcanzando niveles de absorbancia significativamente superiores hacia el día 13. Las muestras con 5 g/L mostraron un comportamiento intermedio, manteniendo un crecimiento sostenido, pero a menor ritmo que las muestras sin sal.

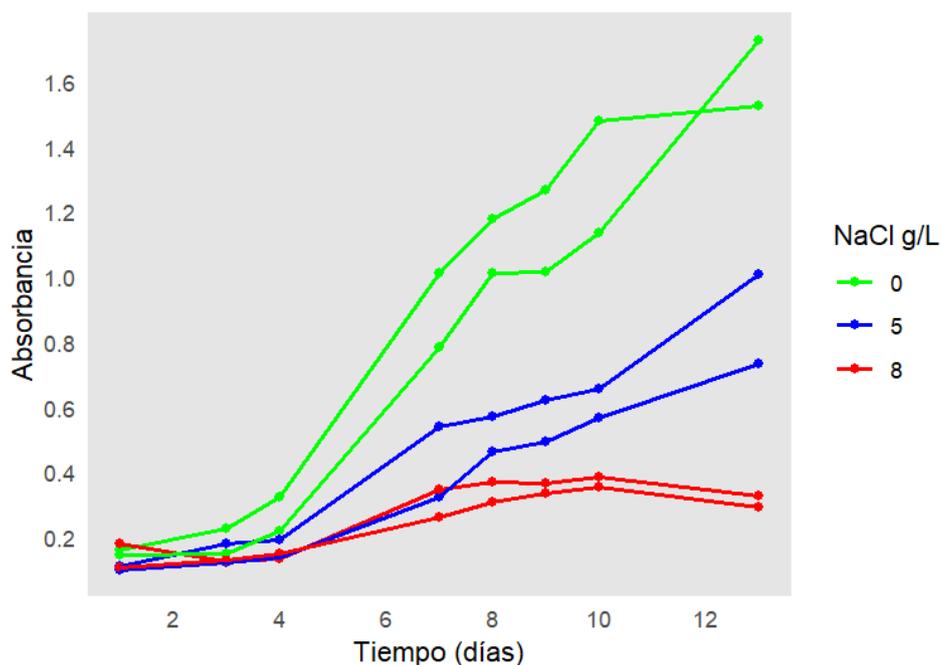


Figura 14: Curva de crecimiento para *M. cf. aeruginosa*, en diferentes concentraciones de NaCl (verde - 0, azul - 5 y rojo - 8 g/L), n=2 para cada condición.

4.4.2. Protocolo para la cuantificación de ficocianina

Se determinó que el método de centrifugación fue el más eficiente para la extracción de la ficocianina en la cepa (figura 15), ya que permitió obtener máximos de absorbancia más altos y definidos para el pigmento, y con la menor interferencia con la clo *a*. Posteriormente, se realizó un ajuste lineal con los resultados de la ficocianina cuantificada por extracción vs la medida por fluorescencia *in vivo* de ficocianina, medida con fluorómetro (figura 16). Existió una correlación positiva y se obtuvo un R^2 de 0.92.

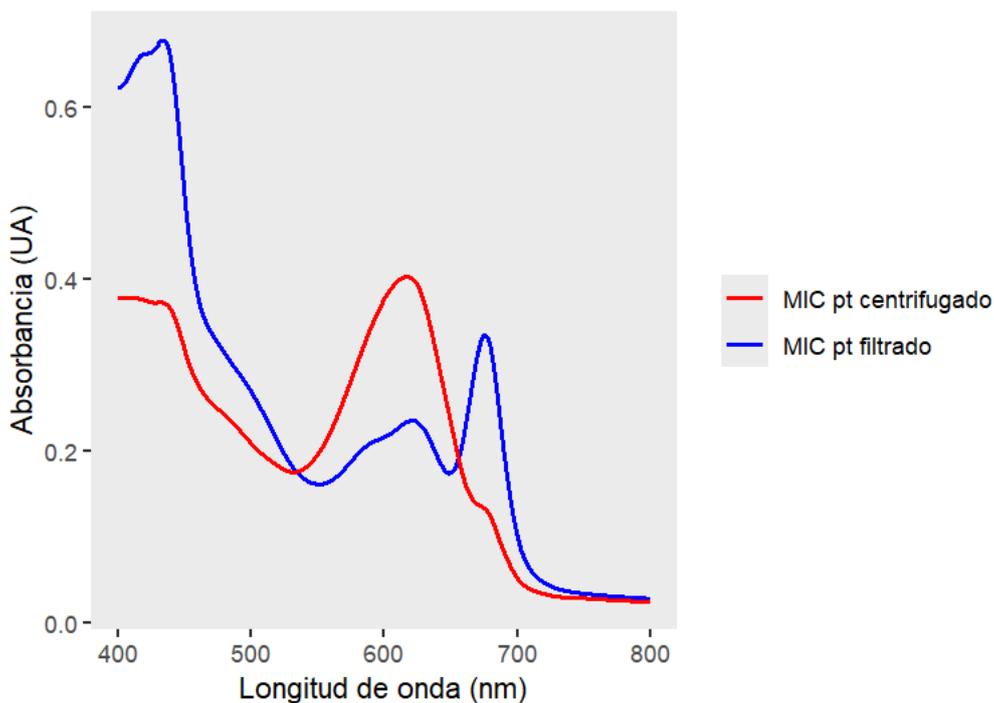


Figura 15: Espectro de absorbancia del extracto de ficocianina en buffer fosfato salino pH = 7, en rojo realizando congelado de pellet y en azul realizando filtrado. Ambas muestras fueron tomadas del mismo cultivo y utilizando la misma cantidad de volumen para su extracción. **MIC pt centrifugado:** Cepa MVCC42 con procedimiento de concentración de la muestra, **MIC pt filtrado:** Cepa MVCC42 con procedimiento de extracción de filtración.

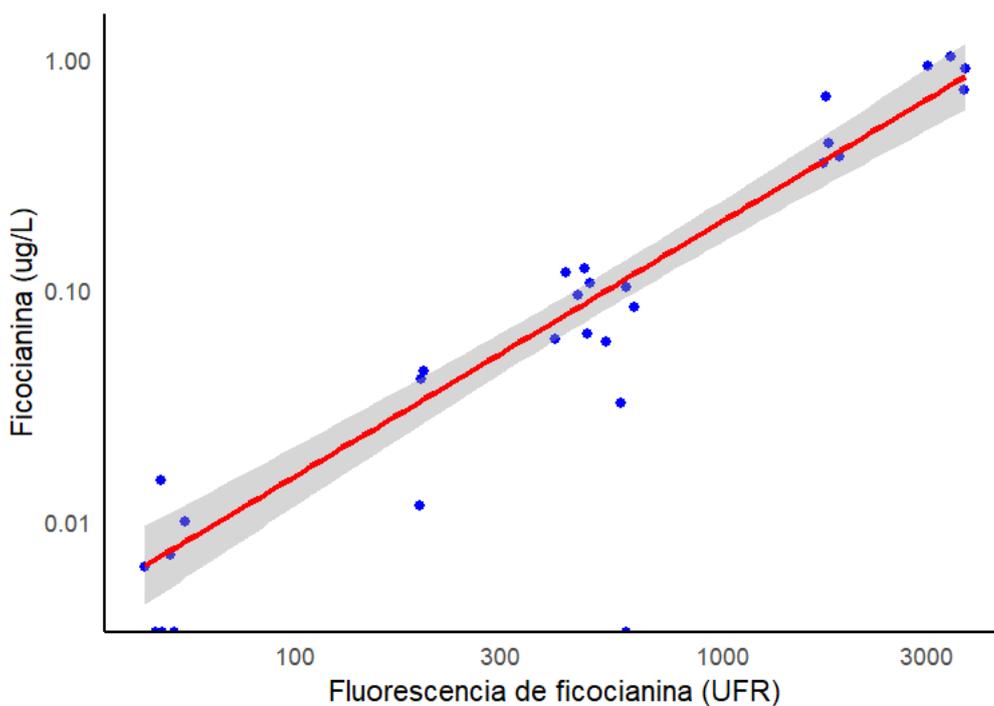


Figura 16: Ajuste entre los resultados de ficocianina cuantificada ($\mu\text{g/L}$) en función de las medidas de fluorescencia relativa (URF) *in vivo* para cada tratamiento, en escala logarítmica, con ajuste de modelo lineal (línea roja, intervalo de confianza: area gris), ($R^2 = 0.92$).

5. Discusión

En los experimentos realizados, se demostró la relevancia de la intensidad de luz en la adecuación del organismo, evidenciado en las respuestas como el cambio en el tamaño de las colonias y las tasas de crecimiento. Por su parte, la salinidad aparece como un factor secundario que generó cambios en el crecimiento y el contenido de los pigmentos fotosintéticos. Finalmente, los cambios en los valores de las variables de respuesta evidenciaron interacción por los efectos combinados de ambos factores, resaltando la complejidad de las respuestas fisiológicas observadas.

5.1. Crecimiento, morfología y toxinas

Los resultados de nuestro experimento permitieron aceptar la primera hipótesis (página 14) y se identificó al factor luz como el más determinante para el crecimiento de MVCC42. Bajo condiciones de intensidad baja (LB), la luz actúa como un recurso limitante, lo que explica las menores tasas de crecimiento y de abundancia en comparación con condiciones de intensidad alta (LA). Estudios previos utilizando la misma cepa (MVCC42) indican que la misma posee mayores tasas de crecimiento (0.56 ± 0.08) en luces altas de hasta $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se observa una disminución de la misma bajo luces bajas (0.14 ± 0.06) de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (V. Acuña com. pers.). Esto se explica porque la luz alta promueve un mayor crecimiento y biomasa, mientras que la luz baja puede limitar tanto el tamaño de las colonias como el crecimiento general, como se ha observado en diferentes cepas de *M. aeruginosa* (El Semary, 2010). Aunque en nuestro experimento utilizamos un rango de intensidades lumínicas relativamente bajas (15 a $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), nuestros resultados muestran que las variaciones en la intensidad lumínica utilizadas en el experimento fueron suficientes para duplicar la tasa de crecimiento. Además, la tasa de crecimiento en la condición de LA fue similar a la observada en intensidades lumínicas de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que sugiere que en esta condición no hubo una limitación por la luz. Por último, nuestros hallazgos indican que la intensidad lumínica tiene un impacto más determinante en el crecimiento que el posible estrés salino.

El efecto negativo de la salinidad en el crecimiento de *M. aeruginosa* puede atribuirse al estrés osmótico a nivel celular como ha sido demostrado en estudios experimentales previos (Georges Des Aulnois et al., 2020; Zhang et al., 2013), donde se utilizaron rangos de salinidades y duración comparables con nuestro experimento. Por otro lado, si bien los resultados pueden ser cepa dependiente (Georges Des Aulnois et al., 2020), se ha puesto en evidencia la tolerancia de poblaciones y cepas distintas de *M. aeruginosa* frente a niveles altos de salinidad, de hasta 20 UPS (Reignier et al., 2024). Esta tolerancia se atribuye a la acumulación de osmolitos

compatibles (sustancias orgánicas acumuladas en la célula frente al estrés osmótico), como betaína y trehalosa, y a la presencia de una vaina mucilaginosa protectora que mitiga los impactos de la salinidad elevada (Reignier et al., 2024). De esta forma las poblaciones de *Microcystis* spp. puede persistir incluso bajo estrés por nutrientes y en condiciones estuarinas durante períodos prolongados (Reignier et al., 2024). En el caso de nuestro experimento es posible que, bajo las condiciones de mayor salinidad (8 g/L), la cepa no haya logrado activar de manera suficiente los mecanismos mencionados anteriormente, lo que limitó su crecimiento y su capacidad de mantenerse en estas condiciones. Por otra parte, se ha demostrado que existe una diferencia en la tolerancia de las diferentes cepas según la salinidad del lugar de origen. Indicando que cepas tomadas de ecosistemas límnicos poseen una menor tolerancia a cepas proveniente de ecosistemas salobres (Georges Des Aulnois et al., 2019), esto se condice con la baja tolerancia de nuestra cepa a la salinidad mayor, debido a que la misma fue aislada de la localidad de Punta del Tigre (ambiente con características límnicas debido a su salinidad baja a media).

Se observó un efecto negativo de la salinidad sobre el tamaño e incluso la formación de colonias, ya que a la mayor concentración de NaCl (8 g/L) no se encontraron colonias. Este comportamiento contrasta con otros estudios experimentales con la misma especie (Bormans et al., 2023), donde se encontraron un aumento en el tamaño de las colonias utilizando un rango de salinidad mayor (hasta 30 UPS, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz) a la de nuestro experimento (~ 8 UPS). Esta respuesta la atribuyen a que el aumento de tamaño de las colonias actuaría como una barrera protectora frente al estrés osmótico. Por lo tanto, refuerzan la idea de que pueden existir diferencias significativas entre cepas de la misma especie, una característica ampliamente reconocida en las cianobacterias, debido a su notable variabilidad fisiológica (Duan et al., 2019; Harke et al., 2016), y a las variaciones morfológicas que estas pueden presentar en respuesta a las condiciones ambientales (Le et al., 2022; Xiao et al., 2018).

La disminución de la actividad fotosintética a > 30% bajo condiciones de alta salinidad (8 g/L de NaCl) refleja cómo el estrés osmótico afecta negativamente los procesos fotosintéticos en *M. cf. aeruginosa*, como se ha demostrado previamente, en donde encontraron descensos en la actividad fotosintética con el aumento de la salinidad (Georges Des Aulnois et al., 2020). Otro estudio también mostró la como densidad celular junto con la actividad fotosintética disminuyeron en rangos de salinidad mayores a 10 UPS (Qiu et al., 2022). Este efecto en la fotosíntesis, a escala fisiológica, podría afectar la adecuación del organismo y por ende su crecimiento, como lo evidencian los resultados de nuestra curva de crecimiento, donde los

tratamientos con mayor salinidad mostraron densidades celulares significativamente menores.

Por otro lado, rechazamos la segunda hipótesis de nuestro trabajo (página 14) ya que no se observaron variaciones significativas en la concentración de microcistinas por célula, lo que sugiere que la producción de la toxina está ligada al crecimiento y división celular (Orr et al., 2004). La concentración celular de microcistinas totales puede ser considerada característica de esta cepa, ya que son similares a los reportados anteriormente con crecimiento en BG11 completo e intensidad de luz $\sim 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Valores de MC/célula: 38.14 fg/cel, N. Badagian com. Pers). Tonk et al. (2007) obtuvieron tendencias similares en experimentos con rangos de concentración de NaCl 0 – 10 g/L, mientras que para rangos de 10 – 17 g/L se observó una disminución en el contenido intracelular de microcistinas, atribuida al estrés osmótico. Se observó que en niveles moderados de salinidad (7 – 8 UPS) no hubo cambios en el contenido de microcistinas por célula y hubo una disminución de las mismas a salinidades mucho más altas a las de nuestro experimento (15 UPS), debido a la degradación provocada por la salinidad elevada sobre las microcistinas (Qiu et al., 2022). En estudios de campo tampoco se pudo adjudicar una mayor producción de microcistinas al aumento de salinidad en floraciones dominadas por el complejo *M. aeruginosa* (Martínez de la Escalera et al., 2017). En nuestro experimento el análisis realizado fue para microcistinas intracelulares, por lo que no podemos asegurar que no hubo un aumento de las microcistinas extracelulares especialmente en los tratamientos de mayor salinidad, como sí lo encontraron otros estudios (Orr et al., 2004; Tonk et al., 2007). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el contenido intracelular de microcistinas se mantiene estable o disminuye con el aumento de la salinidad, aunque no se descarta una posible liberación de toxinas al medio en condiciones de mayor estrés osmótico.

5.2. Pigmentos

Se pudo evidenciar que los diferentes niveles de concentración de NaCl tienen un efecto negativo en el contenido celular de *chl a*. Se puede observar que el cociente *chl a*/célula se relaciona inversamente al estrés salino, ya que en nuestro experimento se mostró el efecto negativo sobre la fotosíntesis y la integridad celular. Una explicación de esto podría atribuirse a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), que son promovidas por el aumento de salinidad (Black et al., 2011; Zhang et al., 2013). A su vez, en nuestros resultados, observamos que el estrés salino prolongado podría haber provocado la degradación de la clorofila, probablemente debido al daño en los fotosistemas, asociado con mutaciones en el ADN que generan

desnaturalización de proteínas y peroxidación lipídica (Zhang et al., 2013). Por otro lado, en nuestro estudio, aunque el contenido celular de clo *a* disminuyó al comparar los controles LA ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y LB ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), esta diferencia no resultó ser significativa en las condiciones experimentales evaluadas, lo que indica que la variación en la intensidad de luz no llegó a ser suficiente para provocar un cambio. En otros géneros como *Dolichospermum*, se observa un aumento en comparación con *Microcystis* en cuanto al contenido pigmentario (clo *a* y ficocianina), lo que resalta la variabilidad de las adaptaciones lumínicas entre diferentes cianobacterias (Kelly et al., 2023).

La disminución en el contenido celular de ficocianina observada en nuestro experimento contrasta con lo reportado para otras cianobacterias. Por ejemplo, en *Nostoc ellipsosporum* el contenido de ficocianina aumentó en forma directa con la salinidad, mientras que para *Nostoc piscinale* no se encontraron variaciones, esto lo han asociado al efecto antioxidante de la ficocianina para contrarrestar el daño oxidativo provocado por el aumento de NaCl (Rezayian et al., 2019). Además, otros autores indican que hay grandes variaciones en el contenido de este pigmento tanto dentro como entre géneros (Kelly et al., 2023; Rezayian et al., 2019). Estos resultados, junto con los antecedentes mencionados, sugieren que factores de estrés como la salinidad pueden influir negativamente en la producción de ficocianina (Rao & Krishnamurthy, 1993).

5.3. Implicancias ambientales

Los ambientes acuáticos costeros son ecosistemas altamente dinámicos y ecológicamente complejos (Menafrá, 2006). En el Río de la Plata, factores como la baja conductividad combinada con altas temperaturas, aumento en la concentración de nutrientes, alta penetración de luz en la columna de agua y estabilidad de la misma, son las condiciones ideales para la dominancia de las cianobacterias (Aubriot et al., 2020; Bonilla et al., 2024; Haakonsson et al., 2020; Kruk et al., 2019). El uso de pigmentos como la clo *a* y la ficocianina para el monitoreo ambiental tiene grandes desafíos. Este trabajo evidenció que la ficocianina y clo *a* pueden disminuir en casi un 40 % en condiciones de salinidad y luz altas. Esto tiene consecuencias directas para el monitoreo ambiental, pudiendo causar la desestimación de la biomasa de cianobacterias en el ambiente. En este estudio se mostró las posibles implicancias ambientales de una interacción significativa entre luz y salinidad, las cuales tienen un efecto en el fitness de la cepa MVCC42, tanto para el crecimiento, pigmentos y abundancia celular. Si bien las respuestas de los organismos en el ambiente pueden variar con los datos experimentales, estos hallazgos destacan cómo diferentes

interacciones de factores pueden generar respuestas complejas. Se destaca la importancia de analizar múltiples factores en conjunto para comprender en profundidad la dinámica de las floraciones.

5.4. Discusión de los resultados metodológicos

5.4.1. Experimento con BG11 diluído y prueba piloto

Las pruebas realizadas con BG11 diluído al 50 % reflejan el exceso de nutrientes que posee el medio BG11, dado que no se observaron diferencias en el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* durante 10 días al comparar ambos medios. El medio BG11 presenta concentraciones de fósforo y de nitrógeno ($\text{NO}_3 = 247 \text{ mg/L}$ y $\text{PO}_4 = 7 \text{ mg/L}$), además esto podría afectar los resultados experimentales, particularmente en estudios relacionados con la fijación de nitrógeno (Whitton, 2012). Por otro lado, con el experimento piloto se verificó la tolerancia de *Microcystis* a diferentes niveles de salinidad durante 13 días (ver discusión crecimiento y morfología).

5.4.2. Protocolo de ficocianina

Se obtuvo una relación lineal entre la concentración de ficocianina (en $\mu\text{g/L}$), cuantificada por extracción, y el pigmento medido por fluorescencia *in vivo* (en UFR) en los diferentes tratamientos. Los valores de ficocianina en $\mu\text{g/L}$ frente a células por mL obtenidos en nuestro estudio están en el rango de valores reportados en ambientes naturales (Ahn et al., 2007), respaldando la validez de nuestros resultados. Sin embargo, otros autores (Kelly et al., 2023) encontraron un orden de magnitud mayor en la concentración de ficocianina (pg/cel). Esto se podría explicar debido a las diferencias esperadas en cuanto a la cantidad de ficocianina de cada cepa (V. Acuña com. pers.). Además, las diferencias morfológicas entre las especies de cianobacterias dificultan la implementación de un protocolo único de extracción, ya que algunos buffers de extracción funcionan mejor en determinadas especies que en otras (Pispas et al., 2024). La medición de la concentración de ficocianina por extracción requiere procedimientos laboriosos, mientras que el uso de fluorescencia *in vivo* permite obtener resultados inmediatos, facilitando un monitoreo más eficiente y continuo en entornos naturales. Además, la fluorescencia es una herramienta práctica para la estimación de ficocianina en tiempo real y altamente sensible a valores bajos del pigmento, lo que representa ventajas significativas en el monitoreo ambiental (Cremella et al., 2018).

El método de centrifugado resultó ser el más adecuado para la cepa MVCC42, ya que otros procedimientos, como la filtración, mostraron una alta interferencia con la clo *a*. Esta interferencia es común cuando se emplean métodos más agresivos o de baja selectividad para la extracción, lo que permite que la clo *a*, debido a su naturaleza

hidrofóbica, provoque agregados que alteran las propiedades espectrales de la solución, dificultando la medición precisa de las ficobiliproteínas (Lauceri et al., 2018). Si bien se han probado diferentes métodos de extracción como sonicar la muestra y la filtración anteriormente mencionada, solo la centrifugación probó ser el método más utilizado y eficiente en diferentes especies de cianobacterias (Lawrenz et al., 2011; Pispas et al., 2024). A pesar de la practicidad que pueda existir en utilizar métodos como la filtración, solo se recupera una pequeña proporción de las ficobiliproteínas (Lawrenz et al., 2011). Por lo tanto, la elección del método de extracción es crucial para garantizar resultados más precisos en la medición de ficobiliproteínas.

6. Conclusiones

- La luz fue el factor más determinante para el crecimiento de *M cf. aeruginosa*, afectando directamente la tasa de crecimiento, abundancia celular y morfología de las colonias.
- La salinidad fue un factor secundario, con efectos negativos en el crecimiento, actividad fotosintética, tamaño de las colonias y concentración de pigmentos.
- Los cambios en la luz y salinidad no afectaron los valores de microcistinas totales por célula, por lo que estarían respondiendo a la tasa de crecimiento.
- La concentración de ficocianina y clorofila *a* por célula disminuyó con el aumento de la salinidad, destacando el efecto del estrés osmótico sobre estos pigmentos.
- Se encontraron efectos de interacción entre ambos factores, luz y salinidad, en la mayoría de las variables de respuesta, lo que podría tener consecuencias en el desarrollo y tolerancia de las floraciones de *M cf. aeruginosa* en el Río de la Plata.
- El método de centrifugación para concentrar la muestra fue el más efectivo para la extracción y cuantificación de la ficocianina de la cepa MVCC42, minimizando interferencias con la clorofila *a*.

7. Bibliografía

Ahn, C-Y., S-H. Joung, S-K. Yoon & H-M. Oh (2007) *Alternative Alert System for Cyanobacterial Bloom, Using Phycocyanin as a Level Determinant*. In *The Microbiological Society of Korea*. Vol. 45(2), 98-104 pp. URL: <http://www.r-project.org>

Andersen, R. A., J. A. Berges, P. J. Harrison & M. M. Watanabe (2005) *Recipes for Freshwater and Seawater Media*. Appendix A, 429-538 pp. En: Andersen, R. A. (ed) (2005). *Algal Culturing Techniques*.

Aubriot, L., B. Zabaleta, F. Bordet, D. Sienra, J. Risso, M. Achkar & A. Somma (2020) *Assessing the origin of a massive cyanobacterial bloom in the Río de la Plata (2019): Towards an early warning system*. *Water Research*, Vol. (181), 115944. URL: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115944>

Aubriot, L., S. Bonilla, & C. Kruk (2009) *Cianobacterias planctónicas: Factores que regulan su crecimiento*, 5-11 pp. En: Bonilla S. (ed.), colectivo de autores (2009) *Cianobacterias Planctónicas Del Uruguay; Manual Para La Identificación y Medidas de Gestión*. Documento Técnico PHI-LAC N°16.

Black, K., M. Yilmaz & E. J. Philips (2011) *Growth and Toxin Production by Microcystis Aeruginosa PCC 7806 (Kutzing) Lemmerman at Elevated Salt Concentrations*. *Journal of Environmental Protection*, Vol. 02(06), 669–674 pp. URL: <https://doi.org/10.4236/jep.2011.26077>

Bonilla, S., & F. R. Pick, (2017). *Freshwater bloom-forming cyanobacteria and anthropogenic change*. *Limnology and Oceanography E-Lectures*, Vol. 7(2), 1–62 pp.

Bonilla, S., & L. De León (2009) *Guía de reconocimiento de floraciones de cianobacterias en terreno*, 37-40 pp. En: Bonilla S. (ed.), colectivo de autores (2009) *Cianobacterias Planctónicas Del Uruguay; Manual Para La Identificación y Medidas de Gestión*. Documento Técnico PHI-LAC N°16.

Bonilla, S., B. Cremella, V. Acuña & S. Haakonsson (2023) *Pigment assemblages in subtropical bloom-forming cyanobacteria strains*. *Journal of Plankton Research*, Vol. 45(5), 746–750 pp. URL: <https://doi.org/10.1093/plankt/fbad035>

Bonilla, S., S. Haakonsson, M. del Carmen Pérez, F. Maciel, F. Pedocchi & R. Arocena (2024) *Cianobacterias tóxicas en costas de San José, Río de la Plata, Uruguay*. *Innotec*, 28 jul-dic, e670–e670.

Bormans, M., B. Legrand, N. Waisbord, & E. Briand (2023) *Morphological and physiological impacts of salinity on colonial strains of the cyanobacteria Microcystis aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, Vol. 12(3), e1367. URL: <https://doi.org/10.1002/mbo3.1367>

Brena, B. M., E. Font, M. Pérez Schirmer, N. Badagian, E. Cardozo, A. Pérez Parada & S. Bonilla (2023) *Microcystin ELISA in water and animal serum for an integrated environmental monitoring strategy*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, Vol. 103(8), 1711–1723 pp. URL: <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1881073>

Chorus, I., & E. Testai (2021) *Recreation and occupational activities*, 333-367 pp. En: Chorus I & M. Welker (eds.) (2021) *Toxic Cyanobacteria in Water; A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, second edition, CRC Press, Boca Raton (FL), on Behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.

Cremella, B. (2017) *Puesta a punto y validación de un método basado en la fluorescencia in vivo de pigmentos como indicador de biomasa de fitoplancton y cianobacterias en cuerpos de agua de Uruguay*. Tesis para la Maestría en Biotecnología. Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Cremella, B., Y. Huot, & S. Bonilla (2018) *Interpretation of total phytoplankton and cyanobacteria fluorescence from cross-calibrated fluorometers, including sensitivity to turbidity and colored dissolved organic matter*. *Limnology and Oceanography: Methods*, Vol. 16(12), 881–894 pp. URL: <https://doi.org/10.1002/lom3.10290>

De Leon, L., & J. S. Yunes (2000) *Short Communication First Report of a Microcystin-Containing Bloom of the Cyanobacterium Microcystis aeruginosa in the La Plata River, South America*. Environmental Toxicology: An International Journal, Vol. 16(1), 110-112 pp.

Duan, Z., X. Tan, K. Parajuli, D. Zhang & Y. Wang (2019) *Characterization of Microcystis morphotypes: Implications for colony formation and intraspecific variation*. Harmful Algae, Vol. (90), 101701. URL: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101701>

El Semary, N. A. (2010) *Investigating factors affecting growth and cellular mcyB transcripts of Microcystis aeruginosa PCC 7806 using real-time PCR*. Annals of Microbiology, Vol. 60(2), 181–188 pp. URL: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0024-5>

Ferrari, G., & L. Vidal (2006) *Fitoplancton de la zona costera uruguaya: Río de la Plata y Océano Atlántico. Bases Para La Conservación y El Manejo de La Costa Uruguaya*. Montevideo. Vida Silvestre, 45–56 pp.

García-Alonso, J., D. Lercari, & O. Defeo (2019) *Río de la Plata: a neotropical estuarine system*. En: Wolanski E., J. W. Day, M. Elliott, R. Ramachandran (eds.) *Coasts and estuaries*. 45–56 pp. Elsevier.

Genty, B., J-M. Briantais & N. R. Baker (1989) *The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, Vol. 990(1), 87–92 pp.

Georges Des Aulnois, M., D. Réveillon, E. Robert, A. Caruana, E. Briand, A. Guljamow, E. Dittmann, Z. Amzil & M. Bormans (2020) *Salt shock responses of Microcystis revealed through physiological, transcript, and metabolomic analyses*. Toxins, Vol. (12), 192. URL: <https://doi.org/10.25932/publishup-47240>

Georges Des Aulnois, M., P. Roux, A. Caruana, D. Réveillon, E. Briand, F. Hervé, V. Savar, M. Bormans & Z. Amzil (2019) *Physiological and Metabolic Responses of Freshwater and Brackish-Water Strains of Microcystis aeruginosa Acclimated to a Salinity Gradient: Insight into Salt Tolerance*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 85(21), 01614-19 pp. URL: <https://doi.org/10.1128/AEM>

Graham, L. E., J. M. Graham, L. W. Wilcox & M. E. Cook (2022) *Algae*. LJLM Press, four edition. URL: www.ljlmpress.com

Haakonsson, S., F. Maciel, M. A. Rodríguez, L. Ponce de León, L. Rodríguez-Gallego, R. Arocena, F. Pedocchi & S. Bonilla (2024) *Monitoring cyanobacterial blooms: a strategy combining predictive modeling and remote sensing approaches*. Environmental Earth Sciences, Vol. 83(7), 195 pp. URL: <https://doi.org/10.1007/s12665-024-11488-3>

Haakonsson, S., M. A. Rodríguez, C. Carballo, M. del C. Pérez, R. Arocena & S. Bonilla (2020) *Predicting cyanobacterial bioVolume from water temperature and conductivity using a Bayesian compound Poisson-Gamma model*. Water Research, Vol. (176), 115710 pp. URL: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115710>

Harke, M. J., M. M. Steffen, C. J. Gobler, T. G. Otten, S. W. Wilhelm, S. A. Wood & H. W. Paerl (2016) *A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, Microcystis spp.* Harmful Algae, Vol. (54), 4–20 pp. URL: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.007>

Hotos, G. N. (2021) *Culture growth of the cyanobacterium Phormidium sp. in various salinity and light regimes and their influence on its phycocyanin and other pigments*

content. Journal of Marine Science and Engineering, Vol. 9(8), 978. URL: <https://doi.org/10.3390/jmse9080798>

Huisman, J., G. A. Codd, H. W. Paerl, B. W. Ibelings, J. M. H. Verspagen & P. M. Visser (2018) *Cyanobacterial blooms*. Nature Reviews Microbiology, Vol. 16(8), 471–483 pp. Nature Publishing Group. URL: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>

Ibelings B. W, R. Kurmayer, S. M. F. O. Azevedo, S. A. Wood I. Chorus, & M. Welker (2021) *Understanding the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins*, 213-295 pp. En: Chorus I & M. Welker (eds.) (2021) *Toxic Cyanobacteria in Water; A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, second edition, CRC Press, Boca Raton (FL), on Behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.

Izaguirre, G., C. J. Hwang, S. W. Krasner & M. J. Mcguire (1982) *Geosmin and 2-Methylisoborneol from Cyanobacteria in Three Water Supply Systems*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 43(3), 708-714pp. URL: <https://journals.asm.org/journal/aem>

Jeffrey, S. W. (2005) *Application of pigment methods to oceanography*. 375- 428 pp. En: Roy, S., C. Shewellyn, E. S. Egeland & G. Johnsen (eds.) *Phytoplankton Pigments, Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. Cambridge University Press.

Kalff, J. (2001). *Limnology: Inland Water Ecosystems*. Vol. (592). Practice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Kelly, L. T., L. Reed, J. Puddick, I. Hawes, B. J. Hicks, M. G. Allan, M. K. Lehmann & S. A. Wood (2023). *Growth conditions impact particulate absorption and pigment concentrations in two common bloom-forming cyanobacterial species*. Harmful Algae, Vol. (125), 102432. URL: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102432>

Komárek, J. & K. C. Anagnostidis (2008). Teil 1/Part 1: Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa; Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D (Eds.), 1–556 pp.

Kruk, C., A. Martinez, G. Martinez de la Escalera, R. Trinchin, G. Manta, A. M. Segura, C. Piccini, B. Brena, G. Fabiano, M. Pierez, L. Gabito, I. Alcántara & B. Yannicelli (2019) *Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019*. INNOTECH, Vol. (18). URL: <https://doi.org/10.26461/18.06>

Lauceri, R., M. Bresciani, A. Lami & G. Morabito (2018) *Chlorophyll a interference in phycocyanin and allophycocyanin spectrophotometric quantification*. Journal of Limnology, Vol. 77(1), 169–177 pp. Page Press Publications. URL: <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1691>

Lawrenz, E., E. J. Fedewa & T. L. Richardson (2011) Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. Journal of Applied Phycology, Vol. 23(5), 865–871 pp. URL: <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9600-0>

Lawton, L. A., J. S. Metcalf, B. Žegura, R. Junek, M. Welker, A. Törökné & L. Bláha (2021) *Laboratory analysis of cyanobacterial toxins and bioassays*. 745–800 pp. En: *Toxic Cyanobacteria in Water; A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, second edition, CRC Press, Boca Raton (FL), on Behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.

Le, V. Van, A. Srivastava, S. R. Ko, C. Y. Ahn & H. M. Oh (2022) *Microcystis colony formation: Extracellular polymeric substance, associated microorganisms, and its*

application. *Bioresource Technology*, Vol. (360). Elsevier Ltd. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127610>

Maciel, F. P., S. Haakonsson, L. Ponce de León, S. Bonilla & F. Pedocchi (2023) *Challenges for chlorophyll-a remote sensing in a highly variable turbidity estuary, an implementation with Sentinel-2*. *Geocarto International*, Vol. 38(1). URL: <https://doi.org/10.1080/10106049.2022.2160017>

Martínez de la Escalera, G., C. Kruk, A. M. Segura, L. Nogueira, I. Alcántara & C. Piccini (2017) *Dynamics of toxic genotypes of Microcystis aeruginosa complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient*. *Harmful Algae*, Vol. 62), 73–83 pp. URL: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.012>

Mazzeo, N., A. Rodríguez, H. Fort & M. Scheffer (2010) *Eutrofización de lagos o reservorios poco profundos*. En: *Bases técnicas para el manejo integrado de Laguna del Sauce y cuenca asociada* 19–27 pp.

Menafrá, R. (2006) *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Vida Silvestre.

Ogashawara, I. (2020) *Determination of phycocyanin from space-A bibliometric analysis*. *Remote Sensing*, Vol. 12. MDPI AG. URL: <https://doi.org/10.3390/rs12030567>

Oliver, R. L., Hamilton, D. P., Brookes, J. D., & Ganf, G. G. (2012). *Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria*. 155–194 pp. En: Whitton, B. A. (ed) (2012) *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer.

Orr, P. T., G. J. Jones & G. B. Douglas (2004) *Response of cultured Microcystis aeruginosa from the Swan River, Australia, to elevated salt concentration and consequences for bloom and toxin management in estuaries*. *Marine and Freshwater Research*, Vol. 55(3), 277–283 pp. URL: <https://doi.org/10.1071/MF03164>

Pedocchi, F., R. Arocena, & I. Machado (2022) *Monitoreos hidrodinámicos y biológicos en el Río de la Plata en la zona de Punta del Tigre*.

Piccini, C., G. M. de la Escalera, A. M Segura, C. Croci & C. Kruk (2024) *The Microcystis-microbiome interactions: origins of the colonial lifestyle*. *FEMS Microbiology Ecology* Vol. 100. Oxford University Press. url: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae035>

Pérez, M., G. Gonzalez-Sapienza, D. Sienra, G. Ferrari, M. Last, J. A. Last & B. M. Brena (2013) *Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: Simple and affordable methods may be the answer*. *Journal of Environmental Management*, Vol. 114, 63–71 pp. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.052>

Pispas, K., G. Manthos, E. Sventzouri, M. Geroulia, S. G. Mastropetros, S. S. Ali & M. Kornaros (2024) *Optimizing Phycocyanin Extraction from Cyanobacterial Biomass: A Comparative Study of Freeze–Thaw Cycling with Various Solvents*. *Marine Drugs*, Vol. 22(6). URL: <https://doi.org/10.3390/md22060246>

Qiu, Y., Z. Ma, X. Liu, R. Zheng, Y. Xiao & M. Wang (2022) *The Detrimental Effect of High Salinity on the Growth and Microcystins Contamination of Microcystis aeruginosa*. *Water (Switzerland)*, Vol. 14(18). URL: <https://doi.org/10.3390/w14182871>

Rao, C. S. V. R., & K. Krishnamurthy (1993) *Salinity induced responses in the marine cyanobacterium Anacystis dimidiata*. *Ciencias Marinas*, Vol. 19(4), 407–413 pp. URL: <https://doi.org/10.7773/cm.v19i4.948>

Reignier, O., E. Briand, F. Hervé, E. Robert, V. Savar, S. Tanniou, Z. Amzil, C. Noël, C. & M. Bormans (2024) *Effects of salinity and nutrient stress on a toxic freshwater cyanobacterial community and its associated microbiome: An experimental study*. Environmental Microbiology Reports, Vol. 16(5). URL: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.70029>

Reynolds, C. S. (2006) *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press (ed).

Rezayian, M., V. Niknam, & M. A. Faramarzi (2019) *Antioxidative responses of Nostoc ellipsosporum and Nostoc piscinale to salt stress*. Journal of Applied Phycology, Vol. 31(1), 157–169 pp. URL: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1506-2>

Rong-hua, L. M., K. Wei-juan, D. Hong-tao & Z. Shou-xuan (2009). *Quantitative estimation of phycocyanin concentration using MODIS imagery during the period of cyanobacterial blooming in Taihu*. China Environmental Science, Vol. 29.

Scheffer, M. (1998). *Ecology of shallow lakes* (Vol. 1). Springer.

Schopf, J. W. (2012). *The fossil record of cyanobacteria*. 15–36 pp En: Whitton, B. A. (ed) (2012) *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer.

Šejnohová, L., & B. Maršálek (2012) *Microcystis*. 195–228 pp. En: Whitton, B. A. (ed) (2012), *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer.

Strunecky, O., A. Pavlovna Ivanova & J. Mares (2023) *An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis Cyanobacterial secondary metabolites isolation View project dynamics of cyanobacteria in eutroficated shallow ponds View project*. URL: <https://www.researchgate.net/publication/366788861>

Tonk, L., K. M. Bosch, P. Visser & J. Huisman (2007) *Salt tolerance Microcystis aeruginosa*. Vol. 46, 117–123 pp.

Wehr, J. D., R. G. Sheath & J. P. Kociolek, J. P. (2015). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Elsevier.

Wetzel, R. G. (2001) *Limnology: lake and river ecosystems* Vol. (1). Academic Press.

Whitton, B. A., & M. Potts, (2012) Introduction to the cyanobacteria 1–13 pp. En: Whitton, B. A. (ed) (2012) *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer.

Xiao, M., Li, M., & Reynolds, C. S. (2018). *Colony formation in the cyanobacterium Microcystis*. Biological Reviews, Vol. 93(3), 1399–1420 pp. URL: <https://doi.org/10.1111/brv.12401>

Xu, G., Y. Zhang, T. Yang, H. Wu, A. Lorke, M. Pan, B. Xiao & X. Wu (2023) *Effect of light-mediated variations of colony morphology on the buoyancy regulation of Microcystis colonies*. Water Research, Vol. 235. URL: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119839>

Yang, X., W. Dong, L. Liu, Y. Bi, W. Xu & X. Wang (2023) *Uncovering the Differential Growth of Microcystis aeruginosa Cultivated under Nitrate and Ammonium from a Photophysiological Perspective*. ACS ES and T Water, Vol. 3(4), 1161–1171 pp. URL: <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00624>

Yéprémian, C., A. Catherine, C. Bernard, R. Congestri, T. Elersek & R. Pilkaityte (2017) *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*.

Zabaleta, B., S. Haakonsson, M. Achkar & L. Aubriot (2023). *High-frequency zones of phytoplankton blooms in the Río de la Plata Estuary associated with El Niño-Southern Oscillation*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Vol. 286, 108342.

Zhang, Y., Q. Xu & B. Xi (2013) *Effect of NaCl salinity on the growth, metabolites, and antioxidant system of Microcystis aeruginosa*. *Journal of Freshwater Ecology*, Vol. 28(4), 477–487 pp. URL: <https://doi.org/10.1080/02705060.2013.782579>

Zhao, K.-H., R. J. Porra & H. Scheer (2012) *Phycobiliproteins*. En: *Handbook of Porphyrin Science With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*, Vol. 22, 1–66 pp. World Scientific.

8. Anexo

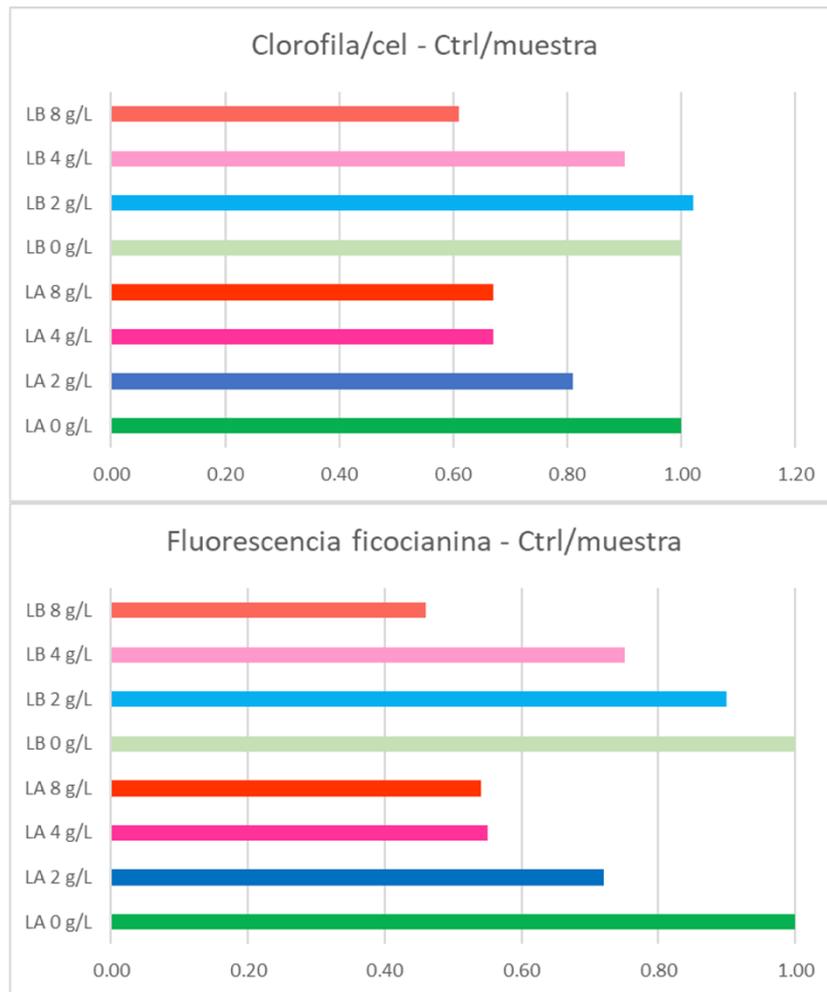


Figura 1S: (A) Gráfico de barras invertido del cociente entre la clorofila a por célula para la muestra sobre su control. (B) Gráfico de barras invertido del cociente entre la fluorescencia de ficocianina por célula para la muestra sobre su control.