

GSPONER, NATALIA SOL
Monitoreo de pigment



2013

72647

72647

MFR:
Clasif:
J. 810



72647



TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS – AÑO 2013

Natalia S. Gsponer

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-
QUÍMICAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

*“Monitoreo de pigmentos fotosintéticos aplicando sensores remotos para
mapear florecimientos de cianobacterias en aguas superficiales continentales”*

NATALIA SOLEDAD GSPONER

2013



TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS – AÑO 2013

Natalia S. Gsponer

*A Cristian
A Martina y Bautista*



El presente trabajo para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas fue realizado en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Doctorando: *Mic. Natalia S. Gsponer*

Director de Tesis: *Dra. M. Claudia Rodríguez*

Co-director de Tesis: *Dr. Carlos A. Chesta*

Comisión de Tesis:

Dr. Hernán A. Montejano

Dra. Ana L. Martínez

Dr. Daniel A. Wunderlin



“Cada hombre es arquitecto de su destino. Dios nos hizo perfectos y no escoge a los capacitados, sino que capacita a los escogidos. Hacer o no hacer algo, solo depende de nuestra voluntad y perseverancia”

Albert Einstein



AGRADECIMIENTOS

A *Dios*, por poner en mi camino a tantas personas que me ayudaron a cumplir este sueño...

A mis padres, *Esther* y *Victor* que sin su esfuerzo y ayuda no habría podido realizar esta carrera...

A *Cristian*, mi gran compañero, por su apoyo incondicional, por las innumerables horas de charla, por tantas risas compartidas, por tantos momentos imborrables...

A mi hermana *Marcela* y mi cuñado *Ramiro*, que siempre me ayudaron, me acompañaron y me escucharon, por los mates cebados, las charlas compartidas y por la paciencia...

A mis pequeñitos, *Martina* y *Bautista* por permitirme ser una tía loca y llena de amor incondicional.... Me enseñaron el amor de tía...

A mi abuela, *Blanca* que siempre se preocupó y me alentó a finalizar esta carrera...

A *Graciela, Jorge, Gabriel* y *Silvia*, por los hermosos momentos compartidos, el amor incondicional y por la el apoyo en todo momento...

A mis *primos/as, mis tías/os*, que de una forma u otra estuvieron presentes...

A mi director, *Carlos Chesta*, por brindarme la oportunidad y el apoyo para poder realizar este doctorado, por la paciencia y dedicación, por ser un gran maestro...



A *Claudia Rodríguez*, por su colaboración durante los distintos muestreos realizados y al grupo de Ecología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC...

Al Jurado que me acompañó en esta tesis, los doctores *Hernán Montejano*, *Ana Luján Martínez de Fabricius* y *Daniel Wunderlin*, por la dedicación que me brindaron para la realización de esta tesis...

A todo el grupo de trabajo de *Fotoquímica* por brindarme un lugar, por el compañerismo y por ayudarme a entender “la fotoquímica”, y a los becaritos mis grandes compañeros de laboratorio *Clau*, *Lau*, *Euge*, *Ceci P.*, *Ceci C.*, *Caro*, *Mariel* y *Chaucha*..

A mis *hermanitos del Gran Becario* que me acompañaron, me ayudaron y me escucharon cada día, sin ustedes no estaría cumpliendo esta etapa, *Javi*, *Fede*, *Jime T.*, *Lau*, *Jime M.*, *Eve*, *Gera*, *Ale*, *Jorge*, *Dianis*, *Euge*, *Gaby*, *Sil*, *Dani*, *Andrés*, *Lore*, *Eli*, *Clau*, *Alvaro*, *Pablo*, *Caro*...

A mis amigas y amigos de la vida que siempre estuvieron presentes, por su apoyo incondicional, las horas de charlas, la paciencia y el cariño, *Romi*, *Lisi*, *Eli*, *Sole*, *Lau*, *Mile*, *Selva*, *Nacho*, *Dai*, *Inés*...

A la directora del grupo de *Ficología*, la *Dra. Ana Luján Martínez de Frabicius* y a todo su grupo de trabajo, *Marina*, *Gachi*, *Majo*, *Andrea*, *Pauli*, *Martín*, *Julia*, *Marisel*... cuánto que aprendí con ustedes y no sólo de algas...

Al *Dr. Edgardo Durantini*, y a todo su grupo de trabajo, por su colaboración, dedicación y por hacerme sentir parte del grupo de *Físico-Química Orgánica* desde el día que llegué al departamento de química...



A Rosita, Negrita, Cacho, Marisel, Daniela y Graciela por toda su ayuda...

A los integrantes del Departamento de Química de la FCEFOyN y a la UNRC, a los responsables y a los docentes del Doctorado en Ciencias Biológicas por brindarme lo necesario para esta tesis...

A todos...MUCHÍSIMAS GRACIAS DE TODO CORAZÓN...



RESUMEN

Generalmente, para lograr la caracterización de un sistema acuático se realizan estudios de eutrofización ya que estos son capaces de predecir el comportamiento de los reservorios en el tiempo. Sin embargo, estos estudios no permiten discriminar poblaciones algales potencialmente tóxicas. Por esta razón, se caracterizaron espectroscópicamente los géneros de algas autóctonas presentes en el embalse de Río Tercero de la Provincia de Córdoba desarrolladas en diferentes condiciones naturales y simultáneamente, se cuantificaron sus poblaciones *in situ* y la concentración de Chl *a* total. Se llevó a cabo un monitoreo sistemático del embalse evaluando las poblaciones algales presentes y variables como temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD), obteniendo datos estadísticamente significativos sobre la distribución espacial y temporal de estas variables. Aplicando el método de Beutler, se construyeron *espectros norma* correspondientes a seis grupos algales (cianofíceas, clorofíceas, diatomeas, dinoflagelados y rodofitas), los cuales cumplieron con las tres premisas fundamentales de la técnica. Mediante la utilización de un método de regresión lineal, se evaluó la población de los distintos grupos presentes en muestras reales. Se demostró que el método de Beutler es básicamente cualitativo. Los parámetros físico-químicos tomados *in situ* mostraron correlación con la estación del año analizada. El estado trófico del embalse indicó, en general, un moderado enriquecimiento con nutrientes y crecimiento planctónico con escasa acumulación de sedimentos.

Durante el proceso de eutrofización, debido a un importante aporte de nutrientes, se pueden generar floraciones de algas planctónicas y en particular de cianobacterias. La técnica de inactivación fotodinámica (TIF), se basa en el dopaje de células que se quieren inactivar usando un fotosensibilizador (FS); el cual tras irradiación con luz visible es capaz de producir especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta técnica se utiliza actualmente para controlar los florecimientos de algas en fuentes de agua potable. Se realizaron estudios de TIF tendientes a lograr el control poblacional de especies nocivas de cianobacterias en experimentos *in vitro* utilizando una porfirina tetracatiónica (TAPP⁴⁺). Se demostró que este FS provoca la disminución de la población algal a través de un mecanismo fotodinámico, aunque no se puede confirmar aún si esto es producido por ROS.



ABSTRACT

In general, to achieve the characterization of an aquatic system studies of eutrophication are performed because they are useful predicting the behavior of the reservoir over the time. However, these studies do not discriminate potentially toxic algal populations. For this reason, we characterized spectroscopically native algal present in Rio Tercero lake (Córdoba, Argentina) developed in different natural conditions. The algae populations were determined *in situ*, as well as, the total concentration of Chl *a*. This was carried out by systematic monitoring of the algal population present in the reservoir. Other variables characterizing the basin, such as temperature, pH, dissolved oxygen (DO), etc., were also studied. This allows obtaining statistically significant data on the spatial and temporal distribution of these variables. Applying the method of Beutler, *norm spectra* were constructed for six algal groups (Cyanobacteria, Chlorophyta, Bacillariophyta, Dinophyta and Rhodophyta), which met with the three fundamental premises of the technique. Using a linear regression method population of the different groups present in real samples was evaluated. It was shown that Beutler's method is basically qualitative. The physicochemical parameters measured *in situ* correlated with the season being analyzed. The trophic state of the reservoir showed a moderate enrichment with nutrients and planktonic growth and low sediment accumulation.

During the process of eutrophication of a reservoir due to an important nutrient unloading, can generate blooms of planktonic algae, in particular, cyanobacteria. The photodynamic inactivation technique (PDI) is based on the doping of cells that are to be inactivated using a photosensitizer (PS), which upon irradiation with visible light can produce reactive oxygen species (ROS). This technique is currently used to control algae blooms in drinking water sources. PDI studies were conducted to the end of achieving population control on toxic species of cyanobacteria *in vitro* experiments using a tetracationic porphyrin (TAPP⁴⁺). FS was shown to cause a decrease in the algae population through a photodynamic mechanism, although it could not be confirmed if this effect was produced by ROS.



RESUMEN DE CONTENIDO

- ~ INTRODUCCIÓN**
- ~ OBJETIVOS**
- ~ ANTECEDENTES**
- ~ MATERIALES Y MÉTODOS**
- ~ RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- ~ CONCLUSIONES**
- ~ BIBLIOGRAFÍA**

INDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I	1
I-INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	3
II-OBJETIVOS	5
II.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
CAPÍTULO III	7
III-ANTECEDENTES	9
III.1. MICROALGAS	9
III.1.1. INTRODUCCIÓN.....	9
III.1.2. CIANOFICEAS.....	11
III.1.3. CLOROFITAS	15
III.1.4. DIATOMEAS	16
III.1.5. DINOFLAGELADOS	18
III.1.6. RODOFITAS.....	20
III.2. CURVAS DE CRECIMIENTO.....	22
III.3. FUNDAMENTOS DE TÉCNICAS. ESPECTROSCOPÍAS ULTRAVIOLETA (UV) -VISIBLE Y DE EMISIÓN	23
III.3.1. ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE	23
III.3.1.1. TRANSMITANCIA	24
III.3.2. ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN	26
III.3.2.1. INHIBICIÓN (QUENCHING) DE ESTADOS EXCITADOS.....	31
III.3.3. EL SISTEMA FOTOSINTÉTICO Y EL ORIGEN DE LA LUMINISCENCIA DE LOS DIFERENTES GRUPOS ALGALES	34
III.3.3.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALGAS	39
III.4. CONTROL DE LAS POBLACIONES ALGALES	43
III.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	43
III.4.2. FOTOSENSIBILIZADORES	45

III.5. ÁREA DE ESTUDIO.....	46
III.5.1. EMBALSE DE RÍO TERCERO	46
III.5.2. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	47
III.5.2.1. TEMPERATURA.....	47
III.5.2.2. pH.....	48
III.5.2.3. OXÍGENO DISUELTO (OD).....	49
III.5.2.4. ESTADO TRÓFICO.....	49
CAPÍTULO IV	51
IV-MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
IV.1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE CEPAS	53
IV.1.1. MATERIALES.....	54
IV.1.2. METODOLOGÍA.....	59
IV.2. INSTRUMENTAL.....	61
IV.3. CUANTIFICACIÓN DE CHL α	62
CAPÍTULO V.....	67
V-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
V.1. CURVAS DE CRECIMIENTO.....	69
V.2. OBTENCIÓN DE ESPECTROS <i>NORMA</i>	70
V.3. ANÁLISIS MULTIPARAMÉTRICO.....	75
V.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	76
V.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	79
V.5.1. MUESTREO.....	79
V.5.2. ANALISIS DE LAS MUESTRA REALES.....	81
V.5.2.1. DETERMINACIÓN DE CHL EN LAS MUESTRA REALES.....	81
V.5.2.2. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LAS MUESTRAS.....	81
V.5.2.3. RELACIÓN ENTRE LA CHL α TOTAL CALCULADA POR EL METODO GEMS/AGUA Y LA CALCULADA USANDO EL METODO DE BEUTLER	86
V.5.2.3. OTROS ANTECEDENTES DE LA APLICACIÓN DEL METODO DE BEUTLER	93
V.6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS <i>IN SITU</i>	95

V.7. CONTROL DE LAS POBLACIONES ALGALES	98
V.7.1. TRATAMIENTO CON FOTOSENSIBILIZADORES	98
V.7.1.1. FOTOSENSIBILIZADORES DERIVADOS DE PORFIRINAS.....	98
V.7.2. EFECTO DE LA PRESENCIA DEL FS SOBRE LA CINETICA DE CRECIMIENTO DE <i>MICROCYSTIS</i>	103
V.7.3. ESTUDIO DE INCORPORACIÓN DEL FS A LAS MICROALGAS	105
V.7.3.1. ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN DE PORFIRINA POR TÉCNICAS FLUOROMÉTICAS.....	105
V.7.3.2. INCORPORACIÓN DEL FS ESTUDIADO POR MICROCOPIA DE CAMPO CLARO Y DE FLUORESCENCIA.....	108
CAPÍTULO VI	119
VI-CONCLUSIONES	121
CAPÍTULO VII	125
VII-BIBLIOGRAFÍA.....	125

INDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

Figura 1. Floración de microalgas	10
Figura 2. Estructura de un ficobilisoma	11
Figura 3. Cianobacterias	12
Figura 4. <i>Microcystis</i> sp.	13
Figura 5. Esquema de una célula de <i>Microcystis</i> sp.	14
Figura 6. Estructura envoltura celular	14
Figura 7. Clorofitas	16
Figura 8. Diatomeas	17
Figura 9. Dinoflagelados	19
Figura 10. Rodofitas	21
Figura 11. Curva de crecimiento microbiano	23
Figura 12. Representación esquemática del principio de absorción	24
Figura 13. Diagrama de Jablonski y procesos de relación de los estados excitados	27
Figura 14. Fluorómetro	30
Figura 15. Esquema de un fotosistema	35
Figura 16. Estructura y reacciones básicas de los PSII y PSI. Diagrama en Z	36
Figura 17. Estructura molecular de los principales pigmentos fotosintéticos	37
Figura 18. Espectros de absorción de los diferentes pigmentos antena	38
Figura 19. Fluorómetro de laboratorio	41
Figura 20. Ilustración gráfica del mecanismo fotodinámico	45
Figura 21. Ubicación del Embalse de Río Tercero	46
Figura 22. Embalse de Río tercero	47
Figura 23. Especies algales cultivadas	53
Figura 24. Caja de cultivo	59
Figura 25. Espectro de emisión de la lámpara utilizada dentro de la caja de cultivo	59

Figura 26. Variación de la temperatura en función del tiempo de incubación de los cultivos	60
Figura 27. Estructura molecular de los diferentes tipos de Chl	62
Figura 28. Degradación de Chl <i>a</i>	63
Figura 29. Espectros de absorción de Chl <i>a</i> y Feofitina	63
Figura 30. Preparación de muestras a analizar	65
Figura 31. Preparación de muestras para la construcción de la curva de crecimiento	69
Figura 32. Curva de crecimiento para <i>Microcystis</i> sp. en función del tiempo de incubación	70
Figura 33. Espectro de emisión realizado por triplicado <i>in vivo</i> para <i>Microcystis</i> sp.	71
Figura 34. Espectro de excitación realizado por triplicado <i>in vivo</i> para <i>Microcystis</i> sp.	71
Figura 35. Espectro de emisión realizado para <i>Ceratium</i> sp. <i>in vivo</i>	72
Figura 36. Espectro de excitación realizado para <i>Ceratium</i> sp. <i>in vivo</i>	72
Figura 37. Relación entre intensidad de fluorescencia a 680 nm (u.a.) y el contenido de Chl <i>a</i> (mg/m ³) de cada muestra para el género <i>Microcystis</i> sp.	73
Figura 38. Relación entre intensidad de fluorescencia a 680 nm (u.a.) y el contenido de Chl <i>a</i> (mg/m ³) de cada muestra (promedio triplicado) para el género <i>Microcystis</i>	73
Figura 39. Espectros <i>norma</i> obtenidos del promedio de los espectros de excitación de muestras de microalgas <i>in vivo</i>	74
Figura 40. Ajuste realizado a partir de la muestra N° 4 utilizando el método de regresión lineal	78
Figura 41. Concentración de Chl <i>a</i> (mg/m ³) para todas las mezclas analizadas mediante el método de regresión lineal propuestos por Beutler <i>et al.</i>	78
Figura 42. Medidor portátil de parámetros físico-químicos y disco de Secchi	80
Figura 43. Embalse de Río Tercero. Sitios de muestreo	81
Figura 44. Comparación en el tiempo de la intensidad de emisión de una muestra recolectada en el embalse de Río Tercero y un cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	82

- Figura 45.** Espectros de excitación tomados con agitación para una muestra real y el correspondiente promedio de 16 espectros (traza roja) 83
- Figura 46.** Espectros de excitación tomados con agitación para un cultivo mezcla, el correspondiente promedio de 16 espectros (traza roja) y un único espectro de excitación (traza amarilla) 83
- Figura 47.** Ajuste realizado del promedio de los espectros de excitación, a partir de la muestra N° 9, tomada durante el mes de mayo de 2010 en la Bahía Club Río Tercero 84
- Figura 48.** Ajuste realizado del promedio de los espectros de excitación de la muestra N° 12, correspondiente al mes de marzo de 2010 en la península Costa Baja 85
- Figura 49.** Ajuste realizado del promedio de los espectros de excitación de la muestra N° 5 tomada de la toma en el mes de septiembre de 2010 86
- Figura 50.** Comparación entre los valores de Chl *a* total calculada por ambos métodos, correspondiente al muestreo de otoño de 2011 87
- Figura 51.** Intensidad de fluorescencia para una muestra algal ideal en función del tiempo y bajo diferentes intensidades de iluminación 90
- Figura 52.** Determinación del contenido de Chl en el Schlei fjord. Comparación entre la concentración de Chl detectada fluorométricamente (ChlF) y el contenido de Chl determinado por análisis HPLC 93
- Figura 53.** Parámetros físico-químicos tomados *in situ* durante los muestreos realizados en el período 2009-2011 97
- Figura 54.** Estructura molecular de TAPP⁴⁺ 99
- Figura 55.** Espectro de absorción de 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N,N-trimetilaminopropoxi)fenil] porfirina (TAPP⁴⁺) en N,N-dimetilformamida (DMF) 100
- Figura 56.** Espectro de emisión de 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N,N-trimetilaminopropoxi)fenil] porfirina (TAPP⁴⁺) en N,N-dimetilformamida (DMF). 101

Figura 57. Fotodescomposición de TAPP ⁴⁺ analizada siguiendo la absorción de la banda de <i>Soret</i> (420 nm)	102
Figura 58. Cambios en el espectro de absorción de TAPP ⁴⁺ en función de los días de incubación	103
Figura 59. Esquema de la metodología aplicada en los diferentes tratamientos	104
Figura 60. Curva de retardo del crecimiento para el género <i>Microcystis</i> incubado con 10 y 20 μM de TAPP ⁴⁺ en medio BG ₁₁ a 22 °C.	105
Figura 61. Porcentaje de porfirina incorporada en células del género <i>Microcystis</i> tratadas con 10 μM de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 22 °C	107
Figura 62. Porcentaje de porfirina incorporada en células del género <i>Microcystis</i> tratadas con 10 y 20 μM de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 22 °C	108
Figura 63. Células del género <i>Microcystis</i> observadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia tratadas con 10 y 20 μM de sensibilizador	109
Figura 64. Esquema de la metodología aplicada para evidencia el efecto fotodinámico de TAPP ⁴⁺ en el género <i>Microcystis</i>	111
Figura 65. Recuento de células del género <i>Microcystis</i> tratadas con 20 μM de sensibilizador en presencia de luz y en oscuridad a diferentes tiempos de incubación a 22 °C	112
Figura 66. Esquema de la metodología aplicada para demostrar el efecto fotodinámico de TAPP ⁴⁺ en el género <i>Microcystis</i>	113
Figura 67. Tubo Control: Células del género <i>Microcystis</i> observadas con microscopía óptica y de fluorescencia luego de exposición directa al microscopio (440x)	113
Figura 68. Tubo 2: Observación directa al microscopio. Células del género <i>Microcystis</i> observadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia tratadas con 20 μM de porfirina y exposición directa al microscopio	114
Figura 69. Tubo 3: Irradiación en caja de cultivo por 2 hrs. Células del género <i>Microcystis</i> observadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia tratadas con 20 μM de porfirina y radiación lumínica durante dos hrs	115

Figura 70. Tubo 4: Incubación en oscuridad durante 2 hrs. Células del género *Microcystis* observadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia tratadas con 20 μ M de porfirina y dos hrs de oscuridad **116**

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pigmentos fotosintéticos presentes en grupos algales	39
Tabla 2. Valores de la OCDE para un sistema de clasificación trófica	50
Tabla 3. Medio de crecimiento BG ₁₁ ^[121] para cianofíceas	54
Tabla 4. Solución stock de materiales traza.....	54
Tabla 5. Medio de crecimiento para clorofíceas. ^[122] <i>Solución A</i>	55
Tabla 6. Medio de crecimiento para clorofíceas. <i>Solución B</i>	55
Tabla 7. Medio de crecimiento para clorofíceas. <i>Solución C</i>	55
Tabla 8. Medio de crecimiento WC ^[123] para diatomeas	56
Tabla 9. Solución stock de materiales traza.....	56
Tabla 10. Solución de vitaminas	56
Tabla 11. Medio de crecimiento WC modificado ^[124] para dinoflagelados	57
Tabla 12. Solución stock de materiales traza.....	57
Tabla 13. Solución de vitaminas	58
Tabla 14. Medio de crecimiento F/2 ^[125,126] para algas rojas	58
Tabla 15. Solución stock de materiales traza.....	58
Tabla 16. Solución de vitaminas	59
Tabla 17. Muestras realizadas en el embalse de Río Tercero	80

GLOSARIO

SIG: Sistemas de Información Geográfica

Chl: Clorofila

TIF: técnica de inactivación fotodinámica

FS: fotosensibilizador

ROS: especies reactivas de oxígeno

OD: oxígeno disuelto

FAN: florecimientos algales nocivos

FBP: ficobiliproteínas

FC: ficocianina

FE: ficoeritrina

AFC: aloficocianina

EPA: ácido eicosapentaenoico

IC: conversión interna

ISC: cruzamiento entre sistemas

eT: transferencia de electrones

ET: transferencia de energía

eTF: transferencia de electrones fotoinducida

PS: fotosistemas

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

LED: diodo emisor de luz

OCDE: Organización de Cooperación Económica y Desarrollo

TSI: Índice Numérico del Estado Trófico de Carlson

DS: disco de Secchi

PT: fósforo total

TAPP⁴⁺: 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi)fenil] porfirina

DMF: *N,N*-dimetilformamida

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I-INTRODUCCIÓN

Una de las principales formas de caracterizar un sistema acuático es la determinación de su estado trófico. El término eutrofización designa al proceso que presentan algunos sistemas acuáticos dado el aumento del aporte de fósforo y nitrógeno desde la cuenca de drenaje, que se manifiesta en una intensa proliferación y acumulación extensiva de microalgas y plantas superiores.^[1] Siendo los ecosistemas acuáticos estructuras extremadamente complejas, el uso de la geoestadística, las técnicas de monitoreo remoto y los Sistemas de Información Geográfica (SIG) permiten predecir los efectos ambientales que pueden desencadenar la descarga de nutrientes.^[2,3,4,5,6,7,8]

En ecología acuática, los modelos de eutrofización son ampliamente utilizados. Estos permiten predecir el comportamiento de los reservorios, con el fin de comprender los patrones de funcionamiento, testear hipótesis y efectuar análisis prospectivos. La integración de sensores remotos, SIG y técnicas de modelación permitirían identificar satisfactoriamente patrones de cambios y poseen un enorme valor para el manejo de los recursos naturales.^[9,10,11,12]

El monitoreo a distancia de los recursos hídricos utilizando imágenes satelitales implica el análisis de la reflectancia especular y difusa originada por la superficie terrestre bajo radiación solar. Para embalses del centro del país se han realizado modelos de regresión lineal simple y múltiple a partir de los datos de reflectancia de las bandas 2 y 4 de LANDSAT 5TM y de los datos de concentración de clorofila *a* (Chl) *a*, obteniéndose las respuestas estimadas para los modelos propuestos y los mapas de distribución para dicha variable.^[13]

Sin embargo, los estudios antes mencionados no permiten discriminar poblaciones algales potencialmente tóxicas^[14] de enorme impacto ambiental y de riesgo para la salud.

Se ha demostrado que el análisis de los espectros de emisión/excitación de muestras problema de agua permite discriminar entre distintas especies de algas y

cuantificar sus poblaciones absolutas.^[15,16,17,18] En particular, haciendo uso del método de Beutler *et al.*^[19] se lograría la caracterización espectroscópica de los géneros de algas autóctonas presentes en un reservorio y la cuantificación de las poblaciones *in situ*. El monitoreo de un cuerpo de agua durante un plazo prolongado permitiría obtener datos estadísticamente significativos sobre la distribución espacial y temporal de los grupos algales, y su correlación con el monitoreo satelital permitiría obtener datos relevantes sobre el actual grado de eutrofización del reservorio en estudio.

Cabe notar que durante el proceso de eutrofización el mejor ejemplo de los cambios que se producen en un reservorio están representados por el comportamiento del fitoplancton, siendo las algas uno de los mejores indicadores de polución. El hombre interfiere intensamente en los ambientes acuáticos, el crecimiento de los centros urbanos y la ocupación sin planeamiento de las cuencas hidrográficas, que junto al desarrollo industrial y la expansión agrícola-ganadera llevan a un aumento del vertido de efluentes ricos en nutrientes. Una alta carga de nitrógeno y/o fósforo (N:P), determinan importantes cambios en la calidad de los cuerpos de agua. Estos se ponen en evidencia, fundamentalmente por la generación de floraciones de algas planctónicas y en particular de cianobacterias.^[20]

La técnica de inactivación fotodinámica (TIF) es utilizada actualmente para el control de fuentes de agua potable.^[21] El uso de la fotosensibilización para la producción de oxígeno singulete (estado excitado del oxígeno molecular o $^1\text{O}_2$) mediante energía solar permite el desarrollo de nuevas tecnologías limpias, basadas en energías renovables y aplicables a la desinfección de aguas.^[21] Así, se considera de gran importancia realizar estudios tendientes a controlar los florecimientos de algas potencialmente tóxicas en experimentos *in vitro* aplicando técnicas como la de TIF, basada en el dopaje de células que se quieren inactivar con un fotosensibilizador (FS), el cual tras irradiación con luz visible sea capaz de producir especies reactivas de oxígeno (ROS).^[22] Estas especies, pueden posteriormente afectar irreversiblemente la funcionalidad de las macromoléculas del sistema celular conduciendo a la inactivación de las células.

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

II-OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización espectroscópica de los géneros de algas autóctonas presentes en el embalse de Río Tercero de la Provincia de Córdoba desarrolladas en diferentes condiciones naturales y, simultáneamente cuantificar las poblaciones *in situ* y la concentración de Chl *a* total.

Realizar estudios de TIF tendientes a lograr el control poblacional de especies nocivas de cianobacterias en experimentos *in vitro*. Este procedimiento se basa en el dopaje de las células que se quieren inactivar con un FS que sea capaz de producir ROS bajo irradiación solar.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Cuantificar la composición de los pigmentos fotosintéticos del fitoplancton respecto de la biomasa de cianobacterias en aguas superficiales continentales.

➤ Aplicar técnicas de cultivo para permitir el crecimiento y lograr el mantenimiento de cepas de microalgas.

➤ Realizar un monitoreo sistemático del embalse de Río Tercero para evaluar las poblaciones algales presentes y variables como temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD), entre otras, y obtener así datos estadísticamente significativos sobre la distribución espacial y temporal de los grupos algales.

➤ Obtener información sobre el actual grado de eutrofización de este importante reservorio de agua y realizar comparaciones con datos existentes de años anteriores.

- Desarrollar estudios tendientes a lograr el control de las poblaciones algales, mediante la aplicación de métodos de TIF.

CAPÍTULO III
ANTECEDENTES

III-ANTECEDENTES

III.1. MICROALGAS

III.1.1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas pertenecen a un grupo de organismos de morfologías heterogéneas que viven en suspensión en un ambiente acuático y constituyen la fracción planctónica del ecosistema. Su principal propiedad es la realización del proceso de fotosíntesis, por lo cual también se denominan productores primarios, presentando además la capacidad de incorporar oxígeno disuelto al medio que habitan. Dentro de este amplio grupo también se encuentran muchas formas heterótrofas, auxótrofas y formas no pigmentadas.

La incorporación de oxígeno participa, no sólo en optimizar los procesos de respiración de la biota acuática, sino también en incrementar el O_2 necesario para la oxidabilidad de la materia orgánica incorporada al medio por procesos autóctonos y halóctonos, contribuyendo a la autodepuración del ecosistema y a la mecánica de los fluidos, ya sea en un medio abierto o sistema lótico de aguas corrientes, así como en un medio cerrado o sistema lenítico produciendo estratificaciones permanentes o no.^[23]

Estos organismos se ubican dentro de los grupos procariontes y eucariontes. La mayor variedad de algas se encuentra de manera permanente o semi-permanente en lagos, reservorios, estanques, pantanos, ríos, arroyos y canales.^[24]

Pudiendo ser unicelulares o multicelulares,^[25,26] formadoras de colonias, cenobios o filamentos; el movimiento se realiza por simple flotabilidad, ya sean



formas flageladas o no. Las migraciones verticales permiten responder a ciclos vitales como también, y más frecuentemente, lograr la ubicación en la zona fótica para la subsistencia.

Teniendo en cuenta el tamaño, las formas planctónicas presentan un rango de dimensiones que va desde unos pocos micrómetros (entre 1 a 150 μm) hasta aproximadamente 500 μm alcanzando a veces 1 mm.^[27]

De gran importancia en la historia de vida de las algas es su gran capacidad para sobrevivir períodos en que los factores ambientales se tornan desfavorables para su crecimiento y las estrategias que utilizan para mantenerse como “inóculo” potencial cuando retornan las condiciones favorables. Esto se manifiesta de manera diferente mediante estrategias demográficas, nutricionales y/o de reproducción entre los distintos grupos taxonómicos.^[27]



Figura 1. Floración de microalgas

Ciertas condiciones ambientales como temperaturas elevadas, alta carga de nutrientes, baja relación N:P, posibilitan la formación de densas poblaciones algales. Esta proliferación o desarrollo masivo se conoce como “floración” o *bloom*. Cuando se trata de algas productoras de toxinas (florecimientos algales nocivos -FAN) pueden causar daños y ser letales a los demás organismos que cohabitan. Un hecho bien conocido durante el desarrollo masivo de estas algas es la competencia por el oxígeno disuelto provocando la muerte de peces y desaparición de otras especies u organismos.^[28,29]

Los FAN son causados por diversos microorganismos y algunas especies pueden ser nocivas incluso a bajas densidades, es decir, sin llegar a formar “blooms” ó producir cambios de coloración aparente en las masas de agua que pueden presentarse como rojo, verde, ocre o amarillo, haciendo evidente su presencia (**Figura 1**).^[30,31] En general, los FAN son percibidos como dañinos por el hombre debido a sus efectos adversos en el ambiente; repercutiendo

directamente en la salud humana, en las actividades de acuicultura, recreación y turismo; por lo que el estudio de la problemática vinculada a estos fenómenos ha adquirido gran relevancia.

Algunas especies de microalgas que producen cambios en la coloración en las masas de agua son básicamente inocuas, mientras que otras especies son capaces de producir poderosas toxinas que se transfieren a través de las redes tróficas para ser consumidas finalmente por el hombre, provocando diversas enfermedades gastrointestinales y neurológicas.^[32,33,34] Algunas especies algales, pueden producir toxinas en baja concentración. Sólo en estado de desarrollo masivo podrían ser tóxicas a la biota y perjudiciales para la salud.^[31,32]

En un cuerpo de agua dulce natural es común la existencia de distintos grupos de algas que co-habitan dentro de un dinamismo propio del ecosistema, por ejemplo cianofitas, clorofitas, diatomeas, dinofitas. Estos mismos grupos también proliferan en ambientes marinos donde la primacía la constituye la presencia de rodofitas y feofitas.^[35]

III.1.2. CIANOFICEAS

Las Cyanobacteria, Cyanophyta, Cyanoprokaryota o algas verde azules son organismos autótrofos que realizan fotosíntesis con liberación de oxígeno al igual que las plantas superiores. Se encuentran entre los seres vivos más primitivos cuyo origen se estima en unos 3500 millones de años, desde el surgimiento de la vida en la tierra.^[28]

Este grupo comprende microorganismos con gran variabilidad morfológica, presentan tamaños aproximados desde 0.5 μm , similar

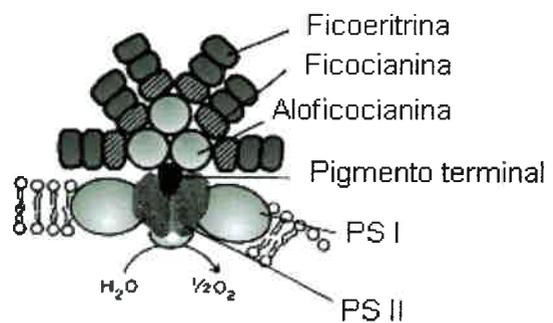


Figura 2. Estructura de un ficobilisoma

al de las bacterias, hasta 40 μm . Pueden ser unicelulares o pluricelulares. En el cromoplasma (citoplasma) se encuentran los pigmentos fotosintéticos: Chl *a*, carotenos, xantofilas y ficobiliproteínas (FBP) como ficocianina (FC), ficoeritrina (FE) y aloficocianina (AFC), agrupados en ficobilisomas, los cuales están asociados a los tilacoides (**Figura 2**).^[36]

Frente a la deficiencia de nutrientes, las cianofíceas han desarrollado una estrategia particular que las capacita para fijar nitrógeno atmosférico, lo que favorece su crecimiento masivo en ambientes con baja relación N:P.^[23] Este proceso ocurre, básicamente en estructuras especializadas denominadas heterocistos, los cuales se forman a partir de células vegetativas.^[27,37]

La mayoría presentan un metabolismo fotoautotrófico, aeróbico y microaeróbico. Su ciclo vital sólo requiere agua, CO_2 , sustancias inorgánicas y luz, lo que les permite crecer en medios muy simples.^[38] La fotosíntesis es su principal modo de metabolismo energético, aunque se conoce que algunas especies pueden sobrevivir por largos períodos en total oscuridad. Además ciertas cianofíceas muestran habilidad para su nutrición heterotrófica.^[39]

Presentan hábito planctónico y se las suele encontrar epífitas a otras algas o sustratos sumergidos. La energía producida por la fotosíntesis es transferida a otros organismos a través de las redes tróficas. A su vez esta energía, como también el oxígeno disuelto, contribuye a la oxidación de sedimentos y/o sustratos minerales.^[28]

Son ubicuarias y cosmopolitas encontrándose también en ambientes extremos: aguas termales, nieve o desiertos. Los ecosistemas de agua dulce son los ambientes con mayor riqueza específica e incluso la mayor diversidad de

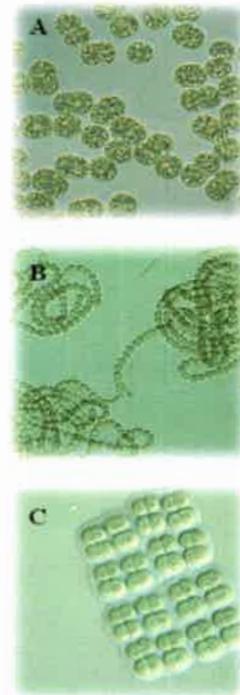


Figura 3. Cianobacterias
 A. *Microcystis aeruginosa*
 B. *Anabaena spiroides*
 C. *Merismopedia glauca*

adaptaciones al medio, encontrando organismos libremente flotantes formando parte del fitoplancton; adheridos a sustratos vegetales o formando parte del fitobentos e incluso a sustratos inorgánicos (bioderma).^[28]

Los *blooms* o FAN de cianofitas afectan la calidad del agua, los recursos pesqueros, animales y la salud humana. Alteran el equilibrio acuático y las redes tróficas, producen excesiva biomasa, inhiben la capacidad fotosintética de otras algas por el sombreado, producen hipoxia afectando a otros organismos consumidores por la escasa disponibilidad de oxígeno para la respiración. Estos fenómenos ejercen un fuerte impacto sobre la economía humana ya que provocan la disminución del aprovechamiento del ecosistema acuático por interferir con su posible uso recreacional, balneación, pesca, actividades deportivas o para consumo humano mediante su potabilización.^[28]

El desarrollo masivo de cianofíceas generalmente va acompañado de efectos organolépticos negativos, a consecuencia de la producción de metabolitos secundarios secretados al medio conjuntamente con cianotoxinas. Estos son compuestos que actúan como hormonas, antibióticos y toxinas no utilizados por el organismo en su metabolismo primario.^[40]

Las cianofíceas más difundidas son las especies productoras de hepatotoxinas, responsables de la mayor parte de casos de intoxicación en el mundo. Los géneros señalados en la bibliografía mundial como potencialmente tóxicos son: *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, entre otros.^[28]

El género *Microcystis*^[41] (**Figura 4**) está constituido por especies formadoras de colonias micro a macroscópicas, esféricas, ovoides a irregulares; algunas colonias clatradas. Poseen una vaina general mucilagínosa, incolora, desde homogénea a lamelada. Las células pueden ser esféricas a hemisféricas luego de la división celular,

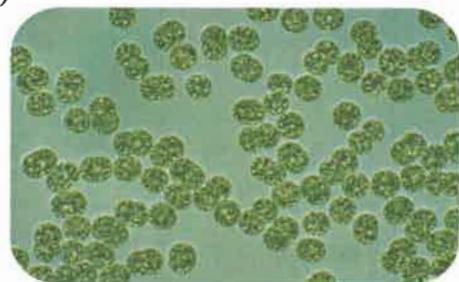


Figura 4. *Microcystis aeruginosa*

sin vaina propia, con o sin vacuolas gaseosas. Se dividen por fisión, la reproducción es por simple división celular y el aumento en tamaño de la colonia produce fragmentaciones favoreciendo su dispersión en el medio acuático.

Microcystis aeruginosa presenta una envoltura celular (Figura 5 y Figura 6) constituida por una vaina externa mucilaginosa o membrana externa, una pared celular que protege los

contenidos de la célula, da rigidez a la estructura, funciona como mediadora en todas las relaciones de la célula con el entorno y actúa como compartimiento celular; y una membrana plasmática que puede presentar invaginaciones o mesosomas.^[42]

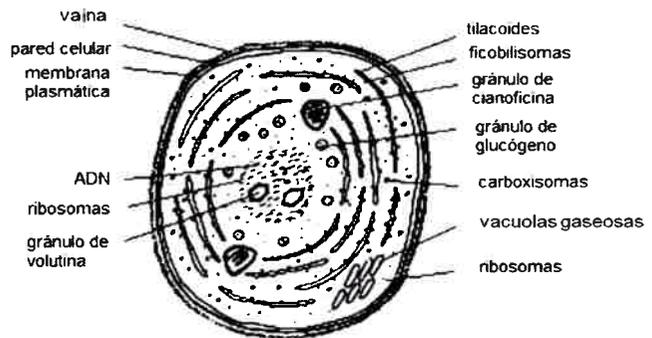


Figura 5. Esquema de una célula de *Microcystis aeruginosa*

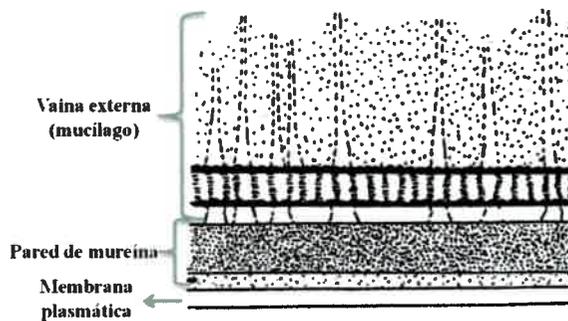


Figura 6. Estructura envoltura celular

La vaina mucilaginosa externa es rica en mucopolisacáridos y actúa como medio para evitar la deshidratación. La pared celular presenta una estructura semejante a la de bacterias Gram-negativas, se caracteriza por presentar una sustancia particular, la mureína, un mucopolímero cuyas moléculas

forman una red por debajo de la vaina. La membrana plasmática es una bicapa lipídica que delimita la célula. Es una estructura laminada formada por fosfolípidos, glicolípidos y proteínas las cuales tienen como función delimitar las células en organismos unicelulares y generar conexiones plasmáticas por medio de plasmodesmos intercelulares en las formas pluricelulares. La membrana rodea, delimita, da forma y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio

intracelular) y el exterior (medio extracelular) de las células. Regula la entrada y salida de ciertas sustancias entre el citoplasma y el medio extracelular.^[42]

El protoplasma (citoplasma) se encuentra separado en cromoplasma (periférico y pigmentado) y centroplasma (central, granuloso e incoloro). El centroplasma o nucleoplasma contiene el ADN que puede aparecer en forma de pequeños gránulos.^[42]

En aguas altamente eutrofizadas, los organismos tóxicos o grupos FAN incrementan la probabilidad de generar una mayor concentración de toxinas admitidas por la OMS. Es importante un monitoreo continuo a fin de controlar el desarrollo de estas especies o poblaciones.

Los resultados reportados indican que la ocurrencia de microcistinas y anatoxina *a* es altamente probable cuando los géneros productores de toxinas están presentes. Las especies toxigénicas como *M. aeruginosa* (con producción de microcistinas) son ampliamente conocidas al igual que su distribución a nivel mundial. Normalmente las toxinas más difundidas son las hepatotoxinas y neurotoxinas con efectos desde leves a severos así como también las dermatoxinas.^[43]

III.1.3. CLOROFITAS

Las algas verdes (**Figura 7**) son organismos eucariotas fotosintéticos con plástidos que presentan doble membrana y que contienen Chl *a* y *b* y pigmentos accesorios como β -caroteno y xantofilas^[44,45,46,47] que ofrecen protección contra la oxidación fotoquímica y la dispersión de la energía en exceso.^[48] El almidón de asimilación se almacena en el interior del cloroplasto asociado al pirenoide. La pared celular está compuesta por dos capas, la externa dispuesta en micelas de microfibrillas celulósicas (en algunos casos presenta además otros polímeros o impregnaciones cálcicas) y la interna, amorfa, con hemicelulosa y sustancias pécticas. En algunos casos presenta además otros polímeros o está calcificada.^[49]

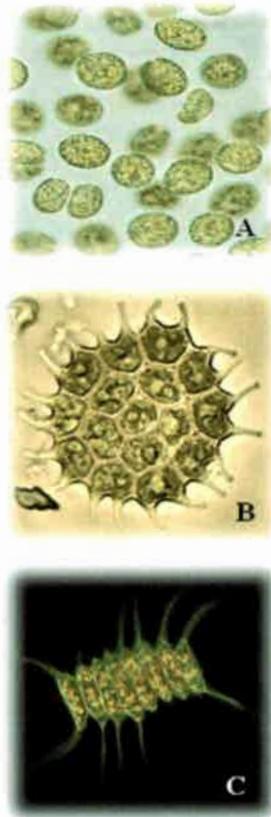


Figura 7. Clorofitas

A. *Chlorella fusca*

B. *Pediastrum boryanum*

C. *Scenedesmus spinosus*

En su mayoría son microscópicas, de diversa morfología y organización general, tienen gran plasticidad en su desarrollo y metabolismo, por lo que han colonizado numerosos hábitats.^[50]

El 90% de las algas verdes forman parte del plancton o del bentos de aguas dulces y en ambientes marinos costeros forman parte del fitoplancton y del bentos litoral y/o intertidal. Existen especies que crecen en suelos desérticos, donde soportan largos períodos de desecación y temperaturas extremas,^[51,52] así como especies psicrófilas que viven con temperaturas óptimas por debajo de los 10°C.^[45]

Las especies pertenecientes al género *Chlorella* (Figura 7), orden Chlorococcales, se caracterizan por ser unicelulares e inmóviles,^[53,54,55] con uno a dos cloroplastos. En ambientes óptimos, la división celular es activa generando agregados celulares, característico de este género lo que facilita su identificación.^[56,57]

Al igual que otros géneros, *Chlorella* se identifica por el desarrollo masivo en los hábitats donde se encuentra, cuando la población aumenta de manera brusca provoca descenso del oxígeno disponible necesario para otras formas de vida acuáticas.^[58]

Por otro lado, el género *Chlorella* es un importante productor primario con diversas funciones en el hábitat donde se encuentra: fuente de alimento para otros organismos acuáticos, bioindicador, se utiliza en el tratamiento de aguas residuales, en la producción de compuestos químicos y en agricultura.^[50]

III.1.4. DIATOMEAS

Este grupo de algas doradas (**Figura 8**) eucariotas perteneciente a la clase Bacillariophyceae, está integrado por organismos unicelulares autótrofos, si bien algunos pueden ser heterótrofos facultativos, que presentan cloroplastos en los que se encuentran Chl *a* y *c* y pigmentos accesorios como β -caroteno y fucoxantina (xantofila).^[18] Los pigmentos carotenoides enmascaran el color verde de las clorofilas, confiriéndoles un color que va del verde amarillento al amarillo pardusco.^[59]

La sustancia de reserva comúnmente encontrada en las diatomeas es la crisolaminarina, polímero β 1-3 glucano, junto con otros carbohidratos, volutina y polifosfatos. Roessler^[60] ha reportado que los lípidos derivan en parte de la sustancia de reserva asimilada recientemente y de ese polisacárido en forma de material no lipídico. Los cuerpos lipídicos se observan en el citoplasma en forma de gránulos bien definidos. Su principal función en los ambientes marinos o cuerpos de agua muy profundos es realizar movimientos migratorios verticales con el objetivo de encontrar condiciones óptimas de desarrollo.

Pueden formar agregados celulares en forma de cadena como *Melosira varians* y *Aulacoseira granulata*. Un carácter distintivo de este grupo es la presencia de una pared celular fuertemente silificada denominada frústulo.^[61]

Dentro de este grupo existen especies que suelen ser indicadoras de determinadas condiciones ambientales (pH, concentración de sales, oxígeno, etc.). Estos organismos desempeñan, además, un relevante papel en las redes tróficas acuáticas y en la autodepuración de los cursos de agua siendo también importantes bioindicadores de la salud biológica del ecosistema.^[61,62] Son las algas más utilizadas en todo el mundo para el biomonitoreo de ambientes actuales y fósiles.

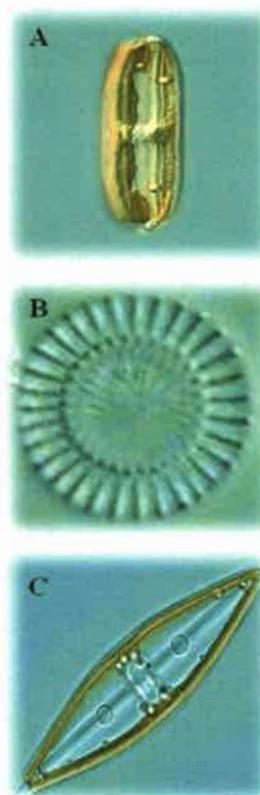


Figura 8. Diatomeas

A. *Pinnularia viridis*

B. *Cyclotella meneghiniana*

C. *Navicula rhynchocephala*

Estas algas son abundantes en el fitoplancton y en sedimentos de ecosistemas de agua dulce.^[63] Su éxito radica en su adaptabilidad y en su elevada tasa de reproducción.^[64] Son muy resistentes a la acción de diversos factores, incluso a altas temperaturas, pero son muy sensibles a la polución, especialmente al N y P. Pueden tolerar amplios rangos de pH, nutrientes, contaminantes orgánicos e inorgánicos.^[23,58]

El género *Cyclotella* (**Figura 8**) está integrado por especies varias especies de agua dulce, ya sea en ambientes lénticos (lagos y lagunas) como también lóticos (ríos).^[56] Este género se caracteriza por presentar valvas circulares, con margen estriado y zona central con presencia de dos a tres poros o rimoportulas. En su interior se encuentran numerosos plástidos discoides.^[65]

III.1.5. DINOFLAGELADOS

Los dinoflagelados (**Figura 9**) corresponden a un extenso grupo del fitoplancton y forman parte de la clase Dinophyceae, en la cual predominan formas unicelulares autótrofos, con cromatóforos pardo amarillentos y formas heterótrofas, que pueden alimentarse de sustancias orgánicas disueltas por consumo del ultraplancton (bacterias) o por franca predación o parasitismo. Cada célula presenta dos flagelos heteromórficos y heterodinámicos.

Pueden ser parásitos de otras especies dentro del mismo género, como así también de diatomeas, protozoos, celenterados y copépodos. Presentan Chl *a* y *c*, α y β caroteno, xantofilas, peridinina y dinoxantina. La peridinina constituye el 70% de los carotenoides totales. Como sustancias de reserva poseen almidón y lípidos, su pared celular rígida posee teclas de celulosa formadas por placas, que se mantienen unidas por un cemento, en algunos casos muy notorio. El número, tamaño y disposición de las placas presentan valor taxonómico.^[18,20,37,66]

Este grupo está constituido por algas principalmente marinas, si bien existen de agua dulce. Su tamaño fluctúa entre 20 y 500 μm , por lo que se les ubica dentro del microplancton, aunque algunas pueden alcanzar hasta 2 mm de diámetro.^[67]

En el citoplasma de los dinoflagelados se encuentran orgánulos como aparato de Golgi, mitocondrias, gránulos de lípidos, almidón, vacuolas no pulsátiles típicas denominadas púsula relacionadas con la osmoregulación, vacuolas alimenticias y estigma, orgánulo sensible a la luz que les permite realizar movimientos de fototaxismo.^[18,37,66]

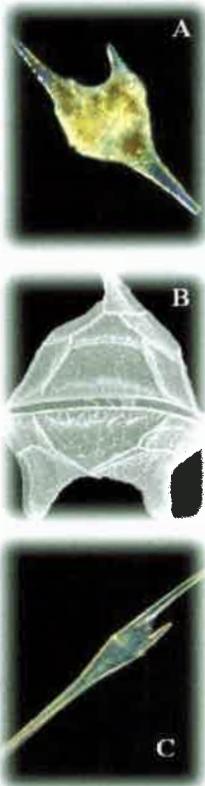


Figura 9. Dinoflagelados
 A. *Ceratium hirundinella*
 B. *Peridinium limatum*
 C. *Ceratium furca*

Las distintas combinaciones de pigmentos les proporcionan una coloración amarilla, pardo rojiza o parda. Los pirenoides se encuentran junto al cloroplasto y en ellos se almacena almidón y grasas. Los cloroplastos de la mayoría de los dinoflagelados fotosintéticos están rodeados por tres membranas, lo que otorga consistencia a la teoría endosimbionte.^[18,37]

Sus características morfológicas y requerimientos nutritivos los hacen exitosos desde el punto de vista reproductivo y de crecimiento en aguas tropicales, donde la estabilidad en la columna de agua es mayor y la concentración de nutrientes más baja.^[67] Sus poblaciones

se distribuyen en función de la temperatura, salinidad y profundidad. Alrededor de la mitad de los dinoflagelados son fotosintéticos y constituyen el grupo más grande de algas eucariontes aparte de las diatomeas.^[37,66]

Puesto que son productores primarios, constituyen una parte importante de la red trófica acuática. Algunos géneros son responsables de las mareas rojas y de la presencia de toxinas. El fenómeno de enrojecimiento de las aguas o hemotalasia es el resultado de una gran concentración local, sobre todo en aguas tranquilas, de diversos organismos pero con más frecuencia de dinoflagelados. Existen algunas especies no coloreadas que pueden también formar floraciones tóxicas, tales como *Gymnodinium catenatum* y *Gonyaulax catenella*. Por el contrario, no todas las

floraciones de dinoflagelados son peligrosas, por lo tanto hay un gran interés en la biología de estos organismos por motivaciones económicas y médicas.^[18,37]

Ceratium (**Figura 9**) es un género de protistas fitoflagelados de la clase Dinophyceae, orden Peridinales, familia Ceratiaceae. Las especies que integran este género son unicelulares, biflageladas. Generalmente son fotosintéticas aunque también hay formas heterótrofas. Poseen como pigmentos Chl *a* y *c* y β -xantofilas, peridinina, neoperidinina, dinoxantina, neoxantina y diamantina. Presentan como sustancia de reserva almidón y lípidos.^[37,68,69]

Ciertas especies de dinoflagelados como *Mesodinium rubrum* producen neurotoxinas en tales cantidades llevando a la muerte de peces y se acumulan en los animales filtradores, tales como los crustáceos y moluscos provocando graves problemas en la salud biológica del ecosistema y en el hombre.^[37,66]

III.1.6. RODOFITAS

Comúnmente conocidas como algas rojas (**Figura 10**), son principalmente marinas y constituyen la mayoría de las “plantas” marinas. Suelen encontrarse en mares cálidos, menos del 2% de las especies son formas de agua dulce y crecen adheridas a rocas u otras algas. Son organismos autótrofos pluricelulares, su color se debe a la presencia de pigmentos ficobilínicos: FE y FC que enmascaran el color de la Chl.

Las algas rojas pueden crecer a mayores profundidades que otras algas debido a que la presencia de estos pigmentos ficobilínicos les permiten realizar fotosíntesis a mayores profundidades. En los mares tropicales suelen encontrarse a profundidades cercanas a los 200 metros. Contienen Chl *a* y *d* como así también carotenoides, poseen pigmentos ficobilínicos en los tilacoides y ausencia de almidón en los cloroplastos.

Es un grupo de 5.000 a 6.000 especies de gran diversidad de formas y tamaños. Se caracterizan por la ausencia de células flageladas, como material de reserva poseen un α -poliglucano conocido como almidón de florídeas.^[70,71]

Su ecosistema va desde zonas intermareales hasta zonas muy hondas, si bien son más abundantes en lugares profundos. Su hábitat varía en función de la transparencia y la amplitud térmica del agua.^[70,71]

Las paredes celulares incluyen celulosa en su capa interna y carbohidratos mucilaginosos en su capa externa, de los que se obtiene el agar y carrageno. Además ciertas especies pueden acumular calcio en sus paredes externas, dando lugar a las algas coralinas que desempeñan un papel importante en la construcción de los arrecifes de coral, siendo estas utilizadas en agricultura para disminuir la acidez de los suelos agrícolas.^[70,71]

El carrageno y el agar son utilizados comercialmente y en la industria farmacéutica como espesantes de salsas, helados y gelatinas.

El género *Porphyridium* (Figura 10) está integrado por especies de microalgas rojas, pertenecientes a la familia Porphyridiaceae.^[37] Sus células se caracterizan por ser esféricas, de unos 5-7 µm de diámetro, sin pared celular y presentan un cromatóforo de color rojo muy vivo con un pirenoide central.

Se caracteriza por acumular grandes cantidades de ácidos grasos, que llegan a alcanzar entre el 9 y el 14% del peso seco, especialmente el ácido araquidónico (36% del total de los ácidos grasos), y cantidades considerables de ácido eicosapentaenoico (EPA, o también ácido icosapentaenoico). El contenido proteico está en el rango del 28 al 39%, y los carbohidratos disponibles varían entre un 40 y un 57%. La biomasa contiene tocoferol, vitamina K y una gran cantidad de carotenos.^[72]

Una propiedad característica del género *Porphyridium* es que sus células son capaces de excretar un polisacárido sulfatado, un heteropolímero ácido

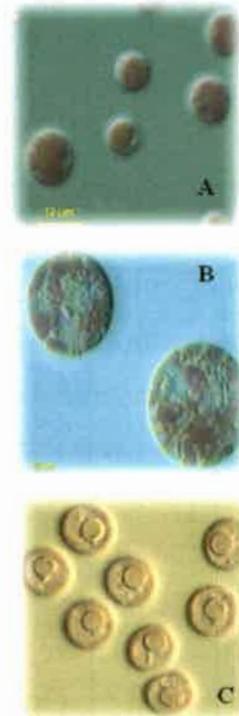


Figura 10. Rodofitas
 A. *Porphyridium cruentum*
 B. *Rhodella maculata*
 C. *Rhodosorus marinus*

compuesto por xilosa, glucosa, galactosa y ésteres de sulfato.^[73] Este polisacárido es de gran importancia dado que puede ser usado comercialmente como espesante, estabilizante y emulsionante.^[74,75,76] Este género se caracteriza por la capacidad que presenta de formar agregados sobre otras algas.^[77]

III.2. CURVAS DE CRECIMIENTO

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en número de células (células/ml), peso seco, cantidad de proteína, pigmentos, volumen de las células y/o carbono celular total, en un período de tiempo o en una fase de crecimiento determinados.

La curva del crecimiento (**Figura 11**) es una representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación.

Para cuantificar el crecimiento se necesita saber la velocidad de crecimiento tomando en consideración el cambio en el número de células por unidad de tiempo.

Una curva de crecimiento se divide básicamente de cuatro fases.^[78,79,80]

1- *Fase de latencia*: es la primera fase de crecimiento del cultivo y se presenta cuando al inocular las microalgas al medio, a menudo no se registra un incremento en el número de células. Esta fase puede tardar varios días dependiendo del tamaño y del estado del inóculo.

2- *Fase exponencial*: etapa en la que la densidad de las microalgas aumenta de manera exponencial. Esta fase suele presentarse al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse por varios días hasta semanas.

3- *Fase estacionaria*: se produce una disminución en la velocidad de reproducción de las células, debido al agotamiento de nutrientes del medio ocasionado por el crecimiento del cultivo, dando como consecuencia que el número de microalgas permanezca sin cambio.

4- *Fase de muerte*: ocurre cuando se incrementa el número de células muertas por las condiciones desfavorables, provocando así que aumente el número de bacterias, hongos y espuma, producto de la destrucción celular, generando el colapso total del cultivo.

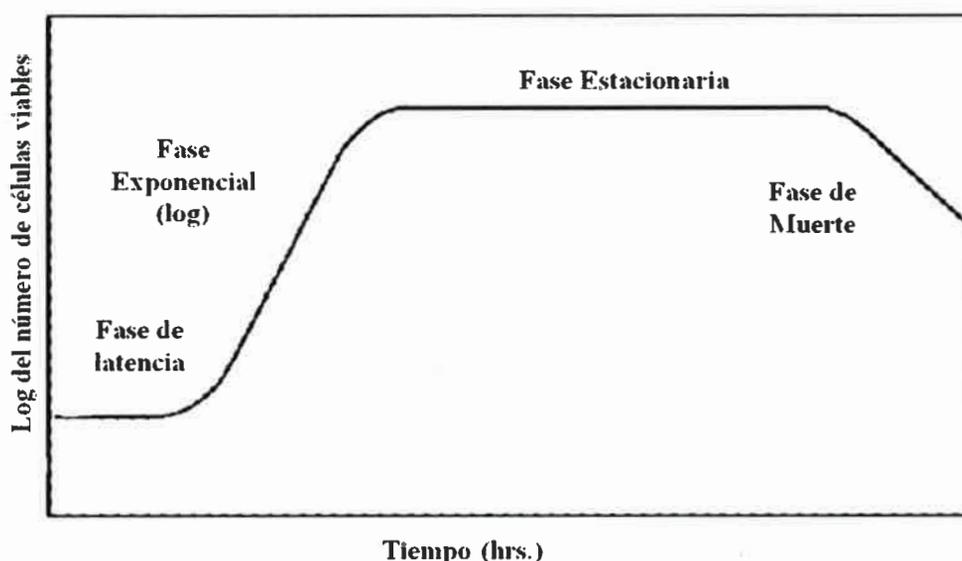


Figura 11. Curva de crecimiento microbiano

III.3. FUNDAMENTOS DE TÉCNICAS. ESPECTROSCOPIAS ULTRAVIOLETA (UV) -VISIBLE Y DE EMISIÓN

III.3.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE

Se denomina espectrofotometría al conjunto de técnicas que posibilitan determinar la cantidad de energía radiante absorbida por un sistema en función de la longitud de onda (λ) de la radiación. En el marco de la teoría corpuscular/ondulatoria de la luz, un haz lumínico es un flujo de cuantos de energía llamados fotones. Los fotones poseen una cantidad definida de energía la cual puede calcularse de acuerdo a:

$$E = h c / \lambda$$

donde h representa la constante de Planck, c la velocidad de la luz y λ la longitud de onda asociada al fotón.^[81,82,83]

III.3.1.1. TRANSMITANCIA

La **Figura 12** muestra un haz de radiación antes (I_0) y después (I) de atravesar una solución de una sustancia absorbente (absorbato) de concentración c , contenida en una celda de espesor l cm. Como consecuencia de las interacciones entre los fotones y el absorbato, la potencia del haz es atenuada. La transmitancia (T) de la solución se define como:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

La absorbancia (A) y la T de la solución están relacionadas mediante la siguiente ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$$

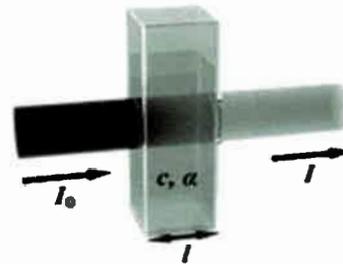


Figura 12. Representación esquemática del principio de absorción

Medición de la Transmitancia y Absorbancia de una muestra

Los espectros de absorción UV-visible de los sistemas de interés se obtienen usando espectrofotómetros. Para la determinación de espectros de absorción de muestras líquidas, generalmente la solución del absorbato es colocada en una celda transparente (vidrio, cuarzo, etc.). Como se explicó anteriormente, la A de la muestra se obtiene comparando la intensidad del haz incidente I_0 con el emergente (I). Parte de la radiación incidente es absorbida (I_a) y el resto transmitida, pudiendo

haber pérdidas por dispersión y reflexión del haz incidente en la solución (**Figura 12**). Para compensar estos efectos, la potencia del haz transmitido por la solución del analito es comparada con la potencia del haz transmitido por una celda idéntica que contiene solamente solvente. ^[81,82,83,84]

Aspectos cuantitativos de las mediciones de Absorción

La ley de Lambert y Beer

La absorbancia A de una muestra es directamente proporcional al largo del camino l que la luz tiene que atravesar, a la concentración c de la especie absorbente y la naturaleza de la misma. Esto es:

$$A = alc$$

Siendo a una constante de proporcionalidad llamada *coeficiente de absortividad*. La magnitud de a dependerá de las unidades empleadas para l y c . A menudo l es dada en términos de cm y c en moles por litro, entonces a tiene unidades de $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En tales casos, el coeficiente de absortividad se denomina *coeficiente de absortividad molar*, se lo designa como ε y tiene unidades de $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, entonces la absorbancia se define por la ley de Lambert y Beer:

$$A = \varepsilon l [c]$$

Donde:

ε : constante de proporcionalidad que depende de la naturaleza del absorbente y de la λ del haz de luz incidente,

l : camino recorrido por la luz o espesor de la celda (cm),

$[c]$: concentración molar de la especie absorbente (M).

La representación de A en función de λ es una función continua que muestra generalmente máximos y mínimos. Dicha representación es conocida como el espectro de absorción de la sustancia estudiada.

Para verificar el cumplimiento de la ley de Lambert y Beer, se debe realizar una curva de calibración, para ello se preparan soluciones de la sustancia de concentraciones conocidas y se mide A a la λ elegida. Finalmente se realiza una representación de A en función de $[c]$. De verificarse la ley de Lambert y Beer para la sustancia en el rango de concentraciones estudiadas, la relación debe ser lineal. En algunas ocasiones se observan desviaciones de la linealidad debido a procesos de auto-asociación de la especie absorbente o a problemas instrumentales.^[81,82,83,84]

III.3.2. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN

Se denomina espectroscopia de emisión a un conjunto de técnicas usadas para analizar la fluorescencia (o fosforescencia) de una muestra. La fluorescencia es un proceso de interés analítico debido a su particular sensibilidad y amplia aplicabilidad.^[81,82,83,84] La Figura 13 muestra un típico diagrama de Jablonski. Tras la excitación de una molécula por absorción de radiación electromagnética (1), un electrón es promovido desde un orbital de enlace (generalmente el HOMO) al orbital de anti-enlace de menor energía (LUMO).

Este proceso lleva a la formación del estado excitado singlete de la molécula ($^1S^*$) a partir del estado fundamental de la misma (0S).^[81,82,83,84] El tiempo de vida (τ_0) del singlete excitado es generalmente corto debido a la existencia de múltiples vías de desactivación (o relajación) del mismo. La molécula excitada puede volver a su estado fundamental a partir de una combinación de procesos radiativos y no-radiativos.

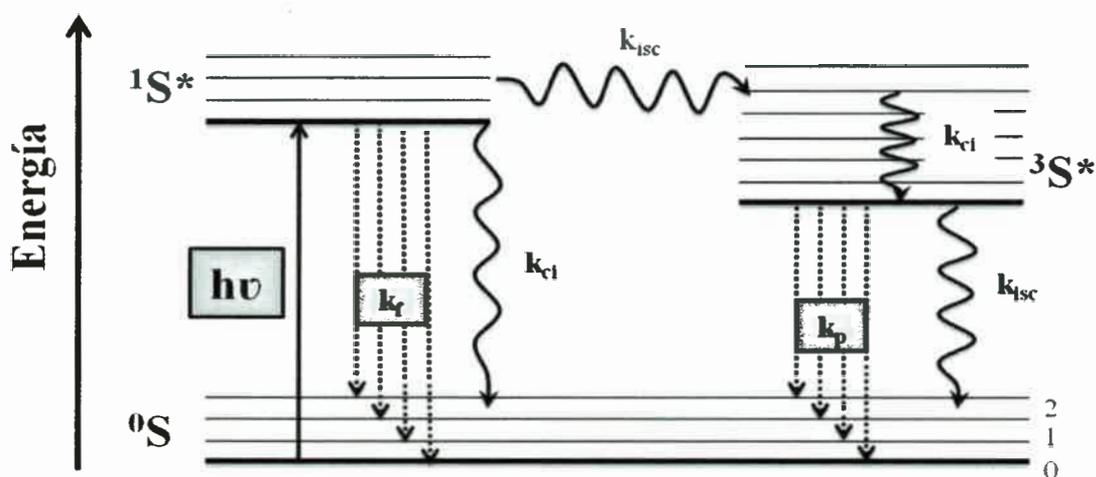


Figura 13. Diagrama de Jablonski y procesos de relajación de los estados excitados

En el proceso radiativo (o fluorescencia) el exceso de energía en $^1S^*$ es disipado en parte como calor y en parte como radiación electromagnética; esto es, por emisión de un fotón. En los procesos no-radiativos el exceso de energía es disipado como calor. El proceso de conversión interna (CI) lleva directamente a la formación del estado fundamental del sistema; mientras que el proceso de cruzamiento entre sistema (ISC) lleva a la formación del triplete excitado ($^3S^*$). El estado triplete decae finalmente a través de procesos radiativos (fosforescencia) y no-radiativos (ISC). Los procesos entre sistemas (entrecruzamiento singulete/triplete o vice-versa) son prohibidos por spin. Este fenómeno hace que el decaimiento de $^3S^*$ sea generalmente mucho más lento que el de $^1S^*$.

Los procesos de fluorescencia, CI y ISC son rutas competitivas de la relajación del $^1S^*$. Estos procesos están caracterizados por constantes específicas de velocidad: k_f , k_{ci} y k_{isc} ; respectivamente, cuyas magnitudes dependen del sustrato estudiado y de otros factores tales como el medio, la temperatura, etc. Una molécula altamente fluorescente está caracterizada por: $k_f \gg k_{ci} + k_{isc}$.

Existen diversas maneras de definir el concepto de: “rendimiento cuántico de fluorescencia (φ_f)” de un molécula. Desde el punto de vista experimental, este se define como el cociente entre la velocidad de emisión de fotones (I_f) y la velocidad de absorción de radiación electromagnética (I_a) de la muestra, según:

$$\varphi_f = \frac{I_f}{I_a}$$

Desde el punto de vista teórico, puede demostrarse fácilmente que φ_f viene dado por^[85]:

$$\varphi_f = k_f \tau_0$$

donde k_f es la constante específica de fluorescencia y τ_0 es el tiempo de vida del estado excitado: $\tau_0 = 1/(k_f + k_{ci} + k_{isc})$. Así, si: $k_f \gg k_{ci} + k_{isc}$, el φ_f se aproxima a la unidad. Por otro lado, no es posible observar fluorescencia de la molécula ($\varphi_f \sim 0$) si los procesos no-radiativos compiten favorablemente con k_f . En forma similar, puede definirse el rendimiento cuántico de formación de tripletes (rendimiento cuántico de cruzamiento entre sistemas) y el rendimiento cuántico de conversión interna de acuerdo a: $\varphi_{isc} = k_{isc} \tau_0$ y $\varphi_{ci} = k_{ci} \tau_0$, respectivamente.

Efecto de la concentración de analito en la intensidad de fluorescencia de una muestra

Reordenando la ecuación utilizada para definir el φ_f se obtiene:

$$I_f = \varphi_f I_a$$

Lo que indica que la intensidad de fluorescencia (I_f) de una muestra es directamente proporcional al rendimiento cuántico de emisión y al número de fotones absorbidos por unidad de tiempo (I_a).

Dado que:

$$I_a = I_0 - I$$

substituyendo por

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Así tenemos:

$$I_f = \varphi_f (1 - 10^{-A})$$

donde A es la absorbancia de la solución. Para soluciones diluidas, el término exponencial puede simplificarse para dar:

$$I_f \cong \varphi_f A = \varphi_f \varepsilon b [c]$$

donde $[c]$ es la concentración de la especie fluorescente y ε es el coeficiente de absortividad molar a la λ de excitación. De la ecuación anterior se concluye que I_f es directamente proporcional a la concentración del analito en el intervalo de concentraciones bajas. Cuando $[c]$ aumenta lo suficiente para que la absorbancia sea mayor que 0.05, se pierde esta relación lineal y I_f tiende a alcanzar una meseta con la concentración. Este efecto se conoce como *efecto de filtro interno por absorción primaria*.

En la práctica, la intensidad de emisión es determinada como una corriente en el fotodetector del fluorómetro (en unidades arbitrarias), por lo que la dependencia de I_f con la $[c]$ se escribe como:

$$I_f = c' [c]$$

donde c' es una nueva constante de proporcionalidad que depende de las condiciones experimentales escogidas (λ de excitación y emisión, ancho de slits, temperatura, etc.). Sin embargo, si se cuida que todas estas condiciones sean idénticas, la relación lineal entre I_f y $[c]$ sigue siendo observada (a bajas concentraciones del fluoróforo). Este concepto es importante porque permite utilizar la técnica de fluorescencia como herramienta analítica.^[83]

Instrumentación

Los instrumentos utilizados para medir la fluorescencia se denominan fluorímetros o fluorómetros (**Figura 14**). En esta técnica se utiliza un haz de luz para generar un estado excitado de la especie absorbente y simultáneamente, se detecta la emisión producida (generalmente a un ángulo de 90° con respecto a la excitación) cuando esos estados excitados vuelven al estado fundamental.

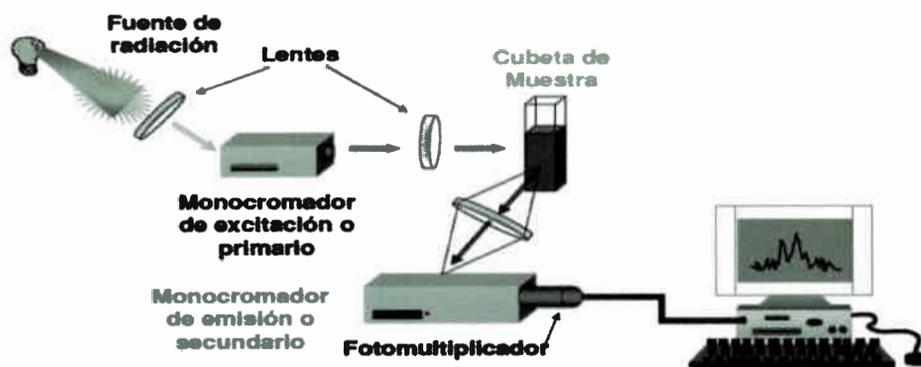


Figura 14. Fluorómetro

Usando un fluorómetro pueden obtenerse los espectros de emisión y excitación de una muestra. Se define como espectro de *emisión* al obtenido barriendo el monocromador de emisión mientras se mantiene a λ fija el monocromador de excitación. Un espectro de *excitación* se obtiene al barrer el

monocromador de excitación mientras se mantiene a λ fija el monocromador de emisión (generalmente en el máximo de emisión de la muestra).^[84]

Es necesario definir también espectros de emisión (y excitación) no-correctados y correctados. Los fluorómetros proporcionan generalmente espectros de emisión (y excitación) no-correctados, los cuales son generalmente útiles para cualquier aplicación analítica. Sin embargo, si se quiere comparar espectros de emisión (y excitación) con los obtenidos en otros laboratorios o con fluorómetros diferentes, es necesario realizar correcciones.

Por ejemplo, los espectros de emisión se hallan distorsionados por la dependencia de la eficiencia del monocromador de emisión y de la respuesta del fotomultiplicador a la λ de emisión observada. Esta dependencia es una característica del fluorómetro utilizado y por ende, debe ser corregida. Para obtener el espectro de fluorescencia corregido, el espectro es dividido por un factor de corrección generalmente provisto por el fabricante del instrumental.^[85]

Similarmente, los espectros de excitación se hallan distorsionados por la dependencia de la eficiencia transmisión del monocromador de excitación y la dependencia de la potencia de la lámpara con λ . Cabe señalar que la mayoría de los instrumentos disponibles comercialmente contienen los factores de corrección para los espectros de excitación.^[85]

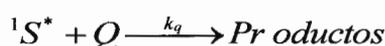
II.3.2.1. INHIBICIÓN (QUENCHING) DE ESTADOS EXCITADOS

En muchas ocasiones, la intensidad de fluorescencia de un sustrato puede ser disminuida cuando un nuevo sustrato es incluido en la solución analizada. Este fenómeno de inhibición (quenching) de la fluorescencia es debido a la interacción del estado excitado del fluoróforo ($^1S^*$) con una sustancia en el estado fundamental (el quencher, Q). Se distinguen dos tipos de procesos de quenching: *quenching físico* y *quenching químico*.

En el *quenching físico*, la interacción entre $^1S^*$ y Q lleva a la obtención de ambos reactivos en sus respectivos estados fundamentales. Esto es, el exceso de energía del sistema se disipa completamente como calor.

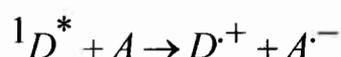


En contraste, en el *quenching químico*, la energía del estado excitado se aprovecha para la obtención de nuevas especies. Así, los reactivos S y Q no se recuperan luego de la interacción. La energía de excitación de S sirve para romper/formar nuevos enlaces y el resto es disipado como calor.



Tanto el quenching físico como el químico pueden ocurrir a través de diversos tipos de mecanismos. Cabe mencionar mecanismos tales como: *transferencia de electrones* (Te^-), *transferencia de energía* (TE) y *transferencia de protones*.

Los procesos *fotoinducidos de transferencia de electrones* (FTe^-) ocurren entre estados excitados capaces de comportarse como aceptores (A)/dadores (D) de electrones y quenchers con propiedades redox complementarias. Para el caso donde el estado excitado del D fuera el estado precursor de la FTe^- , podemos escribir:

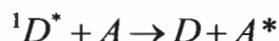


Este proceso lleva a la formación de un par de iones radicales y juega un papel importante en la fotosíntesis y en sistemas artificiales para la conversión de energía solar. El cambio de energía libre de Gibbs para un proceso de FTe^- puede calcularse a partir de la ecuación de Rehm –Weller^[21]:

$$\Delta G^{eTF} = e \left[E_{(D/D^+)} - E_{(A/A^-)} \right] - E_{00} + C$$

donde e es la carga de un electrón, $E_{(D/D^+)}$ es el potencial de oxidación del donador (D), $E_{(A/A^-)}$ es el potencial de reducción del aceptor (A) (ambos medidos en las mismas condiciones experimentales), E_{00} la energía de excitación del estado precursor ($^1D^*$) y C una constante que tiene en cuenta la interacción coulombica de las especies cargadas formadas durante el proceso de Te^- . Para que el proceso de FTe^- tenga posibilidades de ocurrir con alta eficiencia, necesariamente el proceso debe ser exergónico: $\Delta G^0 < 0$.

Los procesos de transferencia de energía pueden simbolizarse de acuerdo a:



donde D y A representan al dador y al aceptor de energía, respectivamente. Para que estos procesos sean termodinámicamente factibles, dos condiciones deben cumplirse: a) el proceso debe ser exergónico y, b) debe conservarse el momento total de spin electrónico. El cambio de energía libre para la TE se calcula de acuerdo a:

$$\Delta G^{ET} = E_{00}(A) - E_{00}(D)$$

donde $E_{00}(A)$ representa la energía de excitación del aceptor y $E_{00}(D)$ la del dador. Debido a las restricciones de spin solo los siguientes procesos de TE son posibles:

a) ET singulete-singulete (TE-SS):



b) ET triplete-triplete (TE-TT):



El oxígeno molecular interviene en procesos de *TE* de características únicas dado que esta molécula en su estado fundamental es un triplete. Así, el siguiente proceso de *TE* es posible para O₂ (aceptor de energía):



Este proceso es clave para la generación de especies ROS como oxígeno singlete excitado.

Existen dos mecanismos bien conocidos para los procesos de *TE*:

- a) mecanismo de *Dexter*,
- b) mecanismo de *Föster*.

El mecanismo de *Dexter* está mediado por una reacción de intercambio de electrones, por lo que su factibilidad depende de que $\Delta G^{eTF} < 0$ en la etapa inicial del proceso. Las reacciones de *FTe*⁻ requieren un considerable solapamiento entre los orbitales moleculares del A y D, por lo que el mecanismo de *Dexter* es solo importante cuando el A y el D se hallan a cortas distancias de contacto. El mecanismo de *Föster* difiere marcadamente del anterior. Este opera vía interacciones dipolo-dipolo y por ende, puede ocurrir eficientemente a distancias de 20 Å o más. Este mecanismo requiere, sin embargo, un importante solapamiento entre el espectro de absorción del A y el espectro de emisión de D.^[21]

III.3.3. EL SISTEMA FOTOSINTÉTICO Y EL ORIGEN DE LA LUMINISCENCIA DE LOS DIFERENTES GRUPOS ALGALES

Los métodos de fluorescencia son muy aplicados para la caracterización del fitoplancton *in vivo* en ambientes de agua dulce y marinos.^[86] En la fotosíntesis cooperan dos grupos separados de pigmentos o fotosistemas (PS), que se encuentran localizados en los tilacoides.

Se conoce como PS al grupo de moléculas mediante las cuales se transforma la energía lumínica en energía química. Cada PS (PS I y II) es un conjunto molecular complejo que está formado por una antena colectora de energía y un centro de reacción. La antena colectora es un grupo de varios cientos de pigmentos especie-dependiente que están unidos a la membrana tilacoidal a través de proteínas especiales. Su función es dirigir la energía lumínica recogida hacia una Chl especial llamada *Chl a del centro de reacción* (Figura 15).^[87]

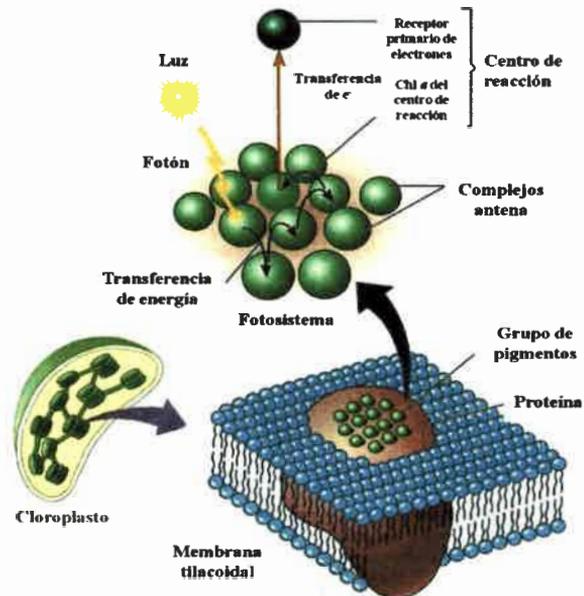


Figura 15. Esquema de un fotosistema

El PSI absorbe luz a 700 nm (PS₇₀₀), produce un reductor fuerte capaz de reducir NADP⁺ y un oxidante débil. El PSII absorbe luz a 680 nm (PS₆₈₀), produce un oxidante muy fuerte capaz de oxidar al agua y un reductor más débil que el producido por el PSI. Cada uno de estos PS se encuentra asociado a polipéptidos en la membrana tilacoidal y absorben energía luminosa independientemente. Ambos PS son física y químicamente diferentes, contienen cada uno su complejo antena y su centro de reacción, y están unidos por una cadena de transporte electrónico. La **Figura 16** muestra un esquema de la fase lumínica de la fotosíntesis que se conoce como esquema en Z, implica ambos PS y explica las reacciones fotoquímicas que ocurren en los organismos fotosintéticos.^[87]

El proceso de captación de la luz comienza en el PSII cuando la energía luminosa llega a las antenas colectoras quienes transfieren esa energía de

excitación a la Chl *a* del centro de reacción, la cual es excitada transfiriendo dos electrones a un aceptor primario de electrones (1 en **Figura 16**). Cada electrón expulsado es sustituido rápidamente por dos electrones provenientes de la hidrólisis del H₂O, liberando a su vez oxígeno (2 en **Figura 16**).^[87]

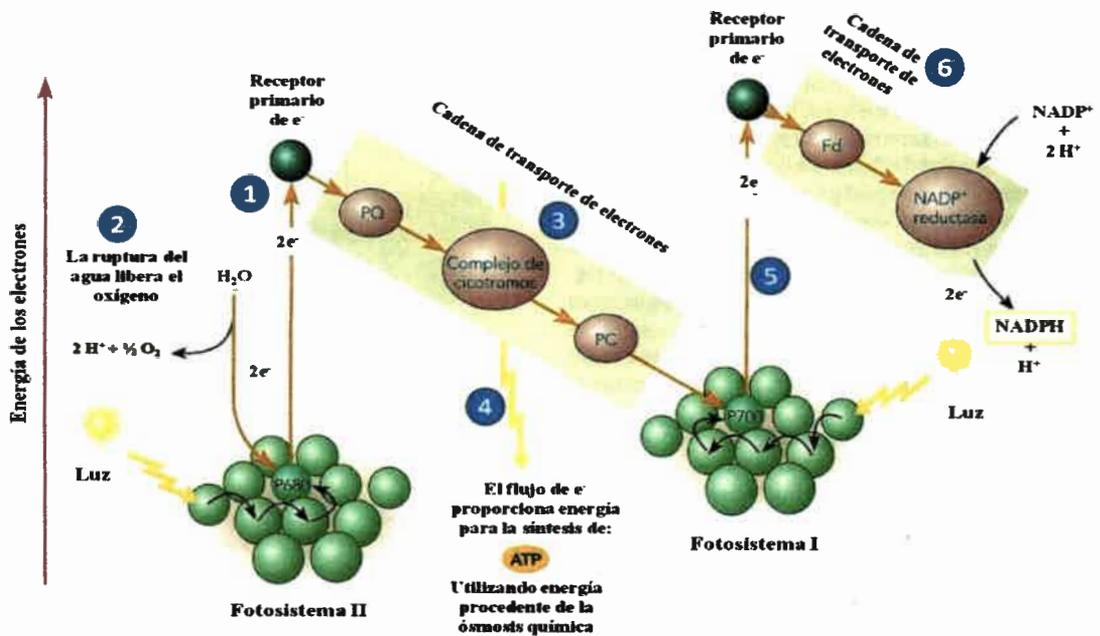


Figura 16. Estructura y reacciones básicas de los PSII y PSI. Diagrama en Z

A continuación, cada electrón trasferido de la molécula de Chl *a* pasa del receptor primario de electrones a una serie de transportadores de electrones, que en conjunto se conoce como cadena de transporte de electrones. El movimiento a través de la cadena se produce mediante una serie de reacciones de oxidación-reducción (3 en **Figura 16**). La energía liberada por el flujo de electrones se utiliza de manera indirecta para impulsar la síntesis de ATP (4 en **Figura 16**). Cada electrón que pasa por la cadena de transporte de electrones neutraliza la molécula de Chl *a* del centro de reacción del PSI. Esta molécula de Chl *a* es reducida al absorber un fotón expulsando dos electrones a un receptor primario de electrones (5 en **Figura 16**). Cada electrón expulsado del PSI pasa a través de otra

cadena de transporte de electrones. El último transportador de esta cadena es una enzima que transforma NADP^+ en NADPH , utilizando para ellos dos electrones (6 en **Figura 16**).^[87]

Los pigmentos fotosintéticos presentes en los organismos fitoplanctónicos son de tres clases: Chl, carotenoides y FB (**Figura 17**). Las Chl están formadas por un anillo de porfirina y una cadena de fitol, generalmente se caracterizan por un alto coeficiente de absorción. Los carotenoides, anaranjados, rojos y amarillos, absorben la energía luminosa con menos eficacia que las Chl. Transfieren la energía a la Chl y la protegen de los efectos de las ROS al ser importantes antioxidantes. Las FB (FC y FE), rojas o azules, están conjugadas con proteínas específicas y transfieren la energía lumínica a la Chl, estos pigmentos se encuentran en las algas rojas y en las algas verde azules.

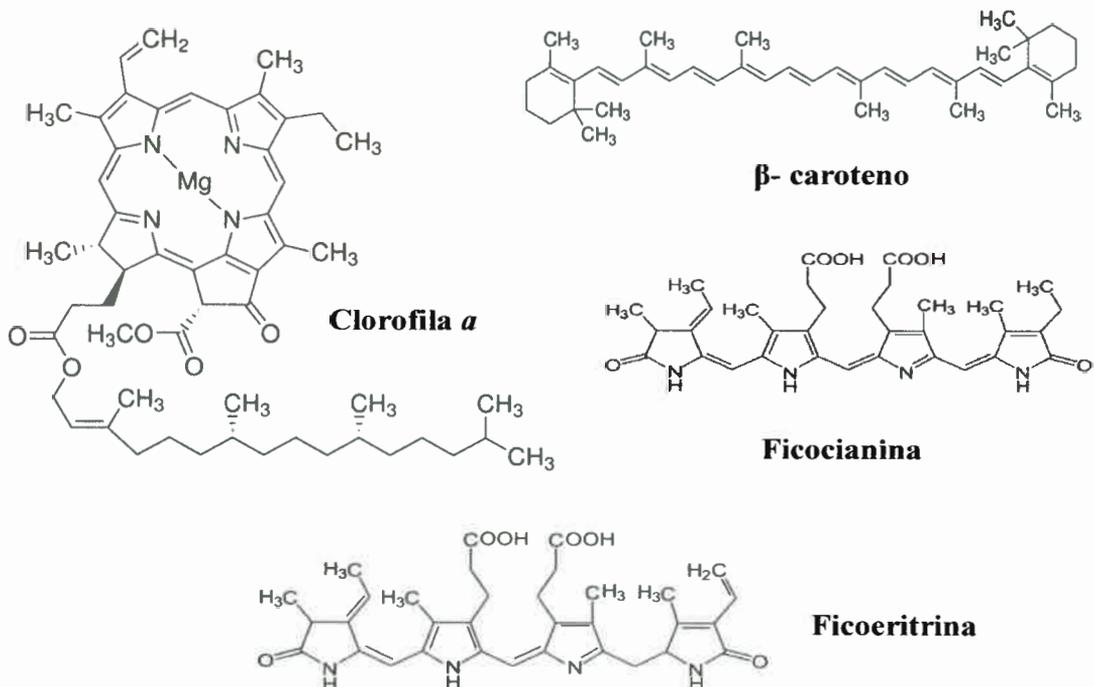


Figura 17. Estructura molecular de los principales pigmentos fotosintéticos

Es conocido que la fluorescencia observada de la Chl se debe a la emitida por la Chl *a* del PSII.^[88,89] La emisión de fluorescencia de PS II medida alrededor de 685 nm es generalmente aceptada como una medida del contenido de Chl de algas presentes en sistemas acuáticos.^[90,91]

Los pigmentos antena especie-dependiente afectan el espectro de excitación de fluorescencia de la Chl como también otorgan el color característico a cada organismo, siendo esto utilizado como un criterio taxonómico. Se ha sugerido que, a partir del análisis de los espectros de excitación de muestras problemas conteniendo distintos grupos algales se pueden discriminar las especies de algas presentes en dicha muestra y cuantificar sus poblaciones absolutas. El espectro de *emisión* (fluorescencia) obtenido para los distintos grupos algales en el rango de excitación de 400-600 nm siempre muestra la emisión de Chl *a*. Por lo tanto, los grupos algales prácticamente no se distinguen a partir de sus espectros de emisión. Sin embargo, difieren marcadamente en sus espectros de *excitación* debido a los distintos pigmentos antena especie dependiente que conforman sus aparatos fotosintéticos (**Figura 18**).

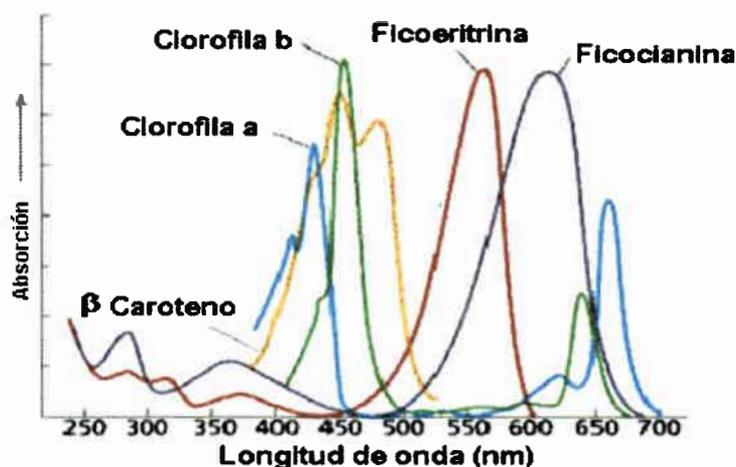


Figura 18. Espectros de absorción de los diferentes pigmentos antena

Los grupos algales que se presentan en este trabajo están caracterizados por un espectro de excitación que depende de la composición de estos pigmentos antena.^[18,88] A manera de resumen se presenta la **Tabla 1** donde se muestran los pigmentos fotosintéticos presentes en cada grupo algal.

Tabla 1. Pigmentos fotosintéticos presentes en grupos algales

Grupos algales	Pigmentos
Cianofíceas	Chl <i>a, b, d</i> , pigmentos carotenoides y FC.
Clorófitas	Chl <i>a y b</i> y pigmentos accesorios: β -caroteno y xantofilas
Diatomeas	Chl <i>a y c</i> y pigmentos accesorios: β -caroteno y fucoxantina
Dinoflagelados	Chl <i>a y c</i> y algunas xantofilas específicas
Rodófitas	Chl <i>a y d</i> , pigmentos accesorios: FE y FC (FB), carotenoides

II.3.3.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALGAS

El método más empleado para la identificación de fitoplancton es el recuento de células directo utilizando para ello un microscopio invertido siguiendo el método de *Utermöhl*.^[92] Otro método importante es la determinación de los pigmentos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El uso de carotenoides marcadores en este método permite la identificación taxonómica.^[93,94,95,96] Si bien estas técnicas son muy utilizadas demandan mucho tiempo y generalmente no arrojan buenos resultados en muestras muy diluídas.^[97]

Perfiles de profundidad construidos a partir de la fluorescencia de la Chl se han utilizado desde principios de 1970.^[98] Desde entonces, se han hecho algunos intentos para distinguir los diferentes grupos de fitoplancton sobre la base de sus propiedades de fluorescencia *in vivo*.^[99,100,101]

El mayor problema de los métodos actuales para la identificación del plancton es que estos métodos son normalmente retrospectivos y no son adecuados para ensayos *in situ*. Aspectos tales como la agregación, la migración vertical de algas y la presencia de nanoplancton son alguno de los problemas que consumen tiempo en el análisis de muestras.^[102,103]

Más recientemente, Beutler *et al.*^[19,104] propusieron un método fluorimétrico para la identificación/cuantificación simultánea de microalgas. Este método aprovecha las diferencias en la composición de pigmentos antenas periféricos del PS II presentes en los distintos grupos algales. El método fue primero ensayado en el laboratorio y posteriormente usado para diseñar una sonda sumergible para ser aplicada en medidas a campo (*in situ*).

La **Figura 19** muestra un esquema del fluorómetro de laboratorio construido por Beutler *et al.*^[19,104] a tal fin. El mismo cuenta con un microcontrolador (1) que sirve para controlar la excitación de la muestra y procesar los resultados. El sistema de excitación consiste de cinco LED (Light-Emitting Diode) cuyas λ se muestran en la figura. Los LEDs son pulsados secuencialmente y no poseen la misma energía. La luz proveniente de los LED pasa a través de un filtro de corte (3) para evitar que llegue a la muestra luz infrarroja. La luz es enfocada por una lente (4) en la celda (5) conteniendo la suspensión algal. Una segunda lente (6) sirve para enfocar la emisión de la Chl al detector (8) previo paso de la luz por un filtro de banda (7) con transmitancia máxima a 615 nm. La señal del detector es amplificada y convertida en un conversor analógico digital (9) antes de ser transmitida al microcontrolador (1).

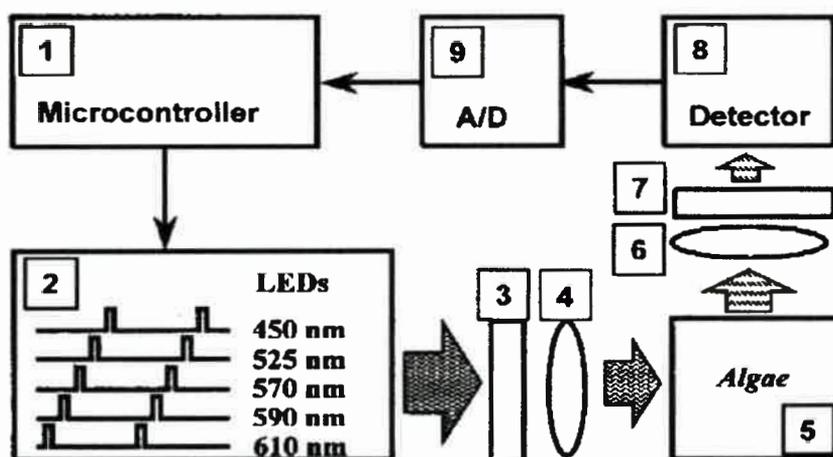


Figura 19. Fluorómetro de laboratorio

El fluorómetro de laboratorio descrito anteriormente fue utilizado para obtener los *espectros norma* de cada grupo algal por separado (cianobacterias, clorofitas, diatomeas, dinoflagelados y rodofitas).

Beutler *et al.*^[19,104] definen como el espectro *norma* ($N(\lambda_{exc})$) de un grupo algal a su espectro de excitación normalizado a la concentración de Chl (mg Chl/m³).

De esta manera:

$$N(\lambda_{exc}) = F(\lambda_{exc})/Chl$$

donde:

$N(\lambda_{exc})$: espectro *norma* (Einsteins m⁻²s⁻¹Chl⁻¹),

$F(\lambda_{exc})$: espectro de excitación,

Chl : es la concentración de Chl (mg/m³) de la muestra estudiada.

Todos los espectros de excitación fueron obtenidos monitoreando la emisión a 615 nm. Notar que los $N(\lambda_{exc})$ fueron construidos a partir de cinco λ . Así, por

ejemplo, el $N(\lambda_{exc})$ para el grupo de las clorofitas puede expresarse como un vector:

$$N_C(\lambda_{exc}) = [N_C(450), N_C(525), N_C(570), N_C(590), N_C(610)]$$

donde el número entre paréntesis representa la λ de excitación. Por otro lado, como los $N(\lambda_{exc})$ fueron obtenidos usando fuentes de excitación (LEDs) de distinta potencia pueden considerarse como espectros “no-correctados”.

Beutler *et al.*^[19,104] propusieron que el espectro de excitación de una muestra problema ($P(\lambda_{exc})$) cualquiera; esto es, una muestra de la cual se desconoce el tipo/cantidad de algas presentes que la componen, puede expresarse como una función de los $N(\lambda_{exc})$ de acuerdo a:

$$P(\lambda_{exc}) = \sum a_i N_i(\lambda_{exc})$$

donde los coeficientes a_i (mg Chl/ m³) representan la contribución requerida del espectro norma $N_i(\lambda_{exc})$ para “reproducir” el espectro de excitación de la muestra.

De esta manera, realizar una determinación cuantitativa/cualitativa de una muestra significa hallar los valores de los a_i . De lo anterior se concluye también que, la cantidad de Chl en la muestra viene dado por Chl (total) = $\sum a_i$. Desde el punto de vista matemático, encontrar los valores de los a_i es un problema relativamente sencillo. Notar que si la definición de $P(\lambda_{exc})$ se expande para las cinco λ y los cinco géneros algales estudiados, se obtienen cinco ecuaciones lineales homogéneas. Así, los valores de los cinco a_i pueden encontrarse realizando un simple análisis multiparamétrico. Existen distintos softwares comerciales que facilitan este análisis (Excel, Origin, etc).

Finalmente, el método de Beutler *et al.*^[19,104] requiere que:

~ Los $N(\lambda_{exc})$ sean linealmente independientes; esto es, que sea imposible representar a uno de ellos como una combinación lineal de los $N(\lambda_{exc})$ de los

otros grupos algales. Beutler *et al.* demostraron que esta premisa se cumple aceptablemente.^[19]

~ La forma de cada $N(\lambda_{exc})$ sea independiente del número de células presentes y de los parámetros ambientales presentes durante la determinación de los $N(\lambda_{exc})$ y los presentes en el experimento *in situ*.^[19] Como se discute en esta tesis, esta premisa del método es de difícil comprobación.

Puede concluirse que, el método de Beutler se presenta como una técnica rápida muy promisoría para la identificación y cuantificación de grupos algales en una muestra problema. En principio, este método sería adaptable al uso de fluorómetros convencionales. En el desarrollo de esta tesis se discute esta implementación y se sugieren posibles modificaciones para su mejor aplicabilidad.

III.4. CONTROL DE LAS POBLACIONES ALGALES

III.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La disponibilidad de agua potable es un serio problema en muchos lugares del mundo. Los tratamientos de desinfección deben incluirse en los sistemas de distribución de agua potable a partir de fuentes naturales. La desinfección es una etapa del proceso del tratamiento de aguas consistente en la aplicación de métodos químicos, cuyo objetivo es la inactivación de microorganismos patógenos para minimizar el riesgo de enfermedades.^[105]

Uno de los principales problemas en el tratamiento de aguas es el control de poblaciones algales. Los florecimientos algales ocurren naturalmente, pero son más frecuentes en aguas que han sufrido ciertas formas de interferencia humana, entre las cuales se destaca la eutrofización o enriquecimiento de las aguas con nutrientes, ya sea a partir de fuentes puntuales, tales como las descargas cloacales municipales, o de fuentes no puntuales, como la agricultura o el endicamiento de los ríos, lo cual aumenta el tiempo de retención y de exposición del agua a la luz solar.^[43]

Dentro de los grupos algales más frecuentemente hallados se encuentran las cianobacterias y dentro de este grupo los principales géneros son *Anabaena* y *Microcystis*, productores de varias toxinas potencialmente causales de enfermedades cuando son ingeridas o por contacto con el agua a partir de la exposición recreacional.^[43]

En los primeros 75 años del siglo XX, la clarificación química, la filtración y la cloración han sido los únicos procesos utilizados para el tratamiento de aguas. Sin embargo, en los últimos 30 años, se ha observado un cambio drástico en la aproximación de la industria al tratamiento del agua y se han comenzado a considerar seriamente otras tecnologías alternativas para la desinfección.^[106] La combinación de luz solar y un FS puede ser una opción prometedora para áreas con infraestructura insuficiente pero con bastantes horas de radiación solar anual.

Utilizar, en los procesos de purificación de aguas, colorantes como el rosa de bengala y el azul de metileno, ftalocianinas, porfirinas capaces de generar $^1\text{O}_2$ por transferencia de energía con excelentes rendimientos cuánticos es una elección promisoriosa.^[107,108]

El mecanismo de acción fotodinámica (**Figura 20**) se inicia cuando el sensibilizador en estado fundamental ($^0\text{Sens}$) es excitado por la absorción de luz para producir el primer singulete excitado ($^1\text{Sens}^*$). Este estado posee diferentes vías de decaimiento, siendo una de ellas el cruzamiento entre sistemas (ISC) a un estado triplete excitado ($^3\text{Sens}^*$). El FS en estado triplete puede reaccionar vía transferencia de protón o electrón con un sustrato apropiado (BioH) para formar radicales libres (reacción fotoquímica tipo I). Estos intermediarios (radicales libres) pueden reaccionar con oxígeno triplete en estado fundamental ($^3\text{O}_2$) para generar una mezcla de ROS, tales como O_2^- , H_2O_2 , OH^{\cdot} , etc. En las reacciones tipo II, la energía del estado triplete es transferida a $^3\text{O}_2$, con la consecuente formación de $^1\text{O}_2$.^[22]

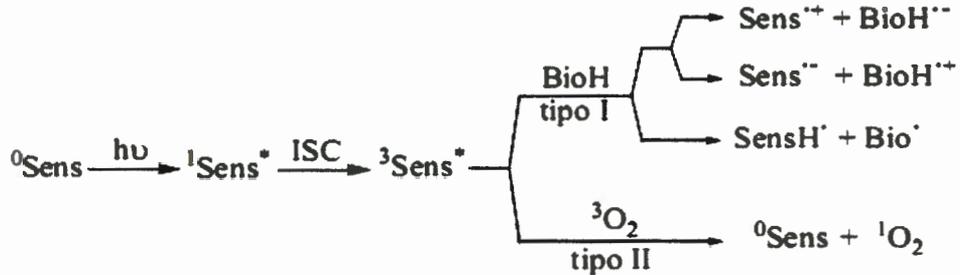


Figura 20. Ilustración gráfica del mecanismo fotodinámico

Ambas reacciones conducen a la formación de sustancias altamente reactivas que atacan a una variedad de sustratos de origen biológico, produciendo pérdida de funcionalidad en las biomoléculas con la consecuente inactivación celular. Estos procesos pueden ocurrir simultáneamente y la relación entre ambos depende del sensibilizador, del sustrato y del medio en el cual se da la reacción.

III.4.2. FOTSENSIBILIZADORES

En general, un FS puede definirse como una sustancia capaz de absorber luz y catalizar una reacción en particular. En TIF este agente es retenido selectivamente en cantidades suficientes por las células y que genera $^1\text{O}_2$. Existen diferentes tipos de agentes fotosensibilizadores: porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, fenotiazinas, aminotriarilmetanos, ftalocianinas, naftalocianinas. Los requisitos que debe poseer todo FS para producir $^1\text{O}_2$ eficientemente son los siguientes:

- Ser capaz de absorber luz visible eficientemente (preferentemente en la región entre 400 y 750 nm) con coeficientes de absorción molar (ϵ) superiores a $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- Poseer una elevada eficiencia de paso del estado $^1\text{Sens}^*$ al estado $^3\text{Sens}^*$ del FS (ϕ_{ISC}) próxima al 100%.

- Poseer energía del estado $^1\text{Sens}^*$ superior a la del $^1\text{O}_2^*$ ($>95 \text{ kJ mol}^{-1}$) para que exista una transferencia de energía eficiente desde el FS al oxígeno.
- Largos (τ_0) del estado excitado triplete, en el orden del μs o superior, con objeto de permitir que haya tiempo suficiente para la reacción entre las moléculas de FS y las moléculas de oxígeno presentes en el medio.
- Alto ϕ_Δ de producción de $^1\text{O}_2^*$ en distintos medios. El número de eventos que ocurren de producción de $^1\text{O}_2^*$ dividido por el número de fotones absorbidos por el FS y por unidad de tiempo debe de ser lo más alto posible. En general, los buenos FS tienen valores de Φ_Δ próximos a la unidad.
- Buena estabilidad térmica y fotoquímica, a fin de evitar la descomposición de las moléculas de FS, incluso por el propio $^1\text{O}_2^*$ fotogenerado.^[109]

III.5. ÁREA DE ESTUDIO

III.5.1. EMBALSE DE RÍO TERCERO

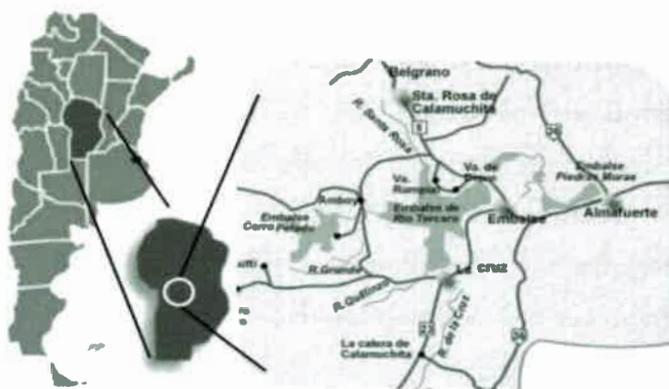


Figura 21. Ubicación del Embalse de Río Tercero

El embalse de Río Tercero (**Figura 21**) ($64^\circ 23' \text{ O}$; $32^\circ 10' \text{ S}$), localizado en el centro de la provincia de Córdoba, abarca una superficie de 4.600 ha y posee una profundidad media de 12 m^[13,110] siendo el cuerpo artificial de agua más grande de la provincia.

Este lago es una conjunción de los ríos Santa Rosa, Grande, Amboy, Quillinzo y de la Cruz, alimentándose de una cuenca de 3.300 km.^[2,3] En las costas de esta represa se encuentran las localidades de Embalse, Villa del Dique y Villa Rumipal, que aprovechan este recurso como provisión de agua para consumo

humano y animal, fines hidroeléctricos, regulación y control de crecidas, riego y actividades recreacionales, náuticas y pesca deportiva (Figura 22).^[3]

La calidad de este recurso hídrico se ve afectada en diferente grado dependiendo del uso para el cual está destinado y de la fuente de contaminación. La materia orgánica aportada en exceso altera el equilibrio químico natural del agua y en consecuencia, la composición del fitoplancton y éste a su vez, por encontrarse al inicio de la cadena trófica, altera al resto de la biota que depende directa o indirectamente para su alimentación. Es por ello que el fitoplancton es un buen indicador ambiental.^[111]

En otro sentido, durante el proceso de eutrofización el mejor ejemplo de los cambios que se producen lo constituye la reacción del plancton, siendo las algas uno de los mejores indicadores de polución, pudiendo ser peligrosas sus floraciones para el ganado y consumo humano. Es bien conocido que muchos grupos algales tienen la capacidad de producir sustancias altamente tóxicas.^[112] Si el agua contiene altas concentraciones de toxinas o estas son ingeridas con el agua de bebida o accidentalmente durante el baño, existe un riesgo para la salud humana y animal.^[110]

En la actualidad, la diversidad en calidad y cantidad de los desechos orgánicos sólidos y efluentes vertidos en este recurso hídrico es tal que exige un análisis de múltiples variables que interactúan entre sí.^[6]

III.5.2. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

III.5.2.1. TEMPERATURA



Figura 22. Embalse de Río Tercero

La temperatura del agua tiene una gran importancia en el desarrollo de los diversos procesos que en ella se realizan, de forma que un aumento de la misma modifica la solubilidad de las sustancias, aumentando la de los sólidos disueltos y disminuyendo la de los gases. La actividad biológica aproximadamente se duplica cada diez grados (ley del Q_{10}), aunque superado un cierto valor característico de cada especie viva, tiene efectos letales. Un aumento anormal (por causas no climáticas) de la temperatura del agua, suele tener su origen en el vertido de aguas utilizadas en procesos industriales. La temperatura se determina mediante termometría realizada “*in situ*”.^[113]

III.5.2.2. pH

El pH de un cuerpo de agua es un parámetro a considerar cuando queremos determinar la especiación química y solubilidad de varias sustancias orgánicas e inorgánicas en agua. Es un factor abiótico que regula procesos biológicos mediados por enzimas (ej. fotosíntesis, respiración); la disponibilidad de nutrientes esenciales que limitan el crecimiento microbiano en muchos ecosistemas (ej. NH_4^+ , PO_4^{-3} y Mg^{2+}); la movilidad de metales pesados tales como cobre, que es tóxico para muchos microorganismos; así como también afecta o regula la estructura y función de macromoléculas y organelas tales como ácidos nucleicos, proteínas estructurales y sistemas de pared celular y membranas. Variaciones en el pH pueden tener entonces efectos marcados sobre cada uno de los niveles de organización de la materia viva, desde el nivel celular hasta el nivel de ecosistemas.^[114]

El pH es un parámetro muy importante a ser considerado, el cual causa muchos fenómenos químicos y biológicos, especialmente sobre el metabolismo y procesos fisiológicos sobre los organismos acuáticos. Se ha reportado que los puntos letales de acidez y alcalinidad para los microorganismos son de pH 4 y pH 11, respectivamente. Aguas naturales con valores de pH de 6,5 a 9,0 son las más adecuadas para la producción de organismos acuáticos.^[115]

El proceso de fotosíntesis puede tener un efecto marcado sobre el pH del agua. En aguas conteniendo cantidades relativamente altas de bicarbonato de calcio $[\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2]$, la remoción de CO_2 del sistema por actividad fotosintética ocasiona un aumento en el pH del agua, desplazando el equilibrio hacia la derecha.^[114] Esta situación es ilustrada por las siguientes ecuaciones:



III.5.2.3. OXÍGENO DISUELTO (OD)

Es un parámetro indicativo de la calidad del agua. Se determina “*in situ*” mediante la utilización de un electrodo de membrana o por yodometría. El valor máximo de OD es un parámetro muy relacionado con la temperatura del agua y disminuye con ella. La concentración máxima de OD en el intervalo normal de temperaturas es de aproximadamente 9 mg/L, considerándose que cuando la concentración baja de 4 mg/L, el agua no es apta para desarrollar vida en su seno.^[113]

III.5.2.4. ESTADO TRÓFICO

Para definir el estado trófico de una masa de agua y tener un dato comparativo con otros sistemas se utilizan índices del estado trófico calculados en base a diferentes parámetros. Un tipo de evaluación del estado trófico se basa en comparar los datos obtenidos experimentalmente con valores fijos propuestos para cada rango (**Tabla 2**). La Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE)^[116] utiliza el promedio anual de fósforo total (PT, mg m^{-3}), promedio anual de Chl *a* en la zona eufótica (mg m^{-3}), el máximo anual de Chl *a* (mg m^{-3}) y la profundidad media anual de visión del disco de Secchi (DS, m).

Tabla 2. Valores de la OCDE para un sistema de clasificación trófica

<i>Estado</i>	<i>Media PT</i>	<i>Media Chl a</i>	<i>Máx- Chl a</i>	<i>Media DS</i>	<i>Min. DS</i>
ULTRAOLIGOTRÓFICO	<4	<1	<2,5	>12	>6
OLIGOTRÓFICO	<10	<2,5	<8	>6	>3
MESOTRÓFICO	10-35	2,5-8	8-25	6-3	3-1,5
EUTRÓFICO	35-150	8-25	25-75	3-1,5	1,5-0,7
HIPEREUTRÓFICO	>150	>25	>75	<1,5	<0,7

Otro método para evaluar objetivamente el estado trófico es el Índice Numérico del Estado Trófico (Trophic State Index, TSI) de Carlson^[117] que es, probablemente, de los más usados. Las variables utilizadas en el índice son los valores medios anuales de la profundidad de visión disco de Secchi (DS) y de las concentraciones superficiales de PT y Chl *a*:

$$TSI = 60 - 14,41 \text{ Log}(DS)$$

$$TSI = 14,42 \text{ Log}(PT) + 4,14$$

$$TSI = 9,81 \text{ Log}(Chl a) + 30,6$$

Este índice, reduce el estado trófico de un lago a un valor (en una escala de 0 a 100), en un intento por evitar la subjetividad inherente a los términos oligotrófico, mesotrófico y eutrófico. Un valor del TSI inferior a 20 representa condiciones de ultraoligotrofia; entre 30 y 40, oligotróficas; entre 40 y 50, mesotróficas; en el rango entre 50 y 60 de eutrofia y por encima de 70, condiciones de hipereutrofia.

CAPÍTULO IV
MATERIALES Y MÉTODOS

IV-MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE CEPAS

Un medio de cultivo debe proporcionar los requerimientos mínimos necesarios de la especie a cultivar, tales como agua, sales minerales (macro y micronutrientes), una fuente de nitrógeno, pH adecuado, compuestos orgánicos y factores de crecimiento (vitaminas, hormonas). Estos medios pueden ser naturales o sintéticos. Los naturales se preparan con agua de mar enriquecida con sales minerales y vitaminas, mientras que los sintéticos, se preparan de igual manera pero con agua destilada como base, a la cual le son adicionados los componentes naturales del agua de mar.^[118,119,120]

Considerando lo anterior, se cultivaron y mantuvieron cinco cepas pertenecientes a cuatro grupos algales diferenciados espectralmente (**Figura 23**):

- *Anabaena* sp. (ITEP-024) y *Microcystis* sp. (NPLS-04/MPCD-01) (Cyanophyceae)
- *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae)
- *Cyclotella* sp. (Bacillariophyceae)
- *Ceratium* sp. (Dinophyceae)
- *Porphyridium* sp. (Rhodellophyceae)

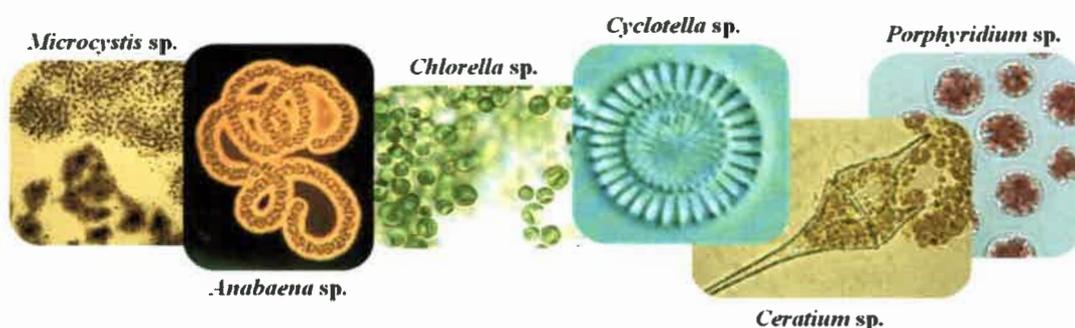


Figura 23. Especies algales cultivadas

IV.1.1. MATERIALES

Para mantener los cultivos se utilizaron diferentes medios. A continuación se detalla la composición de cada uno de ellos.

Tabla 3. Medio de crecimiento BG₁₁^[121] para cianofíceas

<i>Composición</i>	<i>Solución Stock</i>	<i>ml/Litro</i>
1- NaNO ₃	150 g/L	10 ml
2- K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	40 g/L	1 ml
3- MgSO ₄ .7H ₂ O	75 g/L	1 ml
4- CaCl ₂ .2H ₂ O	36 g/L	1 ml
5- Acido Cítrico	6 g/L	1 ml
6- Citrato férrico de NH ₄	6 g/L	1 ml
7- Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1 g/L	1 ml
8- Na ₂ CO ₃	20 g/L	1 ml
9- Solución de materiales traza	Ver Tabla 4	1 ml
10- Agua destilada		1000 ml

Nota: A 950 ml de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto. Se lleva el volumen final a 1 L. Se ajusta el pH del medio a ≈ 7.5 con una solución de HCl 10%. Conservar heladera.

Tabla 4. Solución stock de materiales traza

<i>Composición</i>	<i>g/Litro</i>
1- H ₃ BO ₃	2,86 g
2- MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g
3- ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222 g
4- Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,390 g
5- CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079 g
6- Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0494 g
7- Agua destilada	500 ml

Nota: A 950 ml de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto. Se lleva el volumen final a 1 L. Cada solución se debe agregar en el orden en que aparecen en la tabla asegurándose que cada una esté correctamente disuelta antes de agregar la siguiente. Conservar en heladera.

Tabla 5. Medio de crecimiento para clorofíceas.^[122] *Solución A*

<i>Composición</i>	<i>g/ml</i>
1-Ca(NO ₃) ₂	10 g
2-PO ₄ H ₂ K	2,5 g
3-SO ₄ Mg	2,5 g
4-ClK	2,5 g

Nota: A 950 ml de agua destilada adicionar la cantidad indicada de cada compuesto. Volumen final 1 L.

Tabla 6. Medio de crecimiento para clorofíceas. *Solución B*

<i>Composición</i>	<i>g/ml</i>
1-Cl ₃ Fe	0,5 g
2-Ac. Tartárico	0,5 g

Tabla 7. Medio de crecimiento para clorofíceas. *Solución C*

<i>Composición</i>	<i>g/ml</i>
1-BO ₃ H ₃	1,43 g
2-Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0,905 g
3-Cl ₂ Zn	0,0055 g
4-Cl ₂ Cu	0,0025 g

Nota: A 450 ml de agua destilada adicionar la cantidad indicada de cada compuesto. Volumen final: 500 ml. Colocar 33,3 ml de Solución A, 1 ml de Solución B y 1 ml de Solución C para volumen final: 1000 ml de agua destilada. Esterilizar. Ajustar pH a 6,5 con una solución de HCl 10%. Conservar en heladera.

Tabla 8. Medio de crecimiento WC^[123] para diatomeas

Composición	mg/L
1-CaCl ₂ .2H ₂ O	36,76 mg - Solución 1
2-MgSO ₄ .7H ₂ O	36,97 mg- Solución 2
3-NaHCO ₃	12,60 mg- Solución 3
4-K ₂ HPO ₄	8,71 mg- Solución 4
5-NaNO ₃	85,01 mg- Solución 5
6-Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	28,42 mg- Solución 6
7- Solución7	Ver tabla 9
8- Solución 8	Ver tabla 10

Tabla 9. Solución stock de materiales traza

Composición	mg/L
Na ₂ EDTA	4,36 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,18 mg
H ₃ BO ₃	1,0 mg

Tabla 10. Solución de vitaminas

Composición	mg/L
1-Tiamina HCl	0,1 mg
2-Biotina	0,5 mg
3-B ₁₂	0,5 mg

Nota: Cada solución debe prepararse a un volumen final de 1 L. Estas deben ser conservadas en heladera. Para preparar el medio, se adiciona 1 ml de cada solución stock para llegar a un volumen final de 1 L de agua destilada.

Tabla 11. Medio de crecimiento WC modificado^[124] para dinoflagelados

<i>Composición</i>	<i>mg/L</i>
1-CaCl ₂	50 mg
2-KCl	5 mg
3-NaNO ₃	100 mg
4-MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg
5-K ₂ HPO ₄	10 mg
6-Solución de materiales traza (ver Tabla 12)	10 ml
7-Solución de vitaminas (ver Tabla 13)	2 ml

Nota: A 950 ml de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto. Se lleva el volumen final a 1 L. Luego de esterilizar el medio se debe ajustar el pH a 7-7.2, con una solución de HCl 10%. Conservar en heladera.

Tabla 12. Solución stock de materiales traza

<i>Composición</i>	<i>mg/L</i>
1-FeCl ₂	10 mg
2-ZnCl ₂	5 mg
3-H ₃ BO ₃	200 mg
4-MnCl ₂	40 mg
5-CoCl ₂	1 mg
6-Na ₂ EDTA	1 g

Nota: A 950 ml de agua destilada adicionar la cantidad indicada de cada compuesto. Volumen final: 1 L.

Tabla 13. Solución de vitaminas

Composición	mg/Litro
1-Tiamina HCl	200 mg
2-Acido nicotínico	100 mg
3-Biotina	0,50000 mg
4-B ₁₂	0,050000 mg

Nota: A 950 ml de agua destilada adicionar la cantidad indicada de cada compuesto. Volumen final: 1 L.

Tabla 14. Medio de crecimiento F/2^[125,126] para algas rojas

Stock	Solución stock	ml/Litro
1-NaNO ₃	75 g/L	1 ml
2-NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5 g/L	1 ml
3-Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30 g/L	1 ml
4-Solución de materiales traza	Ver Tabla 15	1 ml
5-Solución de vitaminas	Ver Tabla 16	0,5 ml

Nota: A 950 ml de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto. Volumen final: 1 L. Agregar NaNO₃ y solución de vitaminas a agua destilada. Autoclavar por separado NaH₂PO₄.H₂O, Na₂SiO₃.9H₂O y la solución de metales traza. Agregarlos al medio una vez que se hayan enfriado.

Tabla 15. Solución stock de materiales traza

Componentes	Stock (en 100 ml de agua)	Cantidad
1-FeCl ₃ .6H ₂ O	-	1,3 g
2-Na ₂ EDTA.2H ₂ O	-	8,7 g
3-CuSO ₄ .5H ₂ O	980 mg	1 ml
4-Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	630 mg	1 ml
5-ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 g	1 ml
6-CoCl ₂ .6H ₂ O	1 g	1 ml
7-MnCl ₂ .4H ₂ O	18 g	1 ml

Nota: A 95 ml de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto. Volumen final: 100 ml.

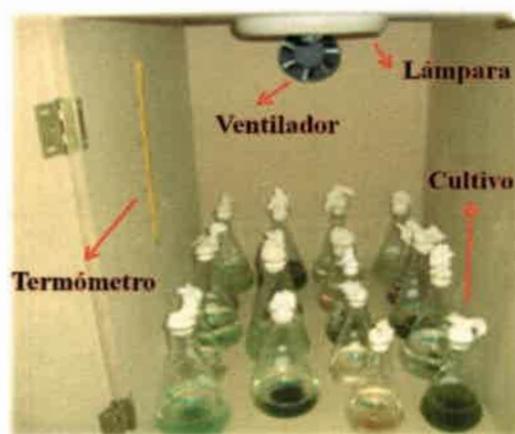
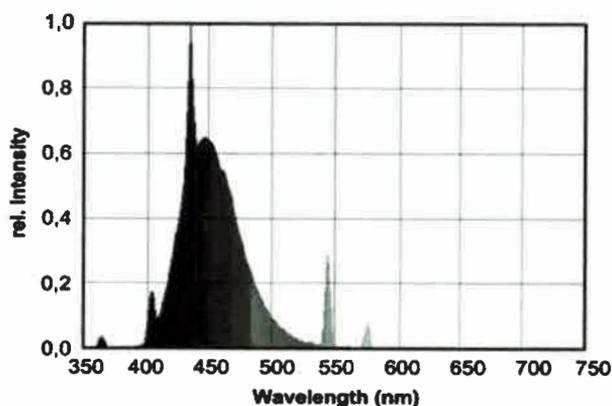
Tabla 16. Solución de vitaminas

<i>Componentes</i>	<i>Stock (en 10 ml de agua)</i>	<i>Cantidad</i>
1-Vitamina B ₁₂	10 mg	1 ml
2-Biotina	10 mg	1 ml
3-Tiamina HCl	-	200 mg

Nota: A 9,5 ml de agua destilada adicionar la cantidad indicada de cada compuesto. Volumen final: 10 ml.

IV.1.2. METODOLOGÍA

Para el cultivo de las cepas se utilizó una caja de cultivo (Figura 24) (constituida en madera) la cual contenía una lámpara que emitía luz visible de 80 Watts de potencia (Figura 25). La lámpara se hallaba controlada por una fotocélula, permitiendo realizar ciclos de 13 hs Luz:11 hs Oscuridad.

**Figura 24.** Caja de cultivo**Figura 25.** Espectro de emisión de la lámpara utilizada dentro de la caja de cultivo

La temperatura fue controlada por medio de un termómetro colocado dentro de la caja y, por medio de un dispositivo data logger HOBO H8 Family se monitorearon los cambios de temperatura en el interior de la caja. Este dispositivo electrónico registró mediciones ordenadas en el tiempo que fueron almacenadas en una memoria interna con su respectiva fecha y hora. Con la información que arrojó el dispositivo se pudieron observar las variaciones de temperaturas durante el cultivo de los distintos grupos algales (**Figura 26**). Por último, la circulación del aire dentro de la caja fue forzada por un ventilador. Como puede concluirse de la **Figura 26**, la temperatura de cultivo se mantuvo siempre alrededor de los (21 ± 1) °C.

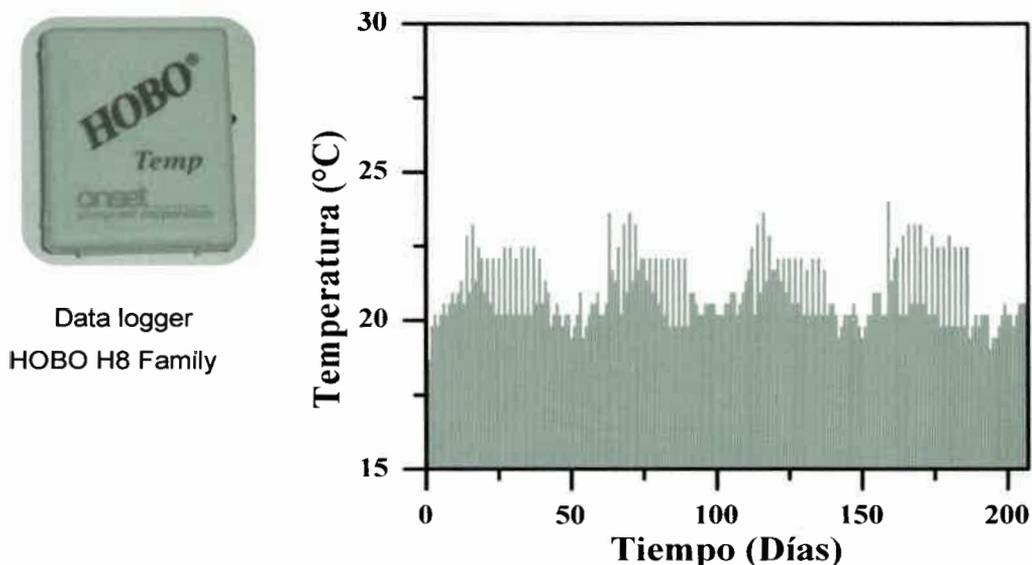


Figura 26. Variación de la temperatura en función del tiempo de incubación de los cultivos

Las cepas *Anabaena* sp. (ITEP-024) y *Microcystis* sp. (NPLS-04/MPCD-01) pertenecientes al grupo de las cianobacterias fueron provistas por el Laboratorio de Ficología de la Universidad Federal de Río de Janeiro y por la Universidad

Federal de Santa María, Brasil. Estas cepas fueron colocadas en erlenmeyers de 250 y 500 ml conteniendo medio de crecimiento BG₁₁^[121] y mantenidas a una temperatura de (21±1)°C con agitación diaria debido a que volúmenes de cultivo inferiores a un litro no necesitan aireación ya que el intercambio gaseoso a través de los tapones de algodón es suficiente y la difusión de CO₂ es adecuada. Los cultivos fueron colocados dentro de la caja de cultivo manteniéndolos en las condiciones descritas con anterioridad.

La cepa *Chlorella vulgaris*, perteneciente al grupo de las algas verdes, fue provista por el Laboratorio de Hidrobiología Aplicada de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFQyN) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Esta cepa fue colocada en erlenmeyers de 250 y 500 ml conteniendo medio de crecimiento para clorofíceas^[122] y mantenida en iguales condiciones que el grupo algal anterior.

La cepa perteneciente al grupo de las diatomeas, *Cyclotella* sp. (Bacillariophyceae) también provista por el Laboratorio de Hidrobiología Aplicada de la FCEFQyN de la UNC, fue incubada en iguales condiciones que las cepas anteriores en erlenmeyers de 250 y 500 ml conteniendo medio de crecimiento WC^[123].

La cepa *Ceratium* sp. fue colectada del dique “La Huertita”, Provincia de San Luis, aislada y cultivada en erlenmeyers de 250 ml conteniendo medio WC modificado^[124] (para dinoflagelados) y mantenida en iguales condiciones que los cultivos anteriores.

Por último, la cepa *Porphyridium* sp. fue provista por el laboratorio de la Estación de Fotobiología Playa Unión, Rawson, Chubut y fue mantenida en medio F/2^[125,126] para algas rojas, en iguales condiciones de luz y temperatura que los restantes grupos algales.

IV.2. INSTRUMENTAL

Las medidas espectroscópicas UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453x UV-Visible System.

Para la realización de los espectros de fluorescencia se utilizó un equipo Spex, modelo *Fluoromax*, equipado con un software DM 3000 3.2.

Para realizar las curvas de crecimiento de los grupos algales estudiados, se utilizó un espectrofotómetro Tuner SP-830.

Para determinar el porcentaje de incorporación de porfirina se utilizó una centrifuga Presvac, modelo DCS – 16 – RTV.

Las imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia fueron tomadas utilizando un microscopio Reflected Light Fluorescence modelo L2001BYL-ARCANO (400x, con filtro de paso de banda azul - 450 nm y observación con filtro de banda rojo - 680 nm).

IV.3. CUANTIFICACIÓN DE CHL *a*

La extracción del pigmento se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por la guía operativa GEMS/AGUA.^[127] Cabe recordar que la determinación de la concentración de Chl es un requisito necesario para la obtención de los $N(\lambda_{exc})$.

Principio de la técnica

En el fitoplancton existen diversos tipos de clorofila: Chl *a*, Chl *b*, Chl *c*, Chl *d* (Figura 27). Cada una tiene un espectro de absorción de luz característico. La Chl puede ser modificada cuando comienza a degradarse inmediatamente después que la célula

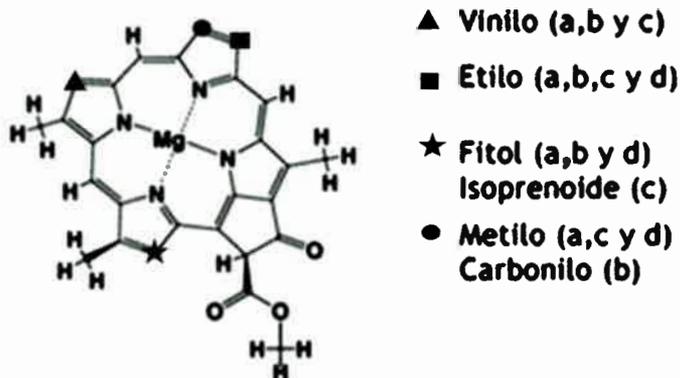


Figura 27. Estructura molecular de los diferentes tipos de Chl

muere. Básicamente el ión Mg^{2+} es sustituido por dos átomos de hidrógenos mediante una reacción de hidrólisis ácida (**Figura 28**).

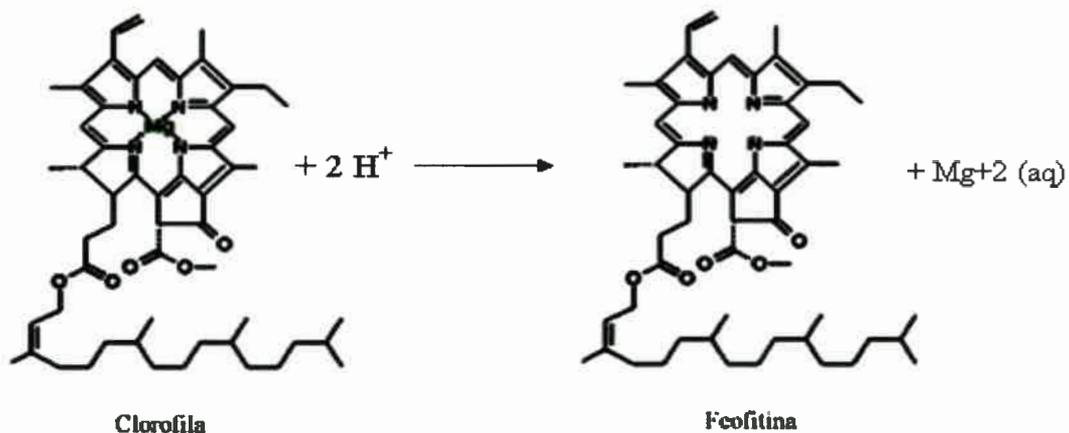


Figura 28. Degradación de Chl *a*

Esto puede llevar a error al estimar la concentración de Chl *a* en la muestra porque el producto de la degradación de la Chl *a*, la feofitina *a*, absorbe en la misma región espectral (**Figura 29**). Por este motivo, se debe medir la concentración de feofitina *a* y hacer las correcciones pertinentes.

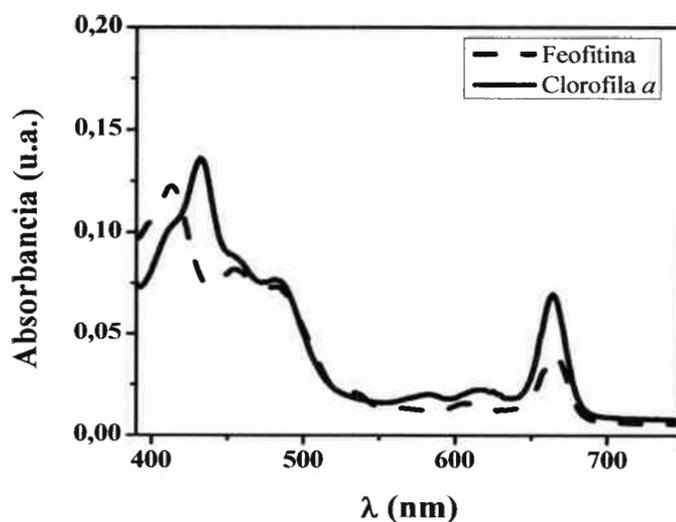


Figura 29. Espectros de absorción de Chl *a* y Feofitina

Se colocó una concentración conocida de cada una de las cepas a ser estudiadas (*Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Ciclotella* sp. y *Chlorella vulgaris*) en matraces de 25 ml. Luego se enrazó con medio de cultivo correspondiente a la cepa estudiada. A partir de estas muestras diluidas se realizaron mediciones por triplicado para obtener los espectros de emisión y excitación, previo a la extracción de Chl (**Figura 30**).

Para el género *Ceratium* se utilizaron cuatro concentraciones conocidas del cultivo colocadas en matraces de 25 ml. Luego se enrazó con medio de cultivo WC modificado y se dejó en agitación durante 20 min. Para el género *Porphyridium* las muestras se prepararon en dos erlenmeyers de 500 ml en los que se colocaron 150 ml del cultivo (ya contenía medio de cultivo) y se dejó en agitación durante 30 min. A partir de estas muestras diluidas se realizaron mediciones para obtener los espectros de emisión y excitación, previo a la extracción de Chl.

En todas las mediciones, el espectro de emisión fue monitoreado en el rango de 450 a 850 nm, con un tiempo de integración de 0,5 s, un intervalo de 1 nm, el monocromador de excitación en 440 nm, el slit de excitación en 2 nm y el de emisión en 1 nm, mientras que el espectro de excitación fue monitoreado en el rango de 370 a 640 nm, con un tiempo de integración de 0,5 s, un intervalo de 1 nm, el monocromador de emisión en 680, el slit de excitación en 1 nm y el de emisión en 2 nm. Los espectros de excitación obtenidos de esta manera fueron utilizados para obtener los $N(\lambda_{exc})$ de cada grupo algal. Es importante aclarar que los $N(\lambda_{exc})$ no fueron corregidos. Los espectros de emisión y excitación de la mayor parte de los géneros de algas estudiadas fueron publicados con anterioridad.^[19,128]



Figura 30. Preparación de muestras a analizar

Los reactivos utilizados para la extracción de la Chl se detallan a continuación:

- Suspensión de carbonato de magnesio: 1,0 g MgCO_3 en 100 ml de agua destilada, agitar antes de usar. Esta suspensión se utiliza para que la Chl se adhiera al MgCO_3 y de esta manera quede retenida en el papel de filtro.
- Solución de acetona: Acetona-Agua 90% V/V. La acetona es el solvente que permite la extracción del pigmento.
- Acido clorhídrico: 1N HCl. Permite convertir Chl *a* en feopigmentos. Este ácido produce la pérdida del átomo de Mg presente en la estructura de la Chl, lo que convierte a este pigmento en feofitina *a*.

Procedimiento

Se concentraron las muestras utilizando un filtro de fibra de vidrio (*Microclar*) con un espesor de 0,20 mm y una capacidad de retención promedio de 4-12 μ . Se filtró continuamente, sin permitir que el filtro se seque durante la concentración de una misma muestra. Luego se añadieron 0,2 ml de MgCO_3 cuando estaba por concluir la filtración.

A continuación los filtros fueron desintegrados con la ayuda de una varilla de vidrio en vasos de precipitado conteniendo 2 ml de acetona al 90%. Se llevó todo el contenido a un matraz de 10 ml el cual fue enraizado con acetona. Se etiquetó y cubrió con papel aluminio y se conservó en oscuridad a 4°C durante 24

hs. Transcurrido el tiempo de almacenamiento, se procedió a filtrar las muestras utilizando una jeringa de vidrio de 5 ml acoplada con un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro.

Se llenó una celda de cuarzo de 1 cm de lado con 5 ml acetona al 90%. Esto fue utilizado como blanco. Por otro lado, se llenó otra celda con 5 ml de la muestra a analizar.

Se procedió a medir absorbancia en un espectrofotómetro a tres λ : 663, 665 y 750 nm (663^a, 665^a, 750^a).

Luego se añadieron 200 μL de una solución de 1N HCl a la muestra que se encontraba en la celda. Se agitó suavemente durante un minuto y se registró nuevamente la absorbancia a 663, 665 y 750 nm (663^b, 665^b, 750^b).^[127]

Cálculos:

Se restaron las absorbancias:

663^a - 750^a: absorbancia 663^c corregida

665^b - 750^b: absorbancia 665^c corregida

Se utilizaron las absorbancias 663^c y 665^c corregidas para calcular:

$$\text{Clorofila } a (\text{mg}/\text{m}^3) = \frac{26,73 (663^c - 665^c) (Ve)}{(Vs) (1)}$$

$$\text{Feofitina } a (\text{mg}/\text{m}^3) = \frac{26,73 (1,7 (665^c) - 663^c) (Ve)}{(Vs) (1)}$$

Donde:

26,73: factor de corrección.

Ve : Es el volumen de extracto de acetona en litros,

Vs : Es el volumen de muestra a analizar en m^3 ,

1: Es el paso de luz en la celda en cm.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. CURVAS DE CRECIMIENTO

Inicialmente, se analizaron las curvas de crecimiento típicas para los distintos grupos algales estudiados en esta tesis en las condiciones de cultivo descritas en sección IV.1.

Por ejemplo, para el caso del género *Microcystis* se preparó una suspensión celular utilizando para ello el medio de cultivo BG₁₁. Este medio estéril fue inoculado con una densidad celular de $\sim 5 \times 10^6$ cel ml⁻¹, correspondiente a una absorbancia (turbidez) a 750 nm (DO₇₅₀) de 0.07.^[129] Los tubos fueron mantenidos a (21±2) °C con agitación periódica e iluminación de 14hs luz:10hs oscuridad. Es importante aclarar que los microorganismos estudiados no se desarrollan sin fotoperíodo y que para su supervivencia es indispensable la presencia de luz. A continuación, se procedió a medir cada 3 días el crecimiento del cultivo por turbidez a 750 nm para finalmente obtener la correspondiente curva (**Figura 31**).

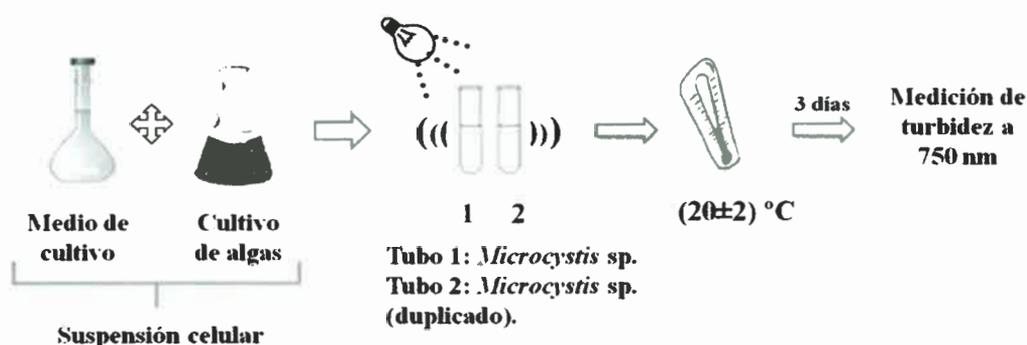


Figura 31. Preparación de muestras para la construcción de la curva de crecimiento

A continuación, se muestra la curva de crecimiento típica realizada para el género *Microcystis*. Se observan tres fases principales de las cuatro que tiene una curva típica. Una leve fase de latencia con una duración de 1 a 6 días y una

marcada fase exponencial de 6 a 20 días. La curva muestra también una fase estacionaria de 4 a 6 días (a partir del día 20) indicando que la población ha llegado a un equilibrio con los nutrientes disponibles en el medio (**Figura 32**). Resultados similares se obtuvieron para las restantes microalgas estudiadas, los cuales coinciden con resultados reportados en la literatura para otros géneros de cianobacterias tal como *Synechococcus*.^[130]

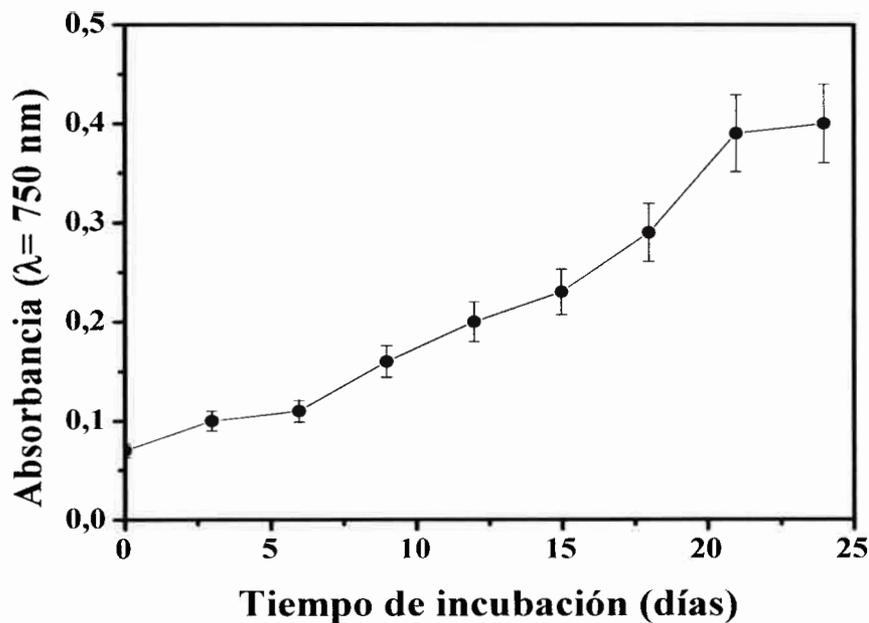


Figura 32. Curva de crecimiento para el género *Microcystis* en función del tiempo de incubación

V.2. OBTENCIÓN DE ESPECTROS *NORMA*

Todos los $N(\lambda_{exc})$, fueron obtenidos a partir de cultivos que se hallaban en la fase exponencial de crecimiento (entre 10-15 días de desarrollo).

Por ejemplo, para obtener el $N(\lambda_{exc})$ del género *Microcystis* se tomaron inicialmente cinco volúmenes distintos del cultivo: 100 μL , 250 μL , 500 μL , 750 μL y 1000 μL , los cuales fueron transferidos a matraces de 25 mL y enrazados

con medio de cultivo BG₁₁. Estas muestras fueron preparadas por triplicado para constatar reproducibilidad. Si bien los volúmenes de cultivos antes mencionados no están relacionados directamente con el número de células, la concentración de Chl presente en las muestras (la cual se determina por separado) corresponde a concentraciones de pigmento entre 0-300 mg/m³, las cuales estarían denotando desde ausencia de algas hasta una FAN.

Preparadas las muestras, se obtuvieron los correspondientes espectros de emisión ($\lambda_{exc}=440$ nm) y excitación ($\lambda_{emi}=680$ nm) *in vivo* (por triplicado) de cada muestra (Figura 33 y Figura 34). Las condiciones experimentales para la obtención de estos espectros se describieron en la sección IV.3. Cabe acotar que para evitar la decantación de las células durante el registro de los espectros (aproximadamente 10 min), las muestras fueron sometidas a agitación utilizando un buzo magnético.

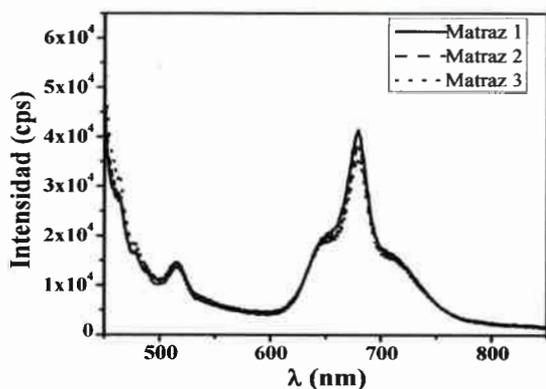


Figura 33. Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=440$ nm) realizado por triplicado *in vivo*. Volumen del cultivo del género *Microcystis*: 1000 μ l en 25 ml de solución

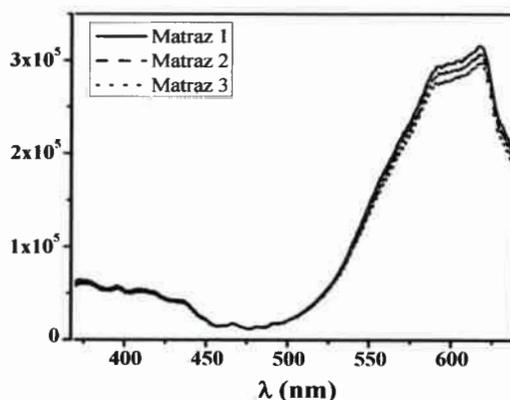


Figura 34. Espectro de excitación ($\lambda_{emi}=680$ nm) realizado por triplicado *in vivo*. Volumen del cultivo del género *Microcystis*: 1000 μ l en 25 ml de solución

Es también importe remarcar las siguientes observaciones:

- Cuando la emisión de una muestra es registrada continuamente durante 10 minutos (aproximadamente el tiempo requerido para obtener los

espectros de emisión o excitación) no se observan cambios importantes en la intensidad de fluorescencia de la misma.

b) Cuando se comparan los triplicados de los espectros de emisión o excitación de una misma muestra, la intensidad y la forma de los espectros no varían dentro de le error experimental (~1%).

Las observaciones a) y b) se justifican fácilmente teniendo en cuenta que la intensidad de excitación es baja no logrando producir un quenching del sistema fotosintético de los microorganismos. Este fenómeno se discutirá en detalle en siguiente sección.

c) Cuando se preparan tres muestras de la misma concentración de algas y se comparan sus espectros de emisión o excitación (**Figura 33** y **Figura 34**) se observan pequeños cambios. Estos cambios se atribuyen a la naturaleza heterogénea de los cultivos. Un mismo volumen de cultivo no contiene necesariamente el mismo número de células.

Las **Figura 35** y **Figura 36**, muestran espectros de emisión y excitación obtenidos con el género *Ceratium* a cuatro concentraciones (volúmenes) diferentes. Como cabía esperar, la intensidad de ambos espectros se incrementa con la concentración de células en la dispersión.

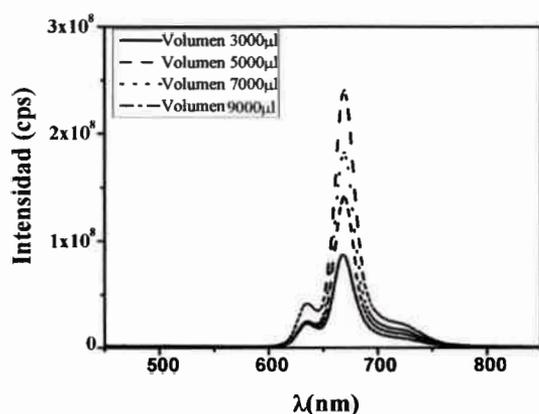


Figura 35. Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=440$ nm) del género *Ceratium* realizado para las cuatro concentraciones *in vivo*

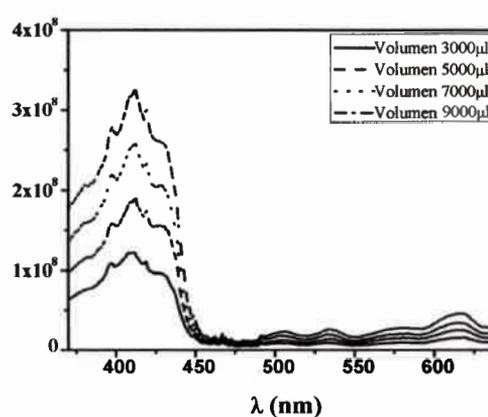


Figura 36. Espectro de excitación ($\lambda_{emi}=680$ nm) del género *Ceratium* realizado para las cuatro concentraciones *in vivo*

A continuación se determinó el contenido de Chl de cada muestra según el método GEMS/AGUA como se discute en la sección IV.3.

En la **Figura 37**, se representa la intensidad de fluorescencia medida a 618 nm (máximo del espectro de excitación) en función de la concentración de Chl (mg/m^3) de cada muestra analizada para el género *Microcystis*. La **Figura 38** muestra la intensidad de fluorescencia a 618 nm (excitación 440 nm) normalizada a la concentración de Chl (mg/m^3) para cada muestra estudiada perteneciente al género *Microcystis*. Como era de esperar, la relación es constante.

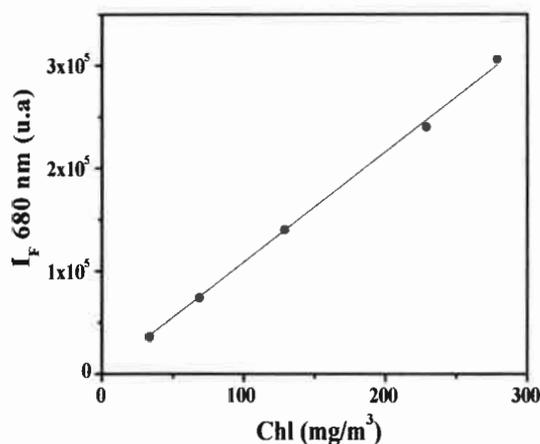


Figura 37. Relación entre la intensidad de fluorescencia a 680 nm (u.a.) y el contenido de Chl *a* (mg/m^3) de cada muestra para el género *Microcystis*

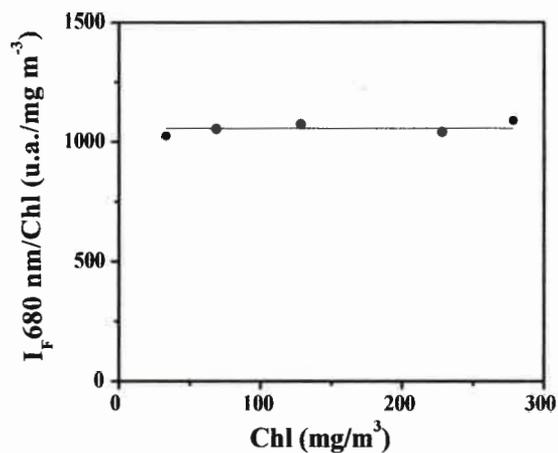


Figura 38. Relación entre intensidad de fluorescencia a 680 nm (u.a.) y el contenido de Chl *a* (mg/m^3) de cada muestra (promedio triplicado) para el género *Microcystis*

Los $N(\lambda_{exc})$ se construyeron promediando los espectros de excitación de la fluorescencia normalizados a la concentración de Chl. Cabe notar que Beutler *et al.*^[19] construyen los espectros norma únicamente con cinco λ . En esta tesis, los $N(\lambda_{exc})$ fueron registrados barriendo el rango de 370 a 640 nm. En principio, esto

presume una ventaja para el posterior análisis de los espectros de excitación de muestras reales.

La **Figura 39**, muestra todos los $N(\lambda_{exc})$ (no corregidos) obtenidos para todos los grupos algales estudiados.

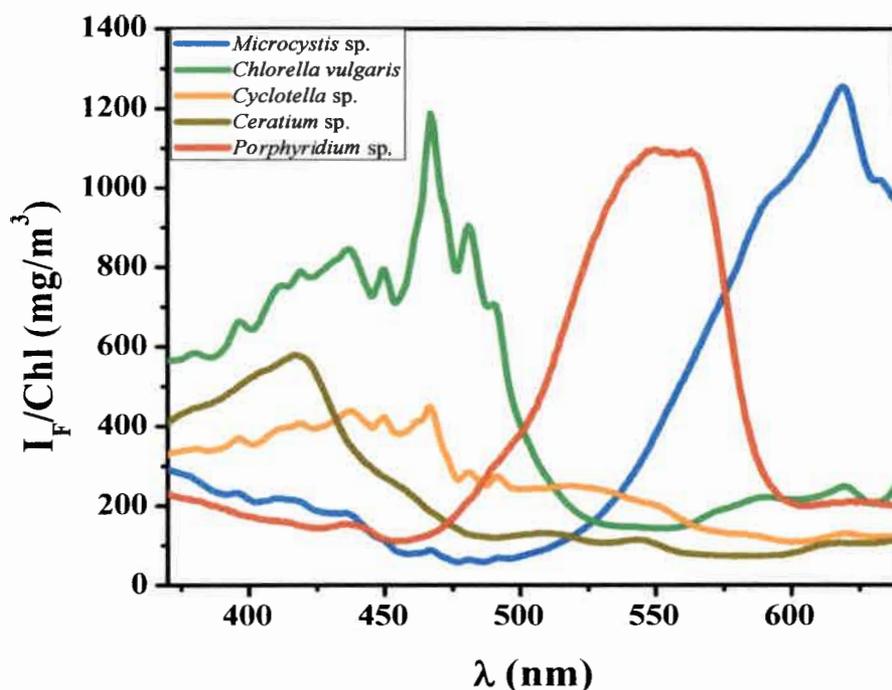


Figura 39. Espectros *norma* obtenidos del promedio de los espectros de excitación de muestras de microalgas *in vivo*

El $N(\lambda_{exc})$ de las cianofíceas presentó un máximo de intensidad a 618 nm resultado que coincide a lo informado por Beutler *et al.*^[19] Este máximo se debe a la presencia del pigmento antena FC característico de este grupo algal. Un $N(\lambda_{exc})$ similar se obtuvo para el género *Anabaena* (no mostrado).

Para la especie *Chlorella vulgaris*, el $N(\lambda_{exc})$ muestra una intensidad considerable en el rango de 400-500 nm debido a la presencia de Chl *a* y *b*, pigmentos característicos de las algas verdes. Esto coincide con reportes

anteriores donde se observó que el máximo en el espectro de excitación se encuentra alrededor de 450 nm.^[19]

Para el género *Cyclotella*, el $N(\lambda_{exc})$ muestra dos bandas importantes, una alrededor de 450-470 nm debida a la presencia de Chl *a* y *c* y la segunda entre 500-560 nm por la presencia de fucoxantina. En un estudio realizado en el año 2000 por Poryvkina *et. al.*^[86] se informó que la presencia de fucoxantina se manifiesta por la presencia de una banda con máximos a ~ 525 nm.

El $N(\lambda_{exc})$ de los dinoflagelados muestra un máximo a ~ 419 nm debido a la presencia del pigmento peridina, característico de este grupo algal. Esta observación coincide con lo reportado por Haxo *et. al.*^[131] y Hata *et. al.*^[132]

Para el género *Porphyridium* se observó un máximo en el rango de 525-575 nm en su $N(\lambda_{exc})$. Esto se debe a la presencia de la FBP conocida como FE, pigmento propio de este grupo y que lo diferencia de las cianobacterias. En trabajos anteriores se informó que el máximo en el espectro de excitación (corregido) por la presencia de este pigmento ocurre alrededor de 575 nm.^[133]

Es importante remarcar que los espectros de excitación utilizados para calcular los $N(\lambda_{exc})$ son espectros no-corregidos. En general, para aplicaciones analíticas, es indiferente utilizar espectros corregidos. En este caso, no se realizaron correcciones debido a que los factores de corrección provistos por el fabricante del espectrofluorómetro utilizado no cubrían todo el rango de λ de excitación estudiados. Los espectros de excitación de fluorescencia corregidos de los distintos grupos algales ya han sido reportados.^[128]

Como se muestra a continuación, los $N(\lambda_{exc})$ pueden utilizarse para estimar la población de los distintos grupos algales presentes en muestras reales utilizando un modelo de regresión lineal.

V.3. ANÁLISIS MULTIPARAMÉTRICO

A partir de la obtención de los $N(\lambda_{exc})$ puede realizarse el análisis de una muestra real. Como se indicó en la sección II.3.3.1, el espectro de excitación de una muestra cualquiera puede expresarse como:

$$P(\lambda_{exc}) = \sum a_i N_i(\lambda_{exc})$$

donde los coeficientes a_i (mg Chl/ m³) representan la contribución requerida del espectro norma $N_i(\lambda_{exc})$ del genero algal “i” para obtener el mejor ajuste del espectro de excitación de la muestra. Teniendo en cuenta que los $N_i(\lambda_{exc})$ calculados en esta tesis se obtuvieron en el rango de λ de 370-640 nm (incremento 1 nm), el espectro de excitación experimental de la muestra (obtenido en el mismo rango) puede expresarse para cada λ de excitación como:

$$\begin{aligned} P(370) &= a_V N_V(370) + a_D N_D(370) + a_A N_A(370) + a_R N_R(370) + a_{PA} N_{PA}(370) \\ P(371) &= a_V N_V(371) + a_D N_D(371) + a_A N_A(371) + a_R N_R(371) + a_{PA} N_{PA}(371) \\ &\vdots = \quad \quad \quad \vdots \quad + \quad \quad \quad \vdots \\ P(640) &= a_V N_V(640) + a_D N_D(640) + a_A N_A(640) + a_R N_R(640) + a_{PA} N_{PA}(640) \end{aligned}$$

Esto representa un conjunto finito de ecuaciones lineales homogéneas donde los subíndices V (clorofitas), D (diatomeas), A (cianobacterias), R (rodofitas) y PA (dinoflagelados) identifican a los diversos grupos algales estudiados. Notar que los valores a_i que satisfacen simultáneamente al conjunto de ecuaciones antes mostradas deben ser constantes para una muestra dada. Los a_i (mg/m³) representan la contribución de Chl de cada género a la Chl total de la muestra. Estos a_i se son obtenidos mediante un análisis de regresión lineal múltiple utilizando Origin 8.0.

V.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Tal cual lo explicado en las secciones anteriores, el método propuesto por Beutler *et al.*^[19] permitiría la identificación de los géneros algales presentes en una muestra real y simultáneamente, la cuantificación del aporte de Chl de cada especie presente y la Chl total.

El embalse del Río Tercero es un reservorio usado como provisión de agua para el consumo humano y animal habiéndose reportado que su estado de eutrofización oscila entre valores relativamente bajos o medios, dependiendo, entre otras causas, del grado de polución y de la estación del año.^[116,117] Florecimientos algales han sido detectados con recurrente proliferación de clorofitas, diatomeas y durante los años 1977 y 1984, grandes FAN de cianofitas.

Por tal motivo, para validar el método, se realizaron pruebas con los tres grupos algales más recurrentes del reservorio: clorofitas, diatomeas y cianobacterias. Para ello, se prepararon dispersiones de estas algas de concentración de Chl conocida: 4, y 7 y 12 mg/m³ para *Chlorella vulgaris* (algas verdes), *Cyclotella* sp. (algas doradas) y *Microcystis* sp. (algas azules), respectivamente. Estos rangos de concentraciones fueron escogidos porque se conoce que la concentración típica del embalse está comprendida normalmente entre 0-45 mg/m³.^[134]

A continuación, se prepararon cuatro mezclas de algas y se determinó, utilizando el método propuesto por Beutler, la concentración de Chl en las mismas. En la primera mezcla se hallaban presentes algas verdes y doradas únicamente, en la muestra 2, verdes y azules, en la tercera azules y doradas y finalmente, una mezcla de los tres géneros en la cuarta muestra. La **Figura 40** muestra el ajuste de la cuarta muestra usando el método de regresión lineal.

Como puede observarse el ajuste es muy aceptable. Del mismo se obtiene valores de Chl de 3, 6 y 10 mg/m³ para las algas verdes, doradas y azules, respectivamente. La cantidad de Chl total es de 19 mg/m³. Cabe acotar que, para esta muestra, deberían haberse obtenido valores de 4, 7, 12 mg/m³ para los grupos algales y 23 mg/m³ para la Chl total. Los resultados para todas las muestras analizadas se muestran en la **Figura 41**

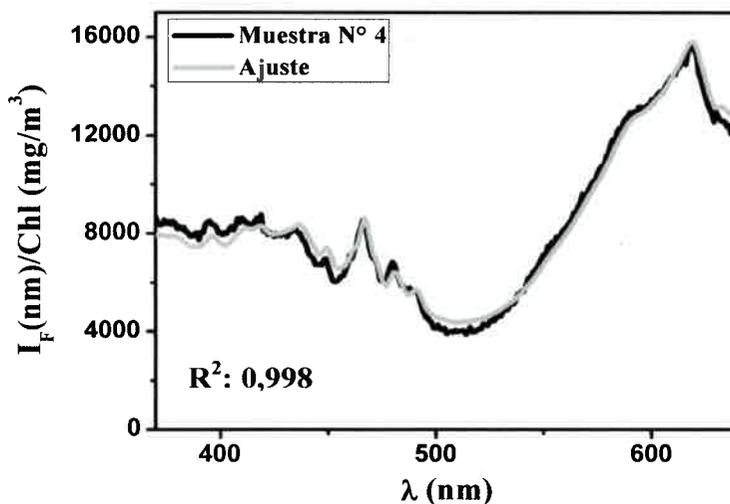


Figura 40. Ajuste realizado a partir de la muestra N° 4 utilizando el método de regresión lineal

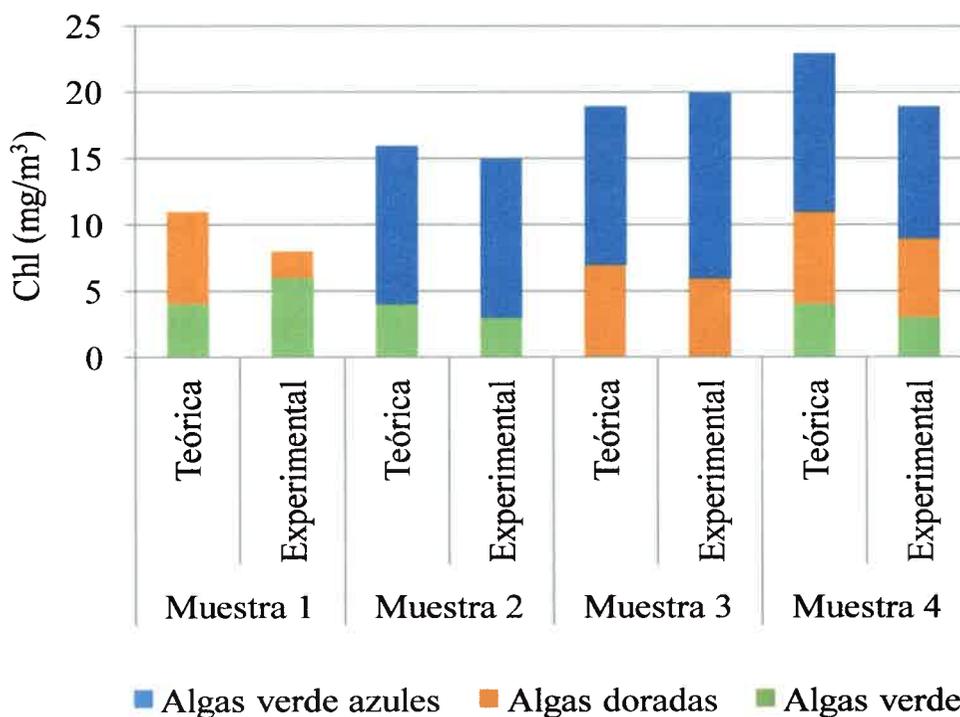


Figura 41. Concentración de Chl *a* (mg/m³) para todas las mezclas analizadas mediante el método de regresión lineal propuesto por Beutler *et al.*

Las columnas denominadas como teóricas muestran los resultados que deberían haberse obtenido (considerando las concentraciones de los patrones de algas preparados), mientras que las columnas señaladas como experimental corresponden a los valores obtenidos del ajuste. Como puede observarse existe un error de aproximadamente ± 3 unidades en la Chl total calculada. Este error está comprendido dentro de la incertidumbre del método y es solo importante para las muestras más diluidas. En lo concerniente al aporte de Chl de cada grupo algal a la Chl total, los resultados pueden considerarse satisfactorios. En conclusión, el método permite discriminar entre diversos grupos algales presentes en una misma muestra problema y proporciona valores de Chl total aceptablemente aproximados. La obtención del espectro de excitación de la muestra y su posterior ajuste no requiere más de 20 min, lo cual consiste en una enorme ventaja comparando con los métodos tradicionales para la identificación y estimación de Chl total de una muestra.

Una de las premisas importantes del método de Beutler era que los $N(\lambda_{exc})$ debían ser linealmente independientes. Los resultados mostrados en la **Figura 41**, confirman de alguna manera esta presunción. Esto se hace evidente porque no se observa una “transferencia” significativa entre géneros de la cantidad de Chl calculada. De existir transferencia no habría correlación entre las concentraciones de Chl *a* determinadas para las columnas experimentales y las teóricas.

V.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

V.5.1. MUESTREO

Se realizaron un total de seis muestreos (**Tabla 17**) en el embalse de Río Tercero. Se identificaron 29 sitios de muestreo (**Figura 43**). A los puntos 6, 15, 17, 23, 24, 26 y 28 se les determinó fósforo y nitrógeno total, nitritos y nitratos según metodología estándar.^[135]

En cada sitio de muestreo se recolectaron 1L de agua de la superficie del lago. En los sitios 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 21, 23, 24, 26 y 28 se determinó Chl total usando el método GEMS/AGUA.

Además, en cada punto de muestreo se tomaron los siguientes parámetros físico-químicos: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, OD (mg/L), profundidad (m). Los tres primeros parámetros se registraron utilizando un equipo portátil, mientras que para profundidad se utilizó un disco de Secchi (DS) (Figura 42).

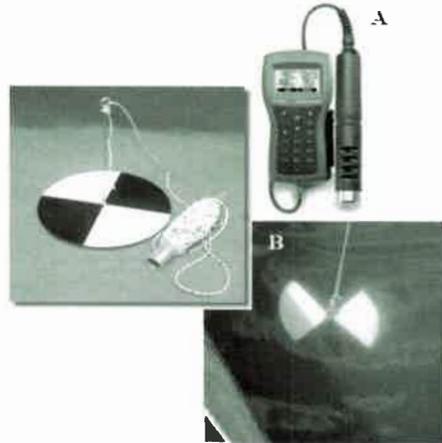


Figura 42. Medidor portátil de parámetros físico-químicos (A) y disco de Secchi (B)

Inmediatamente después de la recolección, las muestras fueron conservadas a 4°C en la oscuridad durante 12 horas y luego se procedió al análisis de las mismas.

Tabla 17. Muestreos realizados en el embalse de Río Tercero

<i>Muestreo</i>	<i>Mes</i>	<i>Año</i>	<i>Estación</i>
1	Diciembre	2009	Primavera
2	Marzo	2010	Verano
3	Mayo	2010	Otoño
4	Septiembre	2010	Invierno
5	Noviembre	2010	Primavera
6	Junio	2011	Otoño

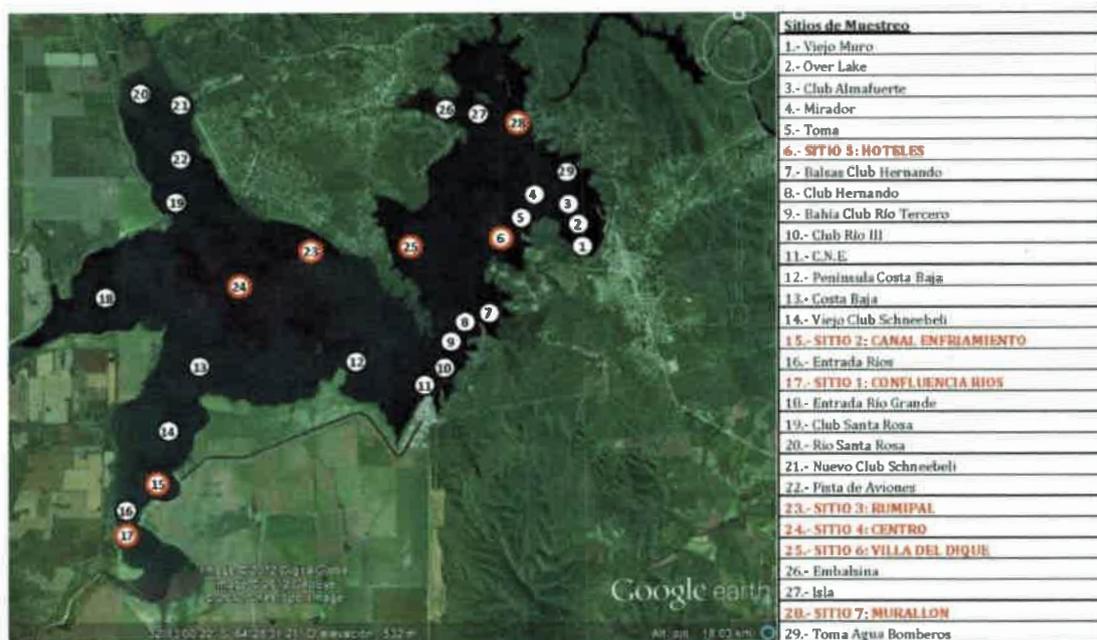


Figura 43. Embalse de Río Tercero. Sitios de muestreo

V.5.2. ANALISIS DE LAS MUESTRA REALES

V.5.2.1. DETERMINACIÓN DE CHL EN LAS MUESTRA REALES

De las muestras de 1 L se tomaron 250 ml (por duplicado) para extraer y cuantificar Chl *a* total usando el método GEMS/AGUA. Del volumen restante de cada muestra se tomaron ~ 5 ml para realizar los estudios espectroscópicos; i.e. con la finalidad de registrar sus espectros de emisión y de excitación. Dadas las características de las muestras reales, las condiciones experimentales para la obtención de estos espectros difirió de las utilizadas para obtener los $N(\lambda_{exc})$. Como se demuestra en la siguiente sección, este cambio de las condiciones no invalida el posterior análisis de las muestras usando el método de Beutler.

V.5.2.2. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LAS MUESTRAS

Durante la obtención de los espectros de emisión y excitación de las muestras reales aparecieron diversas anomalías no observadas en el estudio de los cultivos celulares para la construcción de los $N(\lambda_{exc})$. Por ejemplo, en la **Figura 44** se compara la evolución en el tiempo de la intensidad de emisión registrada a 680 nm ($\lambda_{exc}=440$ nm) para una muestra colectada en el embalse y un cultivo de *Chlorella vulgaris*. Ambas muestras se hallaban sometidas a agitación (usando un buzo magnético dentro de la celda de fluorescencia) y poseían similares contenidos de Chl total (~ 5 mg/m³). Como puede observarse, el comportamiento de ambas muestras difiere marcadamente. La emisión del cultivo prácticamente no fluctúa en el tiempo observado, mientras que la muestra real exhibe una fluorescencia basal mínima y marcados picos de intensidad. Cabe acotar que dado el diseño del experimento (fluorescencia detectada a 90° y con los monocromadores de excitación y emisión fijos a 440 y 680 nm, respectivamente), puede descartarse que estos picos de intensidad correspondan a la dispersión de la luz de excitación.

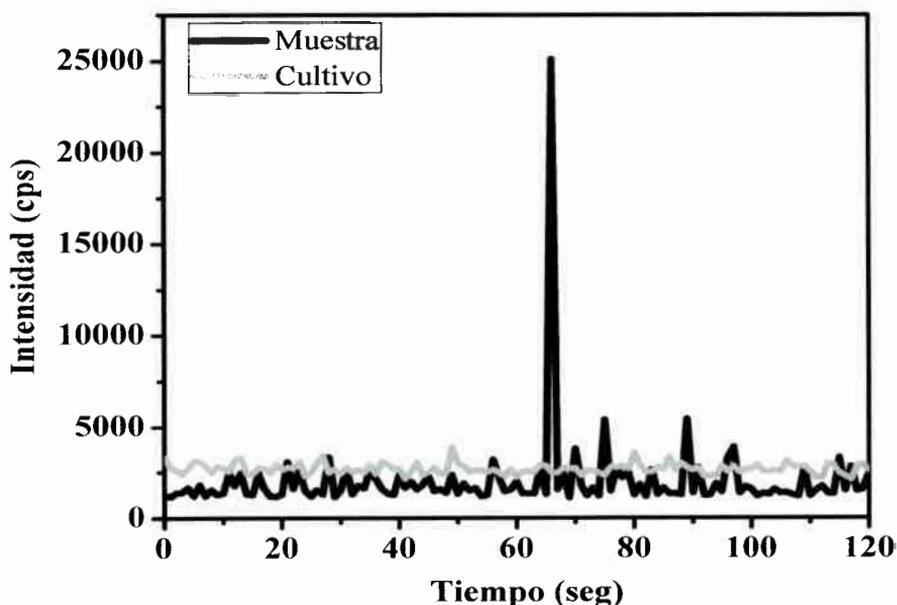


Figura 44. Comparación en el tiempo de la intensidad de emisión (a 680 nm) de una muestra recolectada en el embalse del Río Tercero y un cultivo de *Chlorella vulgaris*

Como era de esperar, estas fluctuaciones también afectan los espectros de excitación de las muestras reales incrementando sensiblemente la relación señal/ruido. A fin de disminuir el ruido de los espectros de excitación, estos fueron promediados 16 veces. Por otra parte, para conservar el tiempo de irradiación de la muestra, se disminuyó el tiempo de integración (ver sección IV.3). Así, los $N(\lambda_{exc})$ se obtuvieron con un tiempo de integración de 0,5 s, mientras que los de las muestras reales con 0,01 s. A modo de ejemplo, en la **Figura 45** se muestran los 16 espectros de excitación tomados para una muestra real (con agitación) y el correspondiente promedio. Un incremento en el número del espectros (de 16 a 32 ó 64 en total) no produjo una mejora sustantiva de la calidad del espectro, por lo que el promedio de 16 espectros fue considerado como representativo de las muestras y viables de ser posteriormente analizados.

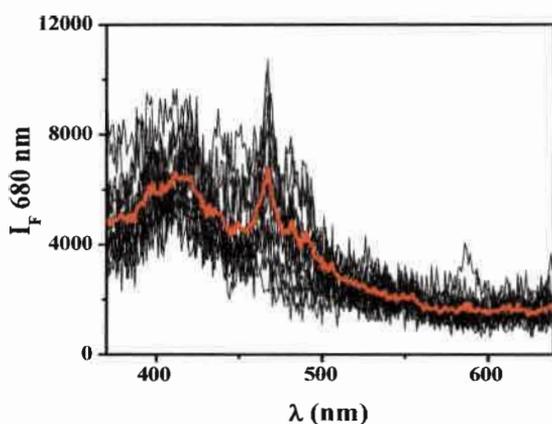


Figura 45. Espectros de excitación tomados con agitación para una muestra real y el correspondiente promedio de 16 espectros (traza roja)

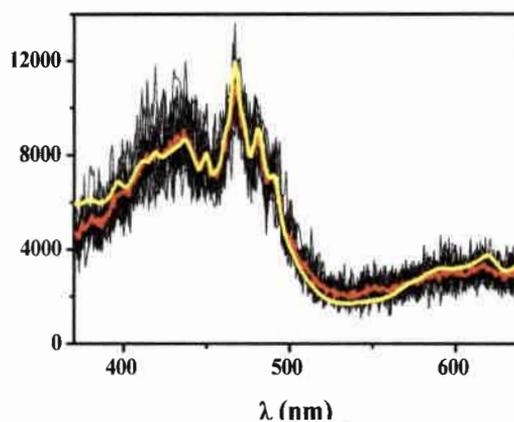


Figura 46. Espectros de excitación tomados con agitación para un cultivo mezcla, el correspondiente promedio de 16 espectros (traza roja) y un único espectro de excitación (traza amarilla)

En la **Figura 46** se comparan los espectros de excitación de una mezcla de dos cultivos (*Chlorella vulgaris* y *Microcystis* sp.) obtenidos como: a) un

promedio de 16 espectros con tiempos de integración 0,01 s y b) un único espectro obtenido con tiempo de integración de 0,5 s. Al realizar el ajuste de los espectros obtenidos en a) y en b) usando el método de Beutler se obtuvieron valores similares de Chl de ~ 10 y ~ 1 mg/m^3 para *Chlorella vulgaris* y *Microcystis* sp., respectivamente. Este experimento fue repetido para diversas mezclas algales obteniéndose en todos los casos resultados similares para Chl *a*. Esto demuestra que los espectros de excitación promedio pueden ser utilizados para su análisis según el método de Beutler.

Cabe preguntarse cuál es la diferencia entre las muestras reales y las cultivadas que lleva a las fluctuaciones mostradas en la **Figura 44** y la gran dispersión observada en los espectros en la **Figura 45**. En principio, esto podría deberse al estadio o estado de desarrollo de la población algal de las muestras. Esta posibilidad se discute en detalle al final de esta sección.

A continuación, se presentan algunos de los resultados del análisis de muestras reales usando el método de Beutler *et al.* La **Figura 47** muestra el análisis realizado para la muestra N° 9 colectada en la Bahía Club Río Tercero en el mes de mayo de 2010. La traza negra corresponde a la muestra real y la gris a la simulada a partir de los parámetros de ajuste.

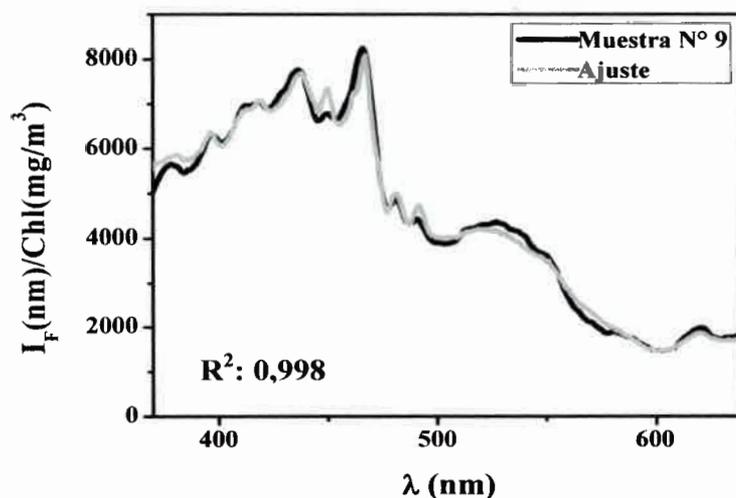


Figura 47. Ajuste realizado del promedio de los espectros de excitación, a partir de la muestra N° 9, tomada durante el mes de mayo de 2010 en la Bahía Club Río Tercero

La calidad del ajuste es muy aceptable (R^2 : 0,998) teniendo en cuenta la complejidad del problema abordado. Los resultados indican el predominio del grupo de las diatomeas (18 mg Chl/m^3) sobre las clorofitas (1 mg Chl/m^3) y rojas (1 mg Chl/m^3) y la completa ausencia de cianofitas y dinoflagelados. El error de los valores de Chl arrojados por el método de regresión múltiple no supera en ningún caso el 5%. De acuerdo al método, la Chl *a* total es 20 mg/m^3 .

Cabe aquí adelantar que todas las muestras analizadas, independientemente de la estación del año en que fueran colectadas, mostraron el predominio de las diatomeas sobre los demás grupos algales.

La **Figura 48**, corresponde a la recolectada durante el muestreo realizado en el mes de marzo de 2010 en la península Costa Baja y es uno de pocos casos en que la existencia de cianofitas (4 mg Chl/m^3) fue constatada. De acuerdo al análisis espectrofotométrico, la muestra también posee diatomeas (5 mg Chl/m^3), dinoflagelados (4 mg Chl/m^3) y clorofitas (1 mg Chl/m^3).

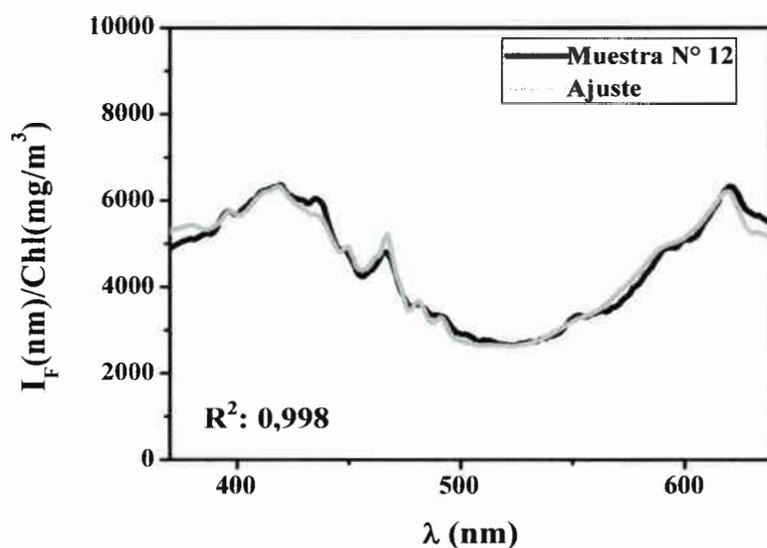


Figura 48. Ajuste realizado del promedio de los espectros de excitación de la muestra N° 12, correspondiente al mes de marzo de 2010 en la península Costa Baja

Por último, en la **Figura 49** se representan los resultados obtenidos para la muestra N° 5 colectada en la Toma en el mes de septiembre de 2010 donde todos los géneros de algas estudiados estuvieron presentes. Según el análisis, esta contiene diatomeas ($3 \text{ mg/m}^3 \text{ Chl } a$), clorofitas, rodofitas y dinoflagelados (2 mg/m^3 por grupo) y $< 0,5 \text{ mg/m}^3$ de $\text{Chl } a$ aportado por cianofitas.

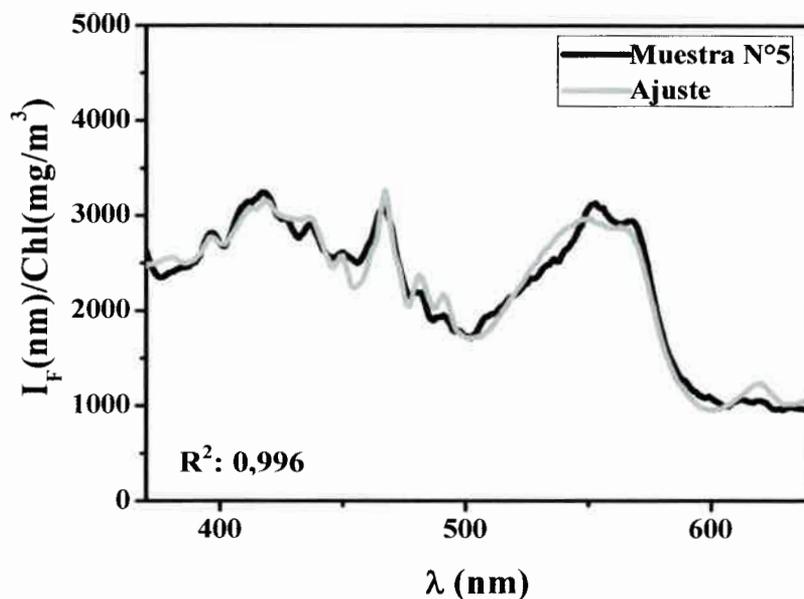


Figura 49. Ajuste realizado del promedio de los espectros de excitación de la muestra N° 5 tomada de la toma en el mes de septiembre de 2010

V.5.2.3. RELACIÓN ENTRE LA CHL a TOTAL CALCULADA POR EL METODO GEMS/AGUA Y LA CALCULADA USANDO EL METODO DE BEUTLER

El monitoreo del reservorio durante un plazo prolongado permitió, en principio, obtener datos estadísticamente significativos sobre la distribución espacial y temporal de $\text{Chl } a$ total y también datos relevantes sobre el actual grado

de eutrofización de este importante embalse. Como se indicó anteriormente, para los seis muestreos se determinó Chl *a* total usando ambos métodos: el estandarizado GEMS/AGUA y el espectrofotométrico (Beutler *et al.*^[19]).

La **Figura 50** muestra una comparación entre los valores de Chl *a* total calculada por ambos métodos, correspondiente al muestreo de otoño de 2011. La línea recta simboliza la correlación ideal. Como puede concluirse de la figura, el método fluorimétrico claramente sobreestima la concentración del pigmento en las muestras. Similares resultados se observaron en un total de 174 muestras (por duplicado) recolectadas durante los seis muestreos realizados durante el período comprendido en los años 2009-2011.

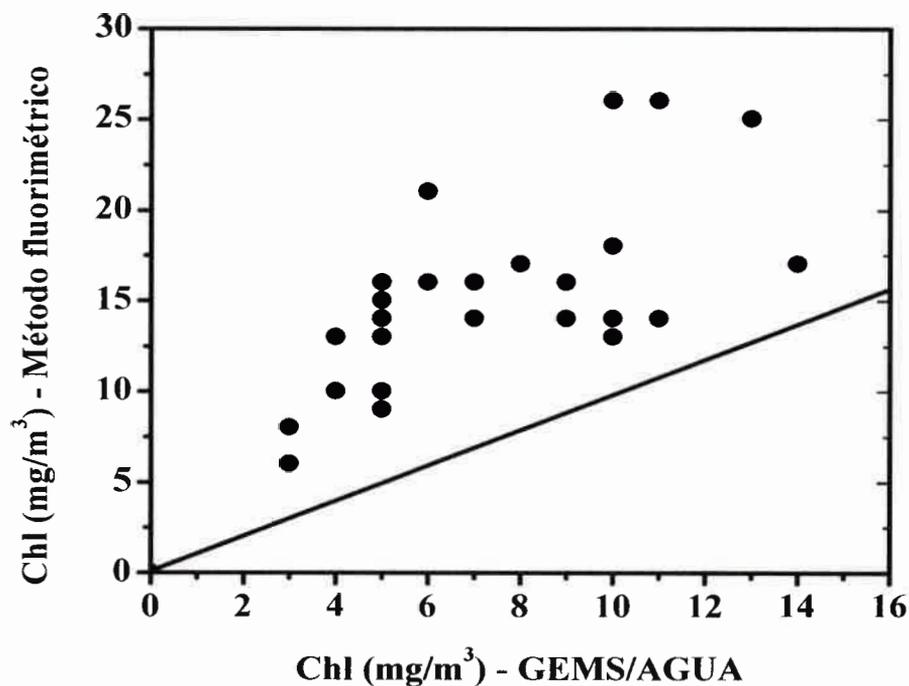


Figura 50. Comparación entre los valores de Chl *a* total calculada por ambos métodos, correspondiente al muestreo de otoño de 2011

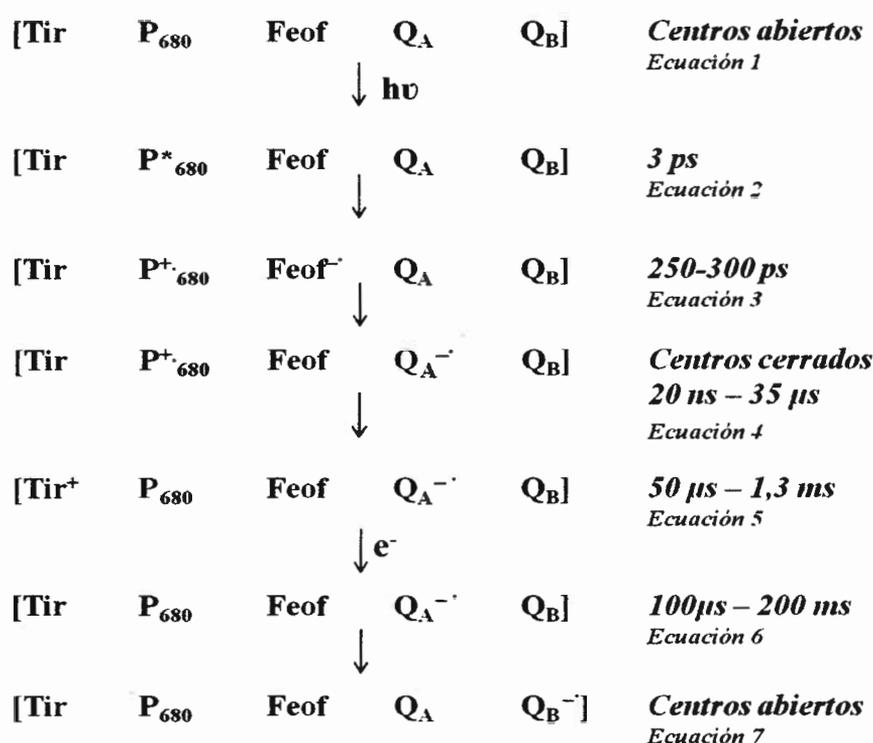
Para entender este comportamiento que, en principio, indicaría que el método de Beutler *et al.*^[19] no es apropiado para determinar cualitativa y cuantitativamente las poblaciones algales presentes en las muestra reales, es necesario comprender (en detalle) el funcionamiento del sistema fotosintético de los grupos algales estudiados y como se ve afectado por las condiciones ambientales.

En la sección III.3.3 se mostraron los aspectos más importantes de la composición y funcionamiento de un PS algal. Se discuten a continuación los procesos involucrados, las ventanas temporales en las cuales ocurre y el origen de la fluorescencia del PSII.

La ecuación 1 del **Esquema 1**, representa al centro de reacción del PSII completamente oxidado o “abierto”. Cuando la Chl *a* recibe un fotón (lo más probable, vía un proceso de *TE* desde pigmentos accesorios que conforman la antena) es promovida a su estado singulete excitado y transfiere un electrón (e^-) a la feofitina (Feof) vecina. Este proceso se muestra la ecuación 2 del esquema cinético y transcurre dentro de los 3 primeros ps posteriores a la excitación. Este proceso es tan rápido que compite con la emisión de la Chl *a*, por lo que la fluorescencia del pigmento se halla inhibida en gran medida. En una segunda etapa, el aceptor de e^- primario (Feof $^{\cdot-}$) transfiere térmicamente su carga al aceptor secundario: la quinona A (Q_A). Este proceso ocurre entre los 250-300 ps y está representado por la ecuación 3 del **Esquema 1**. Tras la transferencia del e^- se forma el centro de reacción del PSII reducido o “cerrado”. Como se muestra en la ecuación 4, en esta etapa la Chl se encuentra oxidada siendo incapaz de recibir un segundo fotón. En otras palabras el centro cerrado es incapaz de iniciar la fotosíntesis. En la ecuación 5 se muestra la *Te* $^{\cdot-}$ desde el dador secundario tirosina (Tir) al catión radical de la Chl *a*. Esto transcurre en un tiempo de $\sim 50 \mu s$ a 1.3 ms. En este punto es importante resaltar que el sistema cerrado es fluorescente ya que la Chl *a* es capaz de absorber un nuevo fotón pero incapaz de ceder un e^- a la Feof vecina hallándose aún reducida la Q_A (ecuación 6). Finalmente, el sistema fotosintético se recupera (vuelven a formarse los centros “abiertos”) cuando la $Q_A^{\cdot-}$

transfiere su e⁻ a la Q_B (ecuación 7). Esto ocurre aproximadamente entre los 100 μs a 200 ms.^[128,136]

Resumiendo, el PSII presenta dos estados: el centro de reacción “abierto” (donde la Chl *a* es escasamente fluorescente, pero activa para la fotosíntesis) y el centro de reacción “cerrado” (donde la Chl *a* emite eficientemente, pero es inactiva para el proceso fotosintético).



Esquema 1. Esquema cinético de los procesos que ocurren en el PSII. Tir: tirosina.

Feof: feofitina. Q_A: quinona A. Q_B: quinona B.

La **Figura 51** muestra la intensidad de fluorescencia para una muestra algal “ideal” en función del tiempo y bajo diferentes intensidades de iluminación. Si se considera que la muestra a ser estudiada fue previamente sometida a un período de oscuridad y luego iluminada con una haz de baja intensidad (haz de medición), la

fluorescencia observada se denomina fluorescencia basal o F_0 . En estas condiciones, los centros de reacción se encuentran “abiertos” y la fluorescencia de la Chl *a* es mínima. Si la muestra es iluminada con luz actínica (luz que simula la calidad y cantidad de radiación que recibe el fitoplancton en la zona fótica) la emisión del PSII se incrementa rápidamente hasta alcanzar un estado estacionario. En esta situación una buena parte de los centros de reacción se hallan “cerrados”, lo que justifica el incremento de la intensidad de fluorescencia observada. Si la muestra es llevada a la oscuridad los centros de reacción se “reabren” rápidamente y la muestra se torna “no-fluorescente” nuevamente. Por lo general, luz actínica no es de gran intensidad como para producir saturación del sistema fotosintético. Así, si se somete la muestra a un pulso de luz muy intenso, todos los centros de reacción se encontrarían “cerrados” y se registraría la máxima fluorescencia posible del sistema o F_m . Si el pulso saturante es interrumpido el sistema se relaja a las condiciones iniciales como se muestra en la **Figura 51**.^[128,137,138]

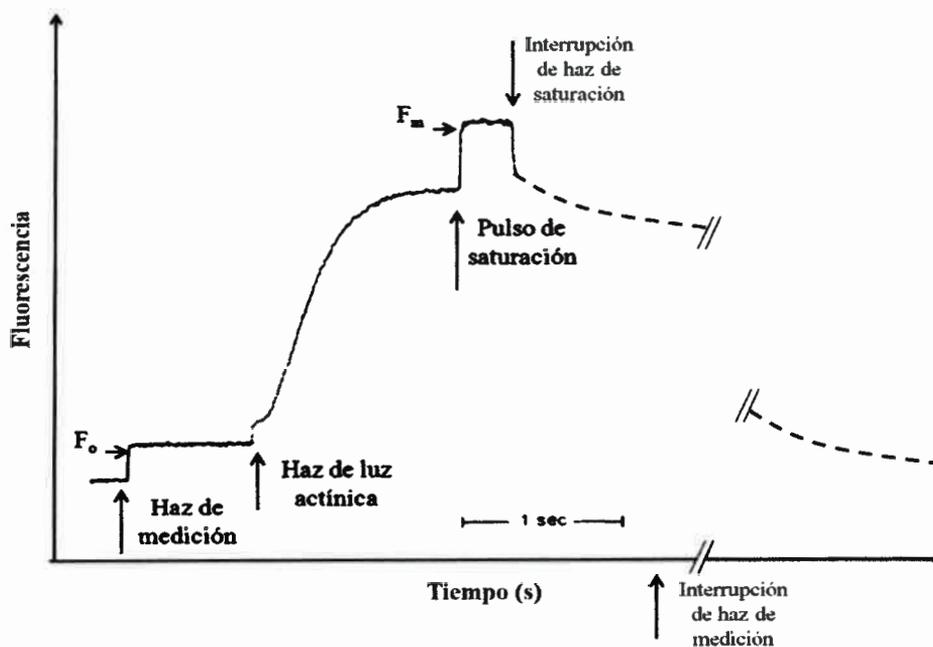


Figura 51. Intensidad de fluorescencia para una muestra algal ideal en función del tiempo y bajo diferentes intensidades de iluminación

Finalmente, con fines analíticos, las muestras son generalmente estudiadas utilizando muy bajas intensidades de excitación a fin de observar la fluorescencia basal (F_0). En principio, F_0 es proporcional al número de PSII en la muestra y permite evaluar directamente la concentración de Chl *a*.^[128] Notar que estas son las condiciones utilizadas en esta tesis, debido a que las muestras fueron conservadas en oscuridad hasta el momento del análisis y sólo fueron iluminadas con la luz de baja intensidad del fluorómetro utilizado.

Dependiendo de las condiciones del hábitat, las microalgas pueden desarrollarse en condiciones óptimas o en condiciones de estrés (deficiencia de nutrientes, cambios bruscos de temperatura, irradiación solar escasa o muy intensa, etc.). Luego, el hábitat condiciona el estadio de desarrollo de la población algal, la cual puede encontrarse en fase desarrollo exponencial, estacionaria o de muerte. Se acepta que el envejecimiento celular puede llevar a:

a) una desconexión/desacople entre la Chl *a* y las antenas periféricas, produciendo un decrecimiento de la intensidad de fluorescencia del PSII

b) un daño irreversible en la cadena de transporte de electrones en el PSII, provocando un incremento en la rendimiento cuántico de emisión de la Chl *a*. Ambos efectos pueden ocurrir simultáneamente no pudiéndose, *a priori*, precisar la importancia relativa de los mismos.^[128,139]

Recordar que en el desarrollo de esta tesis los $N(\lambda_{exc})$ y los espectros de excitación de las muestras reales fueron obtenidos en las siguientes condiciones:

a) La estimación Chl *a* por el método fluorimétrico se realizó a partir de muestras del embalse que fueron conservadas en la oscuridad por 12 hs a 4 °C antes de su análisis. Siendo así, debería esperarse que todos los centros de reacción de los PS se hallaran “abiertos”.

b) La intensidad de luz utilizada para obtener los espectros de excitación fue siempre mínima (condiciones analíticas) por lo que la fluorescencia registrada debería corresponder a la basal (F_0).

c) El ajuste de los espectros de excitación promedio de las muestras reales fue en todos los casos aceptable ($R^2 > 0.996$), sugiriendo que la forma de los $N(\lambda_{exc})$ es la apropiada.

d) La cantidad de Chl *a* total de muestras mezcla-problema (sección V.5.2.2) calculada a partir de los $N(\lambda_{exc})$ y usando el método GEMS/AGUA coinciden aceptablemente.

Luego, la sobreestimación de Chl *a* total en las muestras reales solo puede deberse a que:

- i. la intensidad de los $N(\lambda_{exc})$ se halle subestimada
- ii. la intensidad de fluorescencia de las algas presentes en las muestras posean un rendimiento cuántico mayor al de las cultivadas.

En estudios previos, Beutler *et al.*^[19] demostraron que los $N(\lambda_{exc})$ construidos a partir de cultivos (de diversos grupos algales) que se encontraban en la etapa de crecimiento exponencial, presentaban formas e intensidades invariables. Esto descarta entonces la posibilidad i) y se halla en pleno acuerdo con el punto d). En el mismo estudio, los autores reportaron que los $N(\lambda_{exc})$ obtenidos para cultivos en la fase estacionaria/muerte, muestran un incremento de la intensidad mayor al 50%. Beutler *et al.* especularon que este efecto podía deberse a cambios en la composición de los pigmentos de las antenas periféricas. Como se explicó anteriormente, el envejecimiento celular puede causar, además, el deterioro del PSII provocando un aumento en la intensidad del espectro de emisión (y excitación) de las algas sometidas a estrés.

Así, los resultados mostrados en la **Figura 50** pueden interpretarse como una consecuencia de la diferencia en el desarrollo que presentaban las algas en las muestras reales y las utilizadas para la construcción de los $N(\lambda_{exc})$. Esta interpretación también explica lo observado en la **Figura 44**. La relativa estabilidad de la emisión del cultivo indica que las células poseen propiedades fluorescentes similares. En contraste, las fluctuaciones de la emisión en la muestra real, estaría indicando que la composición de la misma es heterogénea. Ciertas células presentarían propiedades fluorescentes normales mientras que otras (altamente fluorescentes) poseerían alterado en distintos grados sus aparatos fotosintéticos.

V.5.2.3. OTROS ANTECEDENTES DE LA APLICACIÓN DEL METODO DE BEUTLER

Tal cual lo adelantado en la sección II.3.3.1, el método de Beutler fue inicialmente pensado para la construcción de un fluorómetro sumergible que permitiera identificar *in situ* la población algal presente en un reservorio. Tal dispositivo se encuentra actualmente en el mercado y su uso ha sido reportado en diversas oportunidades.^[19,140,141,142,143,144,145]

La **Figura 52** muestra un gráfico equivalente a la **Figura 50** publicado por Beutler *et al.*^[19] del que puede concluirse que la correspondencia entre la Chl *a* medida por el sumergible y por métodos estandarizados coinciden plenamente. Cabe notar, sin embargo, que existe una gran diferencia entre las concentraciones de Chl *a* total medida por esos investigadores (~15-200 mg/m³) y las encontradas en los distintos muestreos realizados en el embalse de Río Tercero (~ < 18 mg/m³). En principio, valores de Chl *a* total mayores a 50 mg/m³ son indicativos de un florecimiento algal.^[134]

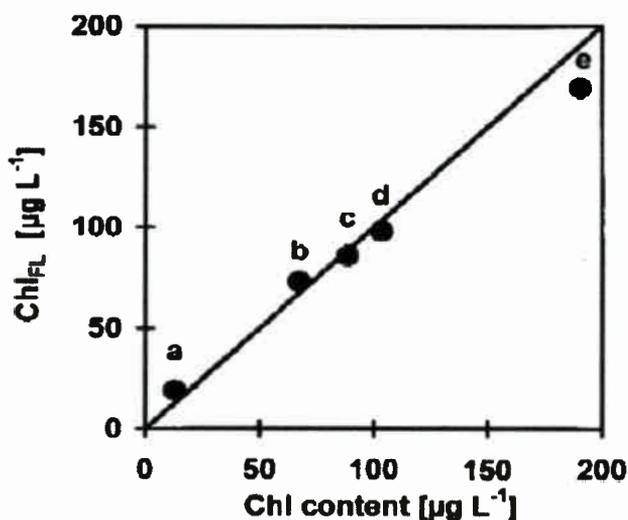


Figura 52. Determinación del contenido de Chl en el Schlei fjord. Comparación entre la concentración de Chl detectada fluorométricamente (ChlFL) y contenido de Chl determinado por análisis HPLC

Aparentemente, Beutler *et al.*^[19] determinaron el contenido de Chl *a* total de muestras “*in situ*” con grupos algales en plena fase de desarrollo exponencial; esto es, las microalgas observadas y los cultivos usados para construir los $N(\lambda_{exc})$ se hallaban en un similar grado de desarrollo. En nuestro caso, es difícil definir en que estadio de desarrollo se encontraban las algas presentes en las muestras reales, ya que valores de Chl *a* < 18 mg/m³ pueden ser asignados a cualquier etapa de crecimiento. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar un envejecimiento de las microalgas en las muestras reales y de allí la imposibilidad de que el análisis fluorimétrico sea capaz de predecir correctamente el contenido de Chl *a* total de las muestras.

En otros estudios en los que también se utilizó el método de Beutler se encontraron discrepancias importantes entre el contenido de Chl *a* en muestras reales (calculados por métodos estandarizados) y los valores obtenidos utilizando la sonda comercial. Coincidentemente, estas discrepancias se observan a bajas concentraciones de Chl *a* y fueron atribuidas a la presencia de materia orgánica o sedimentos en suspensión en las muestras analizadas. Sin embargo, no fueron provistas pruebas taxativas de la existencia de estos interferentes.^[141]

En una publicación muy reciente de Catherine *et al.*^[141] se llega a conclusiones muy similares a las arribadas en esta tesis. Estos autores confirman que las concentraciones de Chl *a* calculadas por el método de Beutler no son confiables cuando la biomasa algal es pequeña debido a la variación en el funcionamiento del aparato fotosintético de estos microorganismos. Atribuyen las deficiencias observadas del método a que actualmente se desconoce como los factores ambientales afectan el rendimiento cuántico del PSII y consecuentemente a los $N(\lambda_{exc})$. Catherine *et al.* concluyen también que a pesar de estas limitaciones intrínsecas del método, las técnicas fluorimétricas para la detección y cuantificación de microalgas siguen siendo, por mucho, las más sensibles y por lo tanto, de gran potencialidad de aplicación en el futuro inmediato.

Así, los estudios reportados en esta tesis doctoral permiten concluir:

1) El método de Beutler es adaptable al uso de fluorómetros convencionales, por lo que su aplicación puede extenderse a la mayor parte de los laboratorios donde se monitorea la calidad de agua para su consumo.

2) Permite identificar la presencia de diversos grupos algales en muestras pequeñas (< 2 ml) en forma rápida y precisa. La detección de algas dañinas (tales como las cianofíceas) resulta de extraordinaria simplicidad, por lo que una simple prueba fluorimétrica serviría como alerta temprana del posible desarrollo de un florecimiento.

3) Dada la gran sensibilidad de los métodos fluorimétricos es posible revelar la presencia de algas a concentraciones indetectables por métodos tradicionales tales como el recuento celular directo al microscopio óptico.

4) El método generalmente sobreestima la cantidad de Chl *a* calculada para muestras reales. Esto es particularmente cierto cuando la concentración de algas presentes en la muestra es pequeña. Por lo tanto, el método puede considerarse cualitativo y no cuantitativo.

5) Investigaciones a futuro deberían orientarse a estudiar el efecto de las condiciones ambientales sobre los $N(\lambda_{exc})$ de los diversos grupos algales. Creemos que estos estudios podrían mejorar la evaluación cuantitativa de la Chl *a* total en muestras reales.

V.6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS *IN SITU*

En la **Figura 53** se presentan los parámetros físico-químicos registrados *in situ* en los puntos de muestreo 6, 15, 17, 23, 24, 26 y 28, durante el período comprendido en los años 2009-2011.

Los valores promedio de temperatura registrados fueron acordes a cada estación. Según Zunino y Migliori^[146] los promedios de temperatura desde la superficie en el embalse de Río Tercero son de 20°C para primavera y otoño y de 25,5°C y 13°C para verano e invierno, respectivamente. Estos resultados coinciden a los obtenidos en los diferentes períodos en los que fue muestreado el embalse. En los muestreos realizados se detectaron termoclinas temporarias diarias

inestables por calentamiento superficial de las capas superiores. Esto es la consecuencia de las características climáticas reinantes (días muy soleados y escaso viento) con discontinuidades térmicas en algunos puntos de muestreo. En el mismo sentido, otros estudios han informado resultados similares a los aquí reportados.^[60,147,148]

El pH se mantuvo en promedio cerca 8 durante los distintos meses en los que se realizaron los muestreos. Estas condiciones favorecerían el desarrollo de distintos grupos algales y al no presentarse cambios abruptos puede inferirse que en el pH se mantuvo aproximadamente constante a lo largo de todo el período bajo estudio. En otros trabajos previos se reportaron valores de pH similares.^[149,150]

Se determinaron también los valores de OD, elemento nutricional esencial para la mayoría de los organismos vivos, dada su dependencia con el proceso de respiración aeróbica para la generación de energía y para la movilización del carbono en la célula.^[151] Los valores de OD promedio fueron cercanos al valor promedio esperado (9 mg/L). Esto daría indicios que se están llevando a cabo procesos de fotosíntesis y respiración.^[151] Es importante aclarar que este parámetro fue registrado en la zona superficial en donde la concentración de OD es mayor. En la **Figura 53** se observa que al aumentar la temperatura el OD tiende a disminuir. Si bien es conocido que la concentración de oxígeno en agua es inversamente proporcional con la temperatura, esta relación puede verse alterada en ambientes naturales por efecto de los procesos de fotosíntesis y respiración.

Los valores promedio de transparencia, evaluados a través del disco de Secchi^[152] mostraron que la cantidad de materia orgánica disuelta fue escasa. De acuerdo a los valores obtenidos y en base a la clasificación trófica de límites fijos propuesta por la OCDE^[116] este embalse se clasificaría como mesotrófico; mientras que según los valores del índice de Carlson^[117] se clasificaría como oligotrófico. Se podría asumir que este reservorio se encontraría en un estado medio de producción, con variaciones según la estación del año y el sitio de muestreo. En estudios previos se han reportado resultados que coinciden con lo anteriormente expuesto para este recurso hídrico.^[147]

De acuerdo a los resultados obtenidos de contenido de fósforo, y según la clasificación trófica de límites fijos propuesta por la OCDE^[116] y los valores del índice de Carlson,^[117] este reservorio se clasificaría también en estado mesotrófico. Se ha visto en trabajos anteriores que las características de este embalse correspondieron a dicho estado.^[153]

Los valores de Chl *a* total son el promedio de las muestras obtenidas en cada punto durante los períodos de muestreo estudiados. Estos valores se obtuvieron por medio del método GEMS/AGUA (sección IV.3). Según los valores obtenidos de Chl *a* y en base a la clasificación de la OCDE y los valores del índice de Carlson, el embalse se encontraría en estado eutrófico en los todos períodos analizados.

Pierotto *et al.*^[154] informaron en un estudio realizado en este mismo reservorio a partir de las concentraciones de Chl *a* que durante la primavera y el verano el estado fue predominantemente eutrófico, en tanto que durante el otoño e invierno fue mesotrófico.

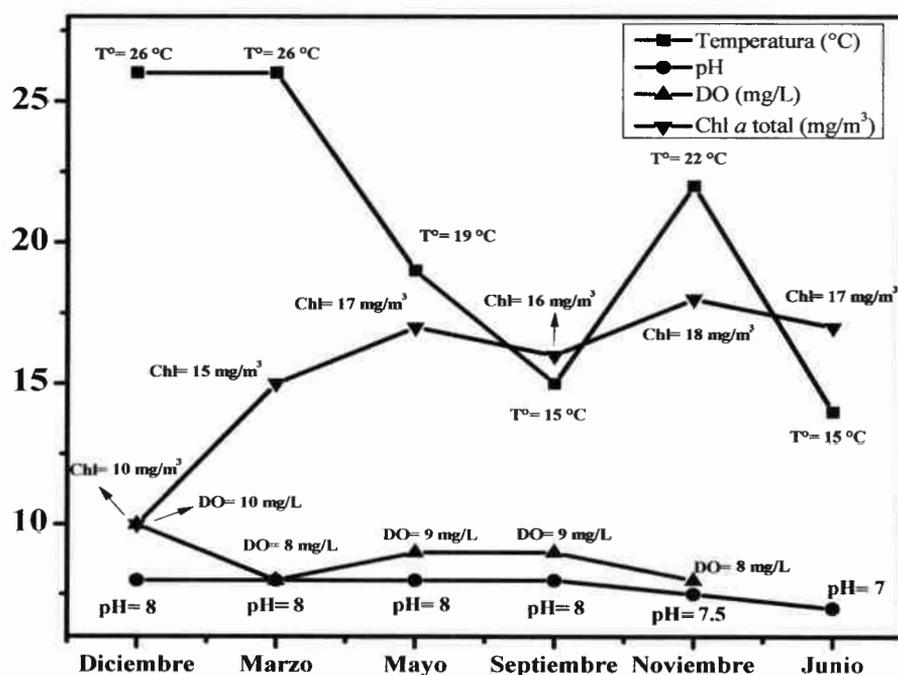


Figura 53. Parámetros físico-químicos tomados *in situ* durante los muestreos realizados en el período 2009-2011

En conclusión, este cuerpo de agua presentaría un moderado enriquecimiento con nutrientes y crecimiento planctónico con escasa acumulación de sedimentos en el fondo.^[28]

Históricamente se han reportado floraciones en este reservorio pertenecientes a *Anabaena spiroides* (cianofíceas), *Peridinium gatunense* (dinoflagelados) y diatomeas con la presencia también de algunas clorofíceas (*Clotarium acicalare* y *Shaerocystis shroeteri*).^[110,155,156,157,158]

En el período estudiado no se observaron floraciones de ningún grupo algal. Nuestros resultados mostraron un importante predominio del grupo de las algas doradas, en una menor proporción dinoflagelados, algas verdes y rojas y prácticamente ausencia de las algas verde azules.

V.7. CONTROL DE LAS POBLACIONES ALGALES

Si este reservorio se hubiese encontrado en un predominante estado de eutrofización con una alta carga de nutrientes se producirían cambios en la calidad del agua, la cual se vería afectada en diferente grado dependiendo del uso para el cual esté destinada y de la fuente de contaminación. Esto llevaría a cambios que se evidencian fundamentalmente por la generación de FAN planctónicas como es el caso particular de las cianobacterias. Por este motivo se decidió comenzar a realizar estudios tendientes a lograr el control de las poblaciones aplicando técnicas que permitan la desinfección del agua. El uso de la fotosensibilización para la producción de $^1\text{O}_2$ mediante energía solar permite el desarrollo de nuevas tecnologías limpias, basadas en energías renovables y aplicables a la desinfección de aguas.

Por este motivo se considera de gran importancia realizar estudios tendientes a controlar las FAN aplicando la técnica de TIF.

V.7.1. TRATAMIENTO CON FOTOSENSIBILIZADORES

V.7.1.1. FOTOSENSIBILIZADORES DERIVADOS DE PORFIRINAS

Los núcleos porfirínicos (**Figura 54**) consisten en cuatro anillos del tipo pirrólico unidos por grupos metino originando un macrociclo. Las porfirinas son estructuras planas con un tamaño de aproximadamente 9 Å de diámetro y con una cavidad central de 4 Å que permite acomodar una gran variedad de iones metálicos, permitiendo por quelación variar diversas propiedades del macrociclo.^[159]

Las porfirinas son sistemas poliaromáticos pocos solubles en solventes orgánicos y prácticamente insolubles en agua. Sin embargo, la adición de diferentes grupos a la periferia del anillo, permite modificar su solubilidad y estudiar sus propiedades en diferentes medios. Para los estudios del género *Microcystis* que se describen en esta sección se utilizó una porfirina tetracatiónica denominada 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi) fenil] porfirina (TAPP⁴⁺) (**Figura 54**) la cual fue cedida por el grupo de Química Orgánica perteneciente a la FCEFQyN de la UNRC. Este sensibilizador porfirínico posee cuatro grupos alquilamonio que lo hace soluble en medios acuosos.

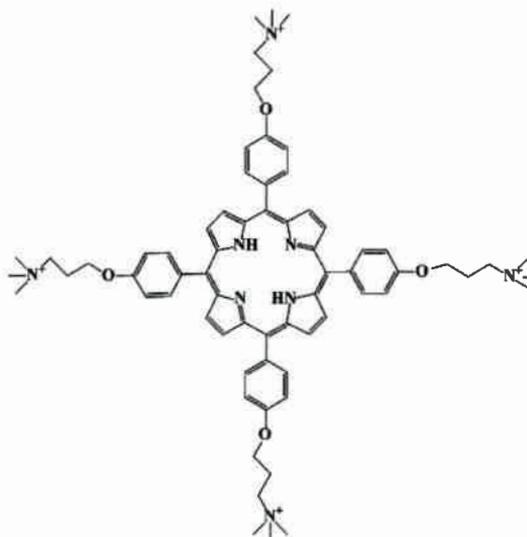


Figura 54. Estructura molecular de TAPP⁴⁺

Como la mayor parte de las porfirinas, la TAPP⁴⁺ muestra dos bandas características en el espectro de absorción: una banda intensa ($\epsilon \sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) alrededor de 420 nm, llamada banda de *Soret*, y cuatro bandas de menor intensidad ($\epsilon \sim 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en la zona comprendida entre 500-700 nm, llamadas bandas *Q* (**Figura 55**).^[160]

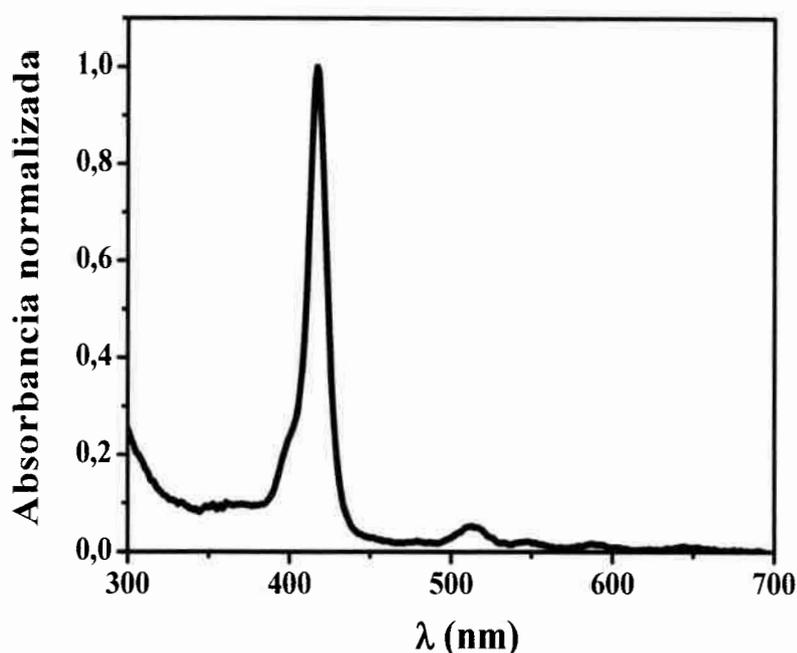


Figura 55. Espectro de absorción de 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi)fenil] porfirina (TAPP⁴⁺) en *N,N*-dimetilformamida (DMF)

El espectro de emisión muestra bandas correspondientes a estados vibrónicos cuyos máximos aparecen aproximadamente a 660 y 720 nm (**Figura 56**). Debido a la estructura rígida que caracteriza a los macrociclos tetrapirrólicos, los espectros de excitación presentan pequeños corrimientos de Stokes. Esto hace que la energía del estado de Franck-Condom sea prácticamente idéntica a la energía del estado singulete excitado relajado.^[161] El rendimiento cuántico de

fluorescencia (Φ_F) de esta porfirina es de de 0,13 en N,N-dimetilformamida (DMF).

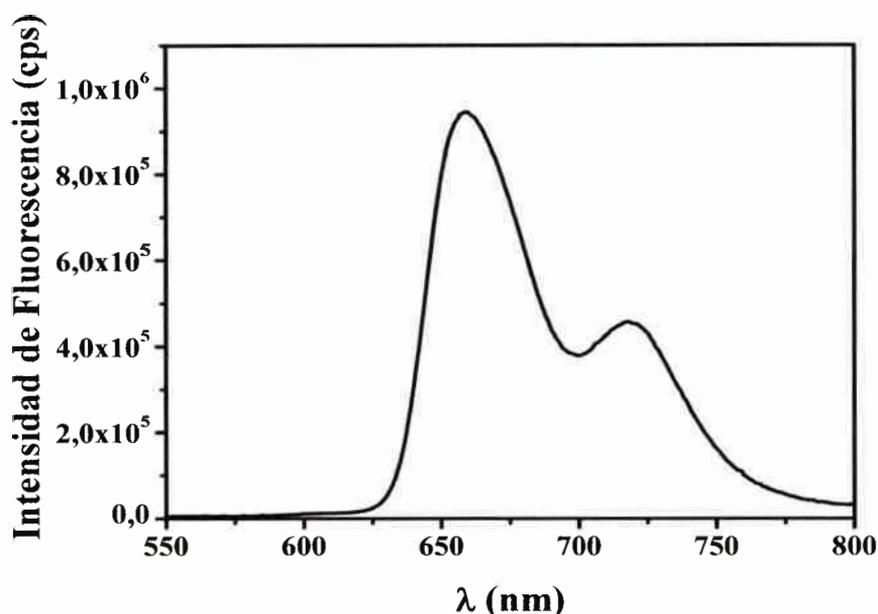


Figura 56. Espectro de emisión de 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N,N-trimetilaminopropoxi)fenil] porfirina (TAPP⁴⁺) en N,N-dimetilformamida (DMF).

Los máximos se presentan a 660 y 720 nm

Este FS fue elegido por las características de la envoltura que presenta la cianobacteria del género *Microcystis*. Como se describe en detalle en la sección II.1.2 esta microalga presenta en su estructura una membrana celular lipoproteica y una pared de mureina. Dicha estructura es muy similar a la de bacterias gram-negativas. Estudios previos demostraron que esta porfirina se adsorbe eficientemente sobre las paredes de bacterias gram-negativas como *Escherichia coli*.^[162]

Es conocido que las porfirinas son sensibles a la luz; por ello el primer ensayo realizado fue estudiar la fotoestabilidad de este FS en solución acuosa. Para los tratamientos por TIF, si el sensibilizador se descompone muy rápido

durante la irradiación, la inactivación de las células microbianas podría ser incompleta. Sin embargo, una dosis de fotosensibilizador y velocidad de fotodescomposición apropiadas permitirían usar la técnica de TIF eficientemente.^[163]

A tal fin, se prepararon dos soluciones a partir de 2 ml de medio de cultivo y 15 μM de TAPP⁴⁺ de un stock en DMF ($6,46 \times 10^{-4}\text{M}$). Esta experiencia fue llevada a cabo bajo las mismas condiciones de irradiación que las usadas para la fotoinactivación de cultivos del género *Microcystis*. Como se observa en la **Figura 57**, a los 4 días la fotodescomposición de la porfirina fue casi completa. Teniendo en cuenta los resultados de fotodescomposición en los tratamientos celulares, se aplicó una nueva dosis del FS a los 14 días dado que los experimentos se prolongaron hasta los 24 días, período aproximado que tarda en desarrollarse un cultivo para el género *Microcystis*.

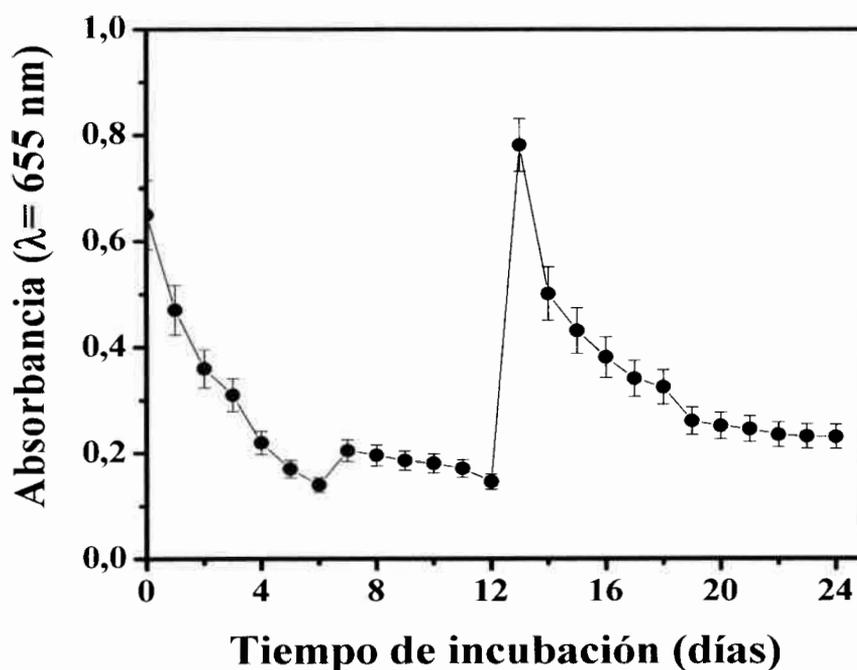


Figura 57. Fotodescomposición de TAPP⁴⁺ analizada siguiendo la absorción de la banda de *Soret* (420 nm)

La fotodescomposición se siguió por medidas de absorbancia. Los espectros de absorción fueron monitoreados en el rango de 300 a 700 nm, siguiendo la absorción de la banda de *Soret* a aproximadamente 420 nm (**Figura 58**). La fotodescomposición probablemente es debida a que la porfirina es capaz de generar eficientemente $^1\text{O}_2^{[164]}$ el cual reacciona finalmente con la porfirina.

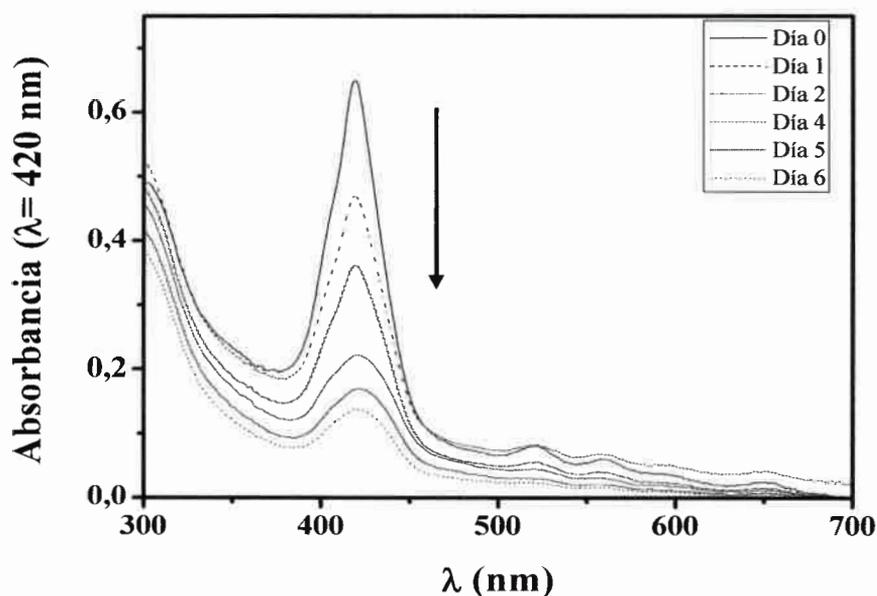


Figura 58. Cambios en el espectro de absorción de TAPP⁴⁺ en función de los días de irradiación

V.7.2. EFECTO DE LA PRESENCIA DEL FS SOBRE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *MICROCYSTIS*

Se realizó el estudio del crecimiento del género *Microcystis* en presencia y ausencia del FS. Para realizar estos experimentos, se prepararon suspensiones celulares (2 mL, $\sim 5 \times 10^6$ cel mL^{-1}) a dos concentraciones del FS: 10 y 20 μM de TAPP⁴⁺. Es importante destacar que la DMF fue eliminada por evaporación a

presión reducida antes de la preparación de las muestras. Para todos los experimentos se llevó un control que sólo contenía la suspensión celular como se esquematiza en la **Figura 59**. Las condiciones de iluminación y temperatura a la que se realizaron los experimentos fueron idénticas a las utilizadas para el estudio de la curva de crecimiento de estos microorganismos.

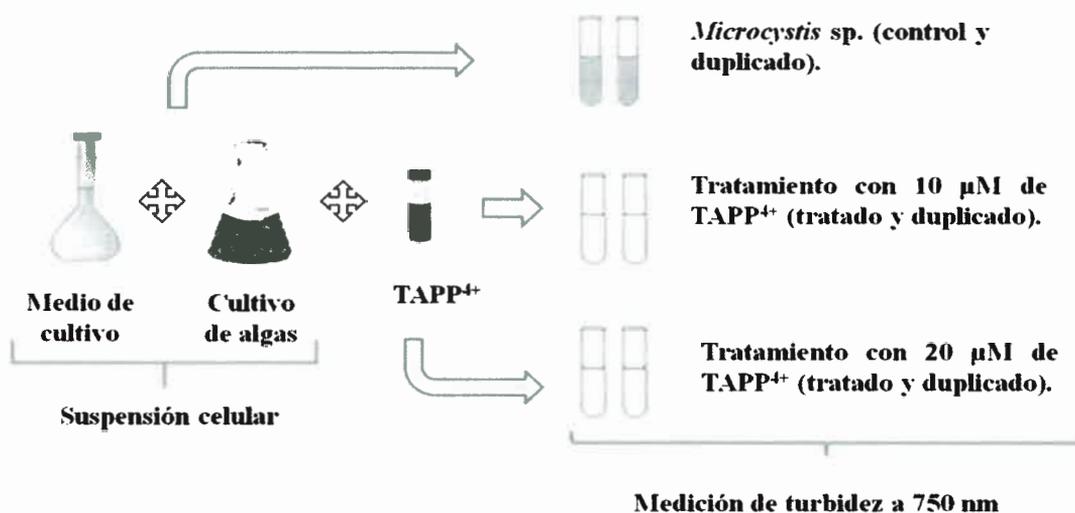


Figura 59. Esquema de la metodología aplicada en los diferentes tratamientos

En la **Figura 60** se muestra la cinética de crecimiento celular en presencia y ausencia (control) del FS. Como puede observarse, con una concentración de 10 µM del FS se produce un retardo en el crecimiento algal y con una concentración de 20 µM de TAPP⁴⁺ su completa inhibición. Este efecto es ya evidente luego de los 4 días de la aplicación del FS.

Estos resultados sugieren taxativamente que la porfirina inhibe el crecimiento del género *Microcystis*, si bien no se puede inferir aún el mecanismo por el cual ocurre.

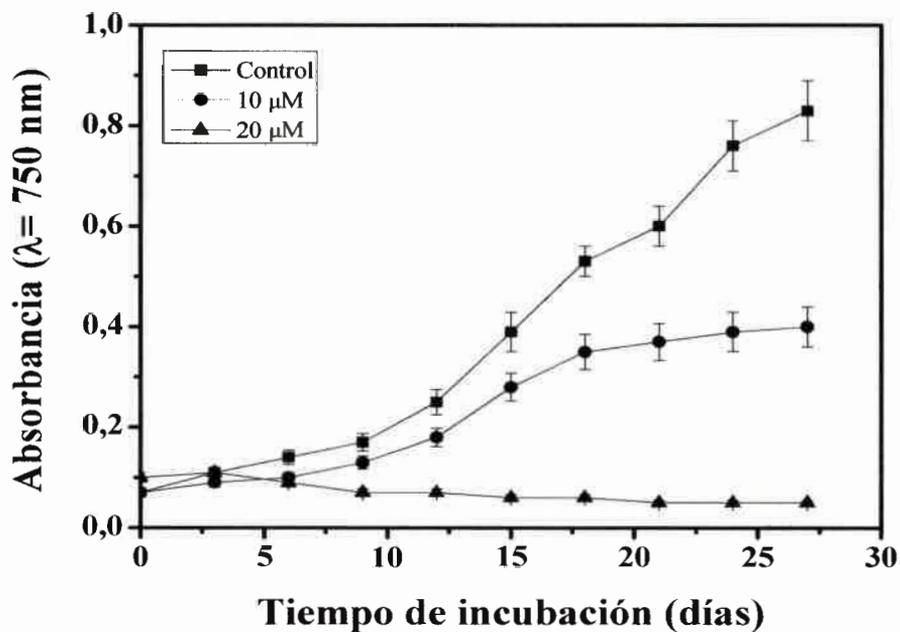


Figura 60. Curva de retardo del crecimiento para el género *Microcystis* incubado con 10 μM de TAPP⁴⁺ (●) y 20 μM de TAPP⁴⁺ (▲) en medio BG₁₁ a 22 °C. Control (■): cultivo sin tratamiento

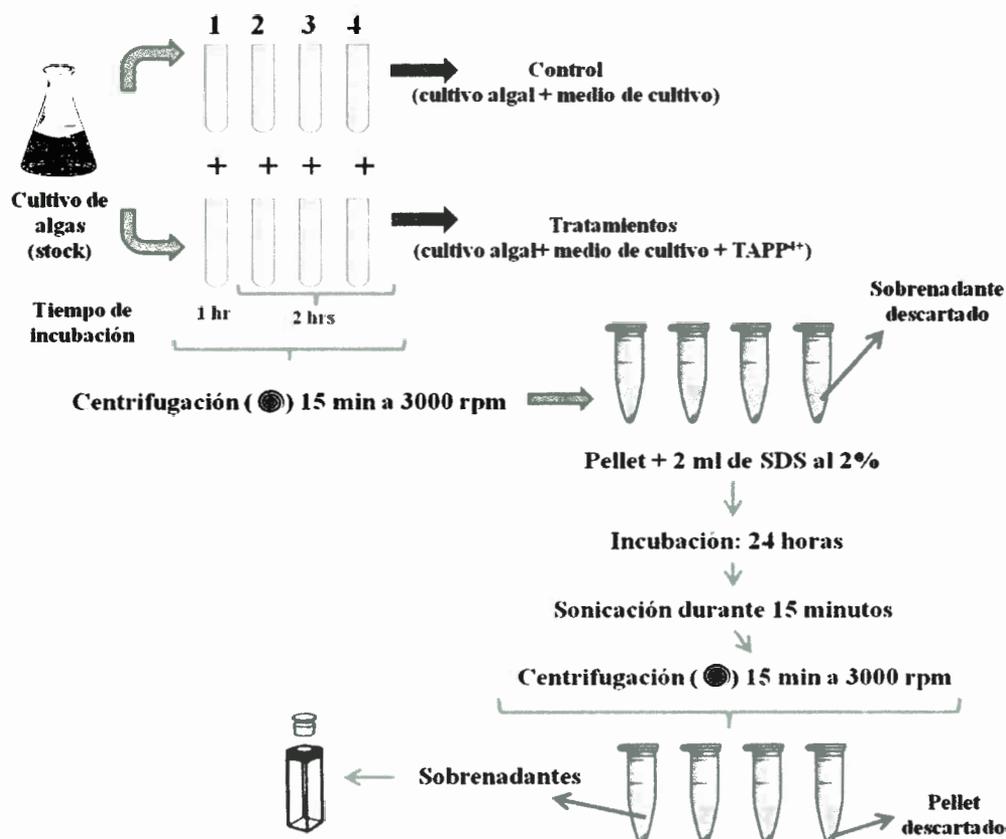
V.7.3. ESTUDIO DE INCORPORACIÓN DEL FS A LAS MICROALGAS

V.7.3.1. ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN DE PORFIRINA POR TÉCNICAS FLUOROMÉTICAS

La metodología utilizada para determinar el porcentaje de incorporación de porfirina se describe en el **Esquema 2**.

La capacidad de la porfirina para unirse a células del género *Microcystis* fue determinada a partir de una suspensión celular de $\sim 5 \times 10^6$ cél ml⁻¹ en medio BG₁₁.^[121] Inicialmente los cultivos del género *Microcystis* fueron incubados con 10 μM de porfirina a diferentes tiempos a 22 °C. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm y el

sobrenadante eliminado. Luego el pellet obtenido, donde se encontraban las células que ya habían incorporado la TAPP⁴⁺, fue resuspendido en 2 ml de SDS al 2%. En estas condiciones se logra la ruptura de las paredes celulares y posterior liberación de la porfirina. Luego de 24 horas de incubación, las muestras fueron nuevamente centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante de cada muestra, conteniendo la porfirina incorporada por las células, fue evaluado por medidas de fluorescencia.



Esquema 2. Incorporación del fotosensibilizador.

El espectro de emisión de la porfirina en las muestras fue monitoreado en el rango de 550 a 800 nm excitando a 515 nm. La intensidad de fluorescencia

medida fue transformada en concentraciones reales utilizando una curva de calibración.

La cantidad de porfirina recuperada luego de diferentes tiempos de incubación es mostrada en la **Figura 61**. Como se observa, el máximo porcentaje de incorporación de porfirina (76%) ya se alcanza en los primeros 60 minutos de incubación.

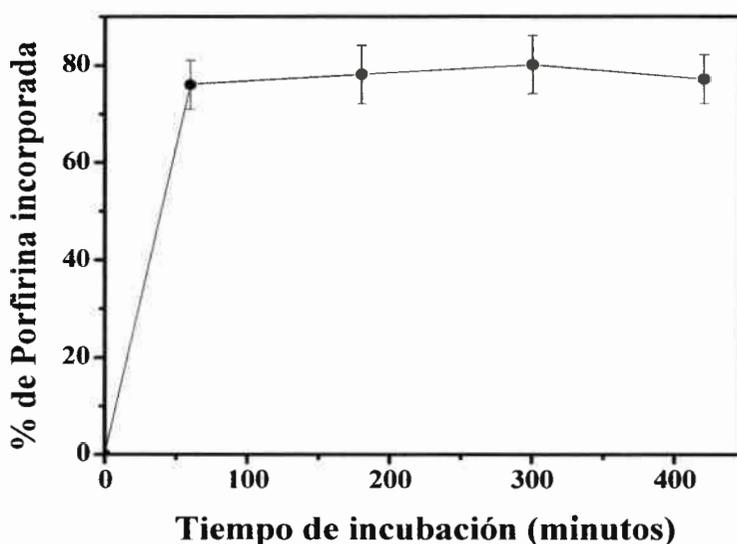


Figura 61. Porcentaje de porfirina incorporada en células del género *Microcystis* tratadas con 10 μM de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 22 $^{\circ}\text{C}$

A continuación se decidió investigar que sucedía antes de los 60 minutos de incubación de las células tratadas con 10 y 20 μM de TAPP⁴⁺. Como puede observarse en la **Figura 62**, el máximo porcentaje de incorporación de porfirina se alcanza (50% para 20 μM y 76% para 10 μM) dentro de los primeros 15 minutos de incubación o quizás antes. Esto sugiere que el FS es incorporado de manera inmediata cuando las células son tratadas.

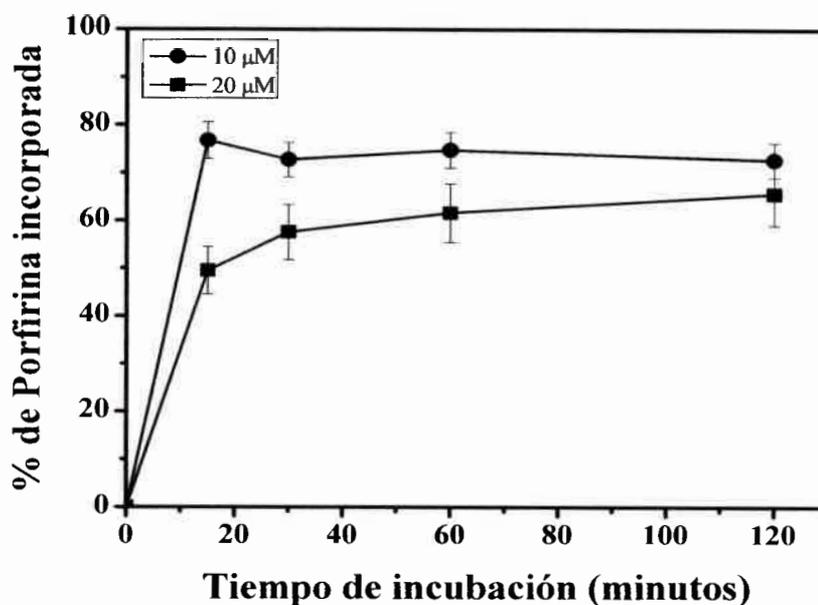


Figura 62. Porcentaje de porfirina incorporada en células del género *Microcystis* tratadas con 10 y 20 μ M de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 22 °C

V.7.3.2. INCORPORACIÓN DEL FS ESTUDIADO POR MICROCOPIA DE CAMPO CLARO Y DE FLUORESCENCIA

Las imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia fueron tomadas utilizando un microscopio Reflected Light Fluorescence modelo L2001BYL-ARCANO (400x, con filtro de paso de banda azul - 450 nm y observación con filtro de banda rojo - 680 nm).

En la **Figura 63** se muestran imágenes de células del género *Microcystis* obtenidas utilizando las técnicas de microscopía óptica y de fluorescencia (400x, con filtro de paso de banda azul - 450 nm y observación con filtro de banda rojo - 680 nm).

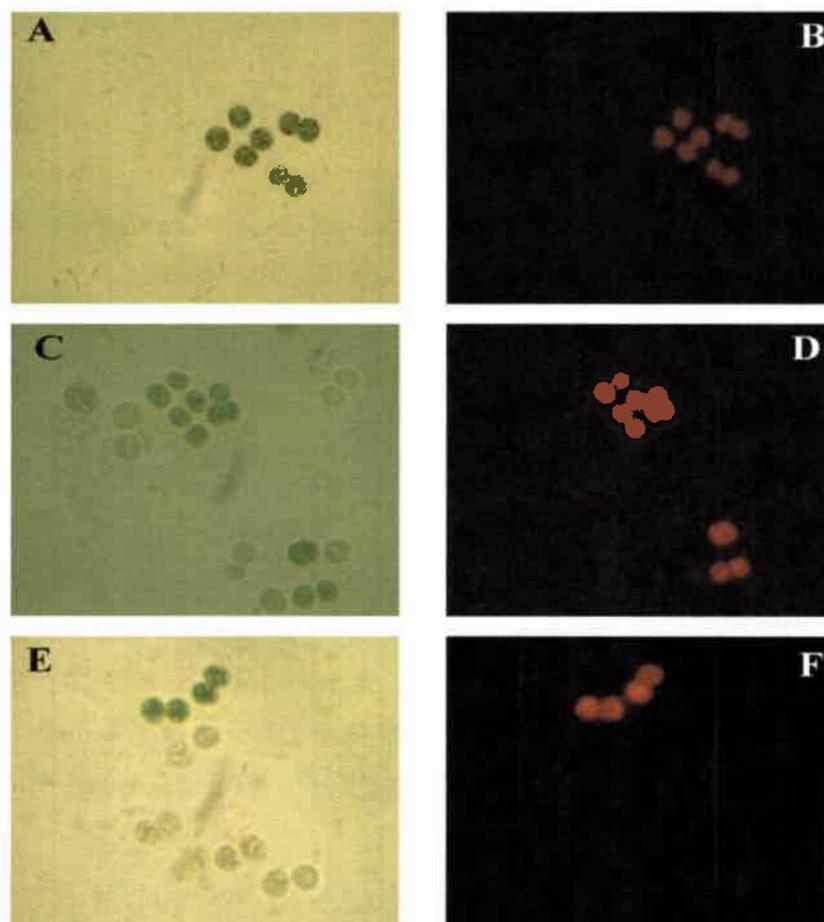


Figura 63. Células del género *Microcystis* observadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia. (A y B) Cultivo control, (C y D) Tratamiento de 10 μM , (E y F) Tratamiento de 20 μM (400x)

La **figura A** corresponde al control observado con microscopía óptica, donde se observan células con un importante contenido celular de Chl *a*. La morfología celular observada fue la esperada para la especie en estudio. En la **figura B** se muestra la fluorescencia característica de las cianobacterias debida a la presencia de Chl *a*. Las **figuras C, D, E y F** corresponden a muestras sometidas a los tratamientos con 10 y 20 μM de TAPP⁴⁺ y observadas luego de 2 horas de

incubación e iluminación en iguales condiciones que en las utilizadas en el cultivo algal.

La primera diferencia entre el control (**A** y **B**) y las muestras tratadas es la aparición de células que aparentemente habrían perdido sus pigmentos característicos. Esta observación se corroboró realizando un conteo celular utilizando para ello una cámara de recuento de Neubauer. A las dos horas de iniciada la experiencia, los valores del recuento celular fueron de $4,9 \times 10^5$ cel ml^{-1} en los tubos control (**A** y **B**), mientras que para los tubos tratados los valores estimados fueron de $3,8 \times 10^5$ cel ml^{-1} y $2,1 \times 10^5$ cel ml^{-1} para 10 y 20 μM , respectivamente. Estos resultados sugieren que la presencia de la porfirina inhibe el crecimiento algal.

Otra observación interesante es que las células tratadas y que aún muestran presencia de Chl *a* (**D** y **F**), presentan un importante incremento en la intensidad de fluorescencia comparadas a las de la muestra control (**B**). Esto sugiere que la porfirina estaría siendo incorporada en estas células. Sin embargo, este resultado no explica porqué las células aparentemente dañadas (sin pigmentos) no incorporan el FS.

V.7.4. ESTUDIOS DE EFECTOS FOTODINÁMICOS

La primera evidencia de efecto fotodinámico se obtuvo cuando se realizó un recuento celular de un tubo control y dos tubos con 20 μM de TAPP⁴⁺ (**Figura 64**) en el período comprendido entre 15-120 min. Uno de los tubos tratados con FS se mantuvo en oscuridad mientras que el control y el otro tubo tratado fueron irradiados con un proyector de diapositivas Novamat 130 AF (Braun Photo Technik, Nürnberg, Germany) equipado con una lámpara halógena de 150 W. La potencia de irradiación de los cultivos fue de ~ 90 mW/cm^2 en el sitio de tratamiento. A los 15 minutos, se realizó el primer recuento celular en todos los tubos. Posteriores recuentos, repitiendo las condiciones de irradiación/oscuridad, fueron repetidos a los 30, 60 y 120 min.

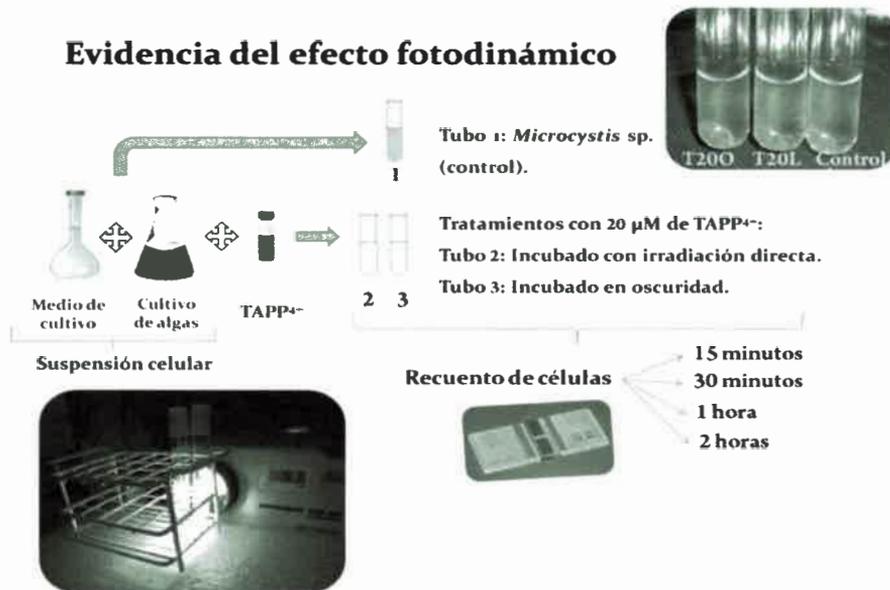


Figura 64. Esquema de la metodología aplicada para evidenciar el efecto fotodinámico de TAPP⁴⁺ en el género *Microcystis*

La **Figura 65** muestra en número de células/ml en los tubos en función del tiempo. Como puede observarse, el número de células crece en el tubo control a medida que se incrementa el tiempo de irradiación. La población de células en el tubo tratado pero mantenido en la oscuridad decrece ligeramente en el tiempo, mientras que el tubo irradiado muestra claramente una disminución del número de algas en el mismo periodo. Estos experimentos demuestran el efecto fotodinámico buscado. Nótese que la inhibición del crecimiento celular solo es observada cuando se combina la presencia del FS con la irradiación de alta potencia.

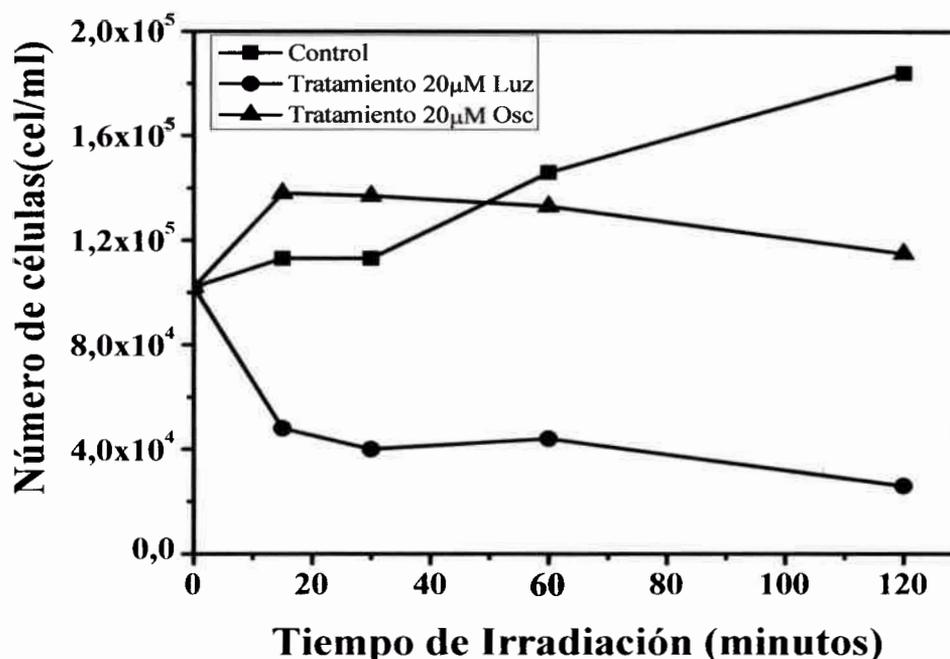


Figura 65. Recuento de células del género *Microcystis* tratadas con 20µM de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 22 °C. Control: cultivo sin tratamiento (■), tratamiento en oscuridad (▲), tratamiento en presencia de luz (●)

Para confirmar el efecto fotodinámico inducido por la TAPP⁴⁺ se realizaron los siguientes experimentos (**Figura 66**).

Primero, se observaron al microscopio la población de algas de cuatro tubos, un control y tres tratados con 20 µM de FS sometidos a diferentes condiciones. El tubo control (**tubo 1**) y uno de los tubos tratados (**tubo 2**) fueron llevados directamente al microscopio para su observación. El **tubo 3** fue irradiado durante dos horas en las mismas condiciones que las usadas para mantener los cultivos y un preparado del mismo observado. El **tubo 4** se mantuvo dos horas en oscuridad antes de ser observado al microscopio.

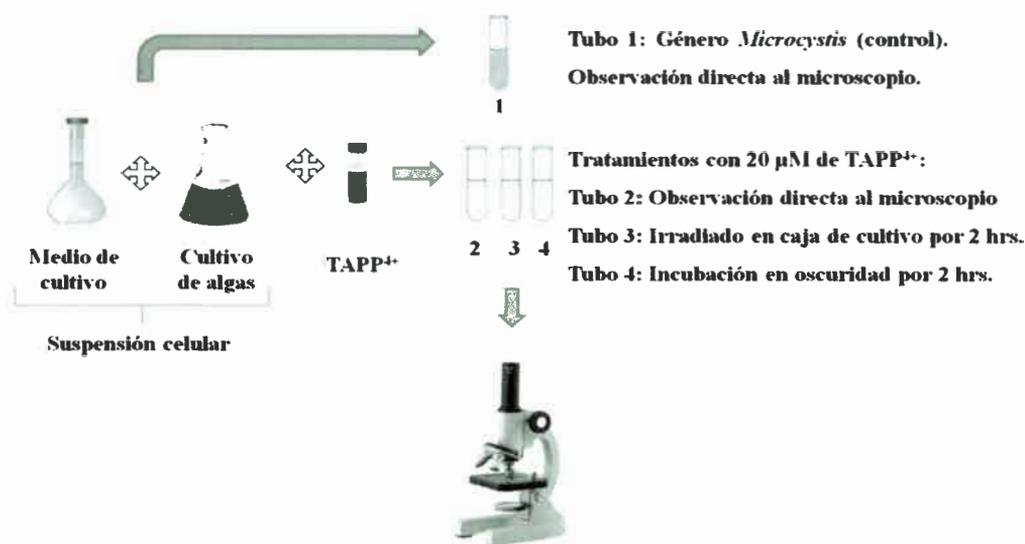


Figura 66. Esquema de la metodología aplicada para demostrar el efecto fotodinámico de TAPP⁴⁺ en el género *Microcystis*

El preparado del tubo control (1) se observó al microscopio durante 40 minutos continuados usando microscopía de campo claro (A) y fluorescencia (B). Durante este período no se observaron cambios en la morfología o pigmentación de las células (Figura 67).

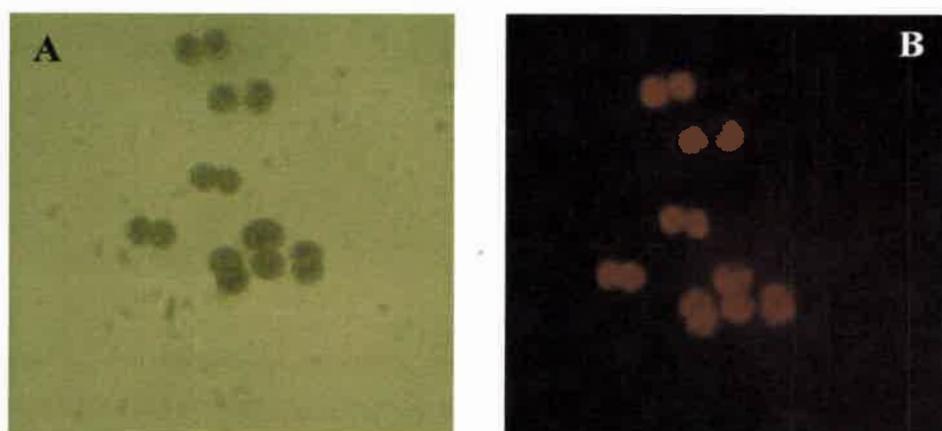


Figura 67. Tubo Control. Células del género *Microcystis* observadas con microscopía óptica (A) y de fluorescencia (B) luego de exposición directa al microscopio (400x)

El preparado del **tubo 2** mostró un comportamiento muy diferente (**Figura 68**). Las figuras **A-D**, corresponden a una secuencia de imágenes capturadas con un video donde se pudo observar la lisis celular. Notar que la célula ubicada en el extremo inferior derecho de la **Figura 68 A y B** sufre una lisis (aproximadamente a los 30 min) perdiendo el contenido de Chl *a* y de la porfirina (FS). En su lugar queda una “célula fantasma” (**Figura 68 - C**) la cual no emite (**Figura 68 - D**). De este experimento puede concluirse que la lisis requiere la presencia de la porfirina y de la luz del microscopio. Cabe recordar que las células del tubo control (sin TAPP⁴⁺) no muestran lisis celular en el mismo período de tiempo o aún más largo (45 min).

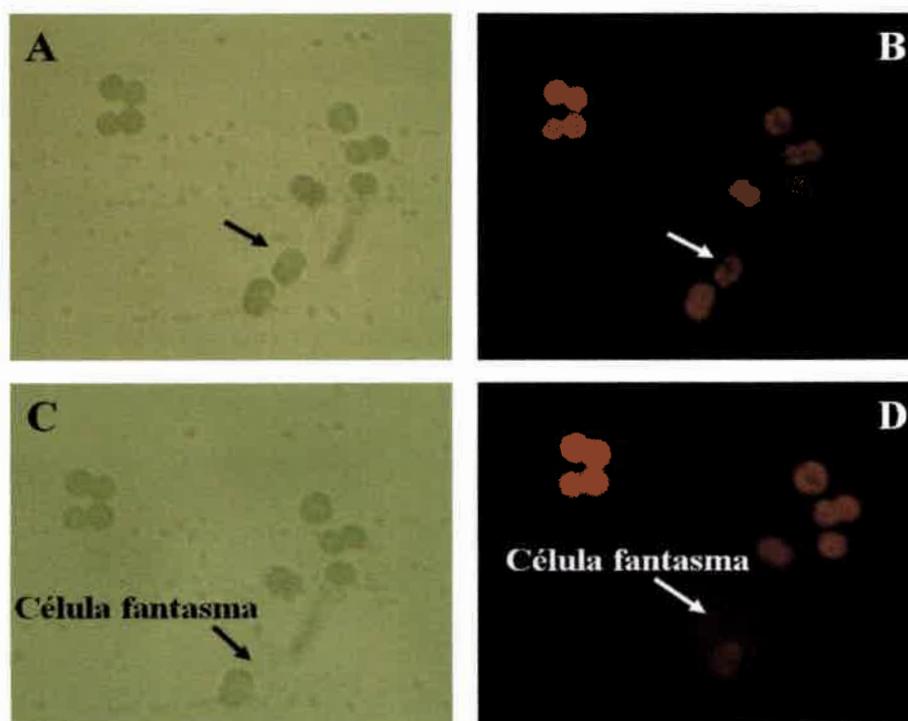


Figura 68. Tubo 2: Observación directa al microscopio. Células del género *Microcystis* observadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia luego de tratamiento con 20 μM de porfirina y exposición directa al microscopio. (A y B): previo a la lisis celular. (C y D): posterior a la lisis celular.(400x)

Para el **tubo 3**, incubado a baja potencia de luz (condiciones de cultivo) se obtuvieron las imágenes mostradas en la **Figura 69**. En primer lugar se observan células cuya pigmentación ha sido ya afectada (comparada con tubo control). La secuencia **A-D** muestra la lisis celular ocurriendo luego de ~ 10 min de exposición a la luz del microscopio. La célula situada a la derecha de la **Figura 69 C y D** sufre la lisis quedando su “célula fantasma”. Esto indica que la luz de baja potencia a la cual fue irradiada la muestra del **tubo 3** es suficiente para inducir un efecto fotodinámico. Esto fue confirmado a partir de los resultados obtenidos con el **tubo 4 (Figura 70)**. El preparado de este tubo (idéntico al tubo 3 pero mantenido 2 horas en la oscuridad) mostró lisis celular cuando fue expuesto a la luz de microscopio, recién a partir de los ~30 min desde el inicio de su observación. En esto, se comporta de igual manera que el preparado del tubo 2, el cual se observó inmediatamente después de ser preparado.

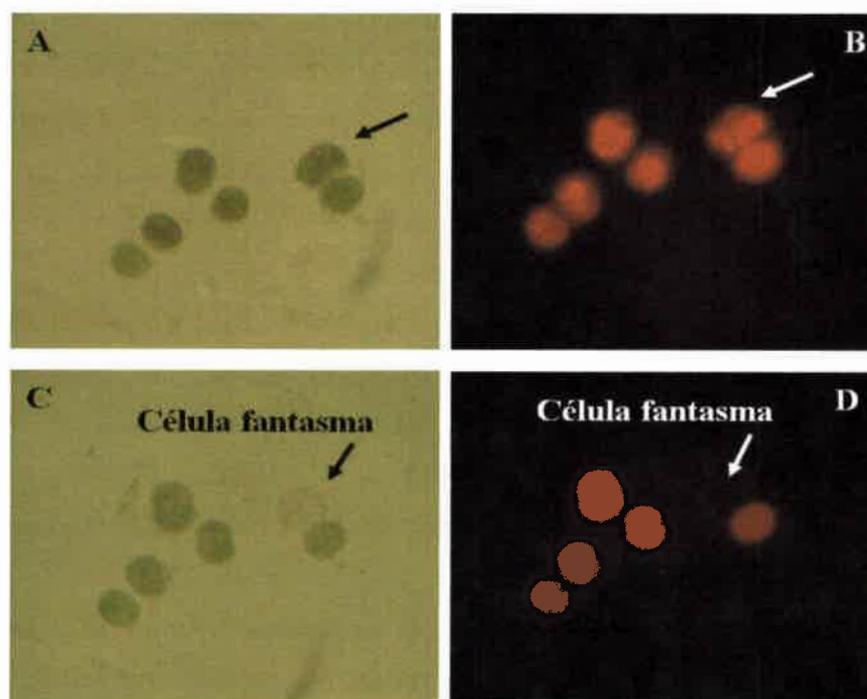


Figura 69. Tubo 3: Irradiación en caja de cultivo por 2 hrs. Células del género *Microcystis* observadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia luego de tratamiento con 20 μ M de porfirina y radiación lumínica durante dos hrs. (A y B): previo a la lisis celular. (C y D): posterior a la lisis celular. (400x)

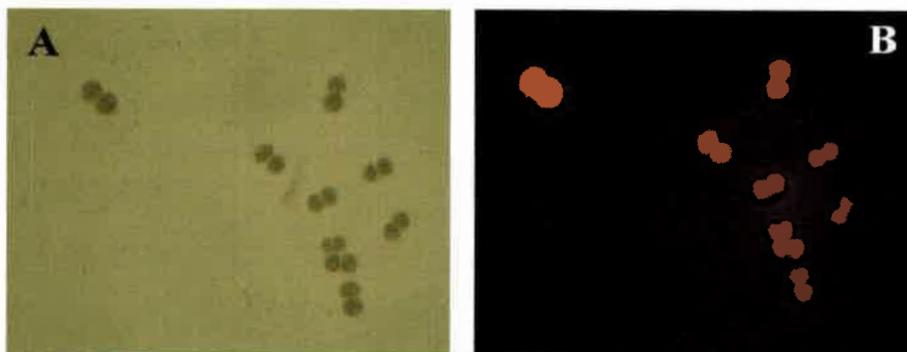


Figura 70. Tubo 4: Incubación en oscuridad durante 2 hrs. Células del género *Microcystis* observadas mediante microscopía óptica (A) y de fluorescencia (B) luego de tratamiento con 20 μM de porfirina y 2 hrs de oscuridad (400x)

En conclusión, se demuestra que la inhibición del crecimiento de *Microcystis* sp. por la presencia de la porfirina es básicamente un efecto fotodinámico. Esto es evidente dado a que se requiere simultáneamente la presencia de luz y del FS para producir la lisis celular.

Es importante aclarar que actualmente los estudios de TIF en estos microorganismos no han sido reportados aún.

Sin embargo, dadas las similitudes entre la estructura de las membranas celulares de las cianofíceas y bacterias Gram-negativas, se puede intentar explicar el efecto fotodinámico observado comparando con estudios previos realizados con bacterias tales como *Echerichia coli*.

Se ha demostrado que distintas porfirinas catiónicas producen inactivación directa fotoinducida en bacterias Gram-negativas sin requerir un agente de permeabilización adicional. Los grupos cargados presentes en TAPP⁴⁺ favorecen una interacción electrostática con sitios cargados negativamente en la superficie externa de las membranas de bacterias Gram-negativas (debido a la presencia de LPS), aumentando así la eficiencia de los procesos fotoactivación.^[108] Se ha comprobado que cultivos de *E. coli* presentaron daños en el ADN y en membrana

celular cuando fueron tratados con TAPP⁴⁺ y posteriormente irradiados con luz visible.^[162,165]

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

VI-CONCLUSIONES

- Se desarrollaron y aplicaron técnicas de cultivo para diferentes grupos algales.
- Se logró mantener seis cepas pertenecientes a cinco grupos algales diferenciados espectralmente:
 - Anabaena* sp. y *Microcystis* sp. (Cyanophyceae),
 - Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae),
 - Cyclotella* sp. (Bacillariophyceae),
 - Ceratium* sp. (Dinophyceae),
 - Porphyridium* sp. (Rhodellophyceae).
- Se adaptó el método de Beutler a un fluorómetro convencional. Se obtuvieron los *espectros norma* correspondientes para dos cepas de cianofíceas, una clorofícea, una diatomea, un dinoflagelado y un alga roja.
- Los *espectros norma* (obtenidos a partir de cultivos en su etapa de crecimiento exponencial) cumplieron con las tres premisas fundamentales del método: independencia lineal, precisión y forma constante.
- Mediante la utilización de un método de regresión lineal (análisis multiparamétrico que utiliza los *espectros norma* y el espectro de excitación de las muestras problema) se cuantificó la población de los distintos grupos algales presentes en muestras reales.
- Se demostró que el método de Beutler es básicamente cualitativo y no cuantitativo, al menos para muestras con bajas poblaciones algales. El método permite identificar los distintos géneros de algas presentes en las muestras reales pero sistemáticamente sobreestima el contenido Chl *a* total de las muestras.
- A pesar de las deficiencias observadas, el método de Beutler tiene enormes ventajas con respecto a los tradicionales (evaluación de Chl *a* por métodos de extracción y cuantificación por absorbancia o cromatografía, recuento al microscopio, etc.) para muestra reales. El método requiere pequeñas muestras

(<2 mL), es rápido, muy sensible; pudiendo detectar concentraciones algales imperceptibles para los métodos convencionales.

- No se observaron florecimientos de ningún género de algas durante el período de muestreo del embalse.

- Los parámetros físico-químicos tomados *in situ* muestran una correlación con la estación del año siendo analizada. El estado trófico del embalse indicaría, en general, un moderado enriquecimiento con nutrientes y crecimiento planctónico con escasa acumulación de sedimentos.

- Se iniciaron estudios de TIF con la finalidad de controlar *in vitro* poblaciones de cianofíceas nocivas. A tal fin se utilizó la porfirina catiónica TAPP⁴⁺ la cual posee varias propiedades favorables para estos estudios: es parcialmente soluble en agua, su carga positiva favorece la unión a la membrana celular de estas microalgas, absorberse luz visible y posee un buen rendimiento cuántico de formación de especies ROS.

- Curvas de crecimiento del género *Microcystis* obtenidas en presencia o ausencia del FS mostraron claramente el efecto inhibitorio sobre el normal desarrollo de la población algal.

- Se observó que la unión entre el FS y las células es un proceso que ocurre en periodos cortos (< 15 min). La incorporación del FS a las microalgas fue demostrado por experimentos de recuperación y a través de imágenes de microscopía de fluorescencia.

- Las imágenes de microscopía óptica mostraron que las algas cultivadas en ausencia del FS, muestran células con un importante contenido de Chl *a* y morfología típica esperada para la especie. Las muestras sometidas a los tratamientos (presencia de FS y luz) mostraron células que habrían perdido parte sus pigmentos característicos.

- Cuando se comparó una muestra control y una tratada con 20 μ M de TAPP⁴⁺ por microscopía se observó que en la muestra tratada se produjo la lisis celular mientras que el control permaneció sin cambios.

- La lisis celular llevó a la formación de células fantasmas con pérdida de pigmentos. Esto explicaría la progresiva aparición de células despigmentadas en las muestras tratadas.
- Los resultados anteriores confirman que efectivamente la porfirina inhibe el crecimiento del género *Microcystis*, a través de un mecanismo fotodinámico aunque no se puede confirmar aún si esto producido por ROS.



CAPÍTULO VII
BIBLIOGRAFÍA

VII-BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ryding, S.; Rast, W. *El control de la eutrofización en lagos y pantanos*; Ediciones Pirámide, Madrid y UNESCO: París, 1992.
- [2] Rodríguez, C., UNRC, 2001.
- [3] Rodríguez, C.; Bonansea, M.; Bonatto, F.; Reynoso, V.; Prospero, C.; Mancini, M.; Ledesma, C. *Proceedings Med* **2006**, 343-345.
- [4] Rodríguez, C.; Prospero, C. In *9th Intern. Conf. on the Conservation and Management of Lakes* Japón, 2001, p 534-537.
- [5] Rodríguez, C.; Mancini, M.; Prospero, C.; Weyers, A.; Alcantu, G.; Ferrero, S. *Ecol. Austral* **2002**, *12*, 65-72.
- [6] Mancini, M.; Rodríguez, C.; Prospero, C.; Finola, M. In *XIII Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente* 2003, p 44-49.
- [7] Rodríguez, C.; Prospero, C. *Biocell* **2004**, *28*, 195.
- [8] Gómez Orea, D.; Rodríguez, C. *Tecnoambiente* **2005**, *15*, 11-16.
- [9] Reynoso, V.; Bonansea, M.; Bonatto, F.; Mancini, M.; Prospero, C.; Rodríguez, C. *Biocell* **2005**, *29*, 234.
- [10] Bonatto, F.; Rodríguez, C.; Ledesma, C.; Bonansea, M.; INET: 2007, p 1-5.
- [11] Rodríguez, C.; Pereyra, C.; Ledesma, C.; Mancini, M.; Bonansea, M.; Bonatto, F.; Reynoso, V.; Rosa, C.; Dalcerro, A.; Cavaglieri, L.; Prospero, C. *Rev. Hig. Alim* **2007**, *21*, 394-395.
- [12] Ledesma, C.; Bonatto, F.; Bonansea, M.; Prospero, C.; Rodríguez, C. *Biocell* **2007**, *32*, 122.
- [13] Mariuzzi, A. A.; Donadelli, J.; Arenas, P.; Di Siervi, M.; Bonetto, C. *Rev. Hidrobiología* **1992**, *26*, 129-140.
- [14] Mancini, M.; Rodríguez, C.; Bagnis, G.; Liendo, A.; Prospero, C.; Bonansea, M.; J., G. T. *Brazilian Journal Biology* **2010**, *70*, 841-845.
- [15] Beutler, M.; Wiltshire, K. H.; Arp, M.; Kruse, J.; Reineke, C.; Moldaenke, C.; Hansen, U.-P. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1604*, 33-46.
- [16] Yentsch, C. S.; Menzel, D. W. *Deep Sea Res* **1963**, *10*, 1221-1231.
- [17] Holm-Hansen, O. *J Cons Perm Int Explor Mer* **1965**, *30*, 3-15.
- [18] Van den Hoek, C.; Mann, D. G.; Jahns, H. M. *Algae. An introduction to phycology*; Cambridge University Press: Cambridge, U K, 1995.

- [19] Beutler, M.; Wiltshire, K. H.; Meyer, B.; Moldaenke, C.; Lüring, C.; Meyerhöfer, M.; Hansen, U.-P.; Dau, H. *Photosynth. Res.* **2002**, *72*, 39-53.
- [20] Faust, M. A.; Gullede, R. A. *Contr. U.S. Natl. Herb.* **2002**, *42*, 1-144.
- [21] Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*, 1991.
- [22] Hamblin, M. R.; Hasan, T. *Photochem Photobiol Sci* **2004**, *3*, 436-450.
- [23] Margalef, R. *Limnología* Barcelona, 1983.
- [24] Canter-Lund, H.; Lund, J. W. G. *Freshwater algae: Their microscopic world explored*. Bristol, 1995.
- [25] Zimmermann, W. *Evolución Vegetal* Barcelona, 1976.
- [26] Casco, S. L.; Basterra, N. I.; Neiff, J. J. *Manual de Biodiversidad de Chaco, Corrientes y Formosa*; Primera ed., 2008.
- [27] Zalocar, Y.; Forastier, M. E. *Manual de Biodiversidad de Chaco, Corrientes y Formosa*. ; Primera ed. Corrientes, 2008.
- [28] Zaburlín, N. M.; Martens, I. S.; Llano, V. *Cianobacterias y Cianotoxinas. Identificación, Toxicología, Monitoreo y Evaluación de Riesgo*; Primera ed. Buenos Aires. Argentina, 2009.
- [29] Alonso, R. R.; Ochoa, J. L. *Harmful Algae* **2004**, *3*, 163-171.
- [30] Anderson, D. Testimony in the Committee on Science Subcommittee on Environment, Technology and Standards U.S. House of Representatives Hearing on the "Harmful Algal Bloom and Hypoxia Research Amendments Act of 2003". . [Online Early Access]. Published Online: 2003.
- [31] Van Egmond, H. P.; Van Apeldoorn, M. E.; Speijers, G. J. A. *FAO*. **2005**.
- [32] Hallegraeff, G. M. In *Manual on Harmful Marine Microalgae*.; Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D., Eds.; UNESCO: 1995, p 1-22.
- [33] Sar, E. A.; Ferrario, M. E.; Reguera, B. **2002**.
- [34] Wang, Q.; Deeds, J. R.; Place, A. R.; Belas, R. *Harmful Algae* **2005**, *4*, 151-162.
- [35] González de Infante, A. In *El plancton de las aguas continentales* Washington, DC, 1988; Vol. 33, p 5-13.
- [36] Castenholz, R. W.; Waterbury, J. B. *Group I. Cyanobacteria* Baltimore, 1989; Vol. 3.
- [37] Bourrelly, P. *Les Algues d'eau douce. Algues bleues et rouges*; Eb Boubée: Paris, 1970.
- [38] Forján Lozano, E.; Domínguez Vargas, M. J.; Vilchez Lobato, C.; Miguel, R.; Costa, C.; Reis, M. P. *Ecosistemas* **2008**, *17*, 37-45.
- [39] Fay, P. *J Gen Microbiol* **1965**, *39*, 33-42.
- [40] Carmichael, W. W. *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, *72*, 445-459.
- [41] Kützing, F. T. *Linnaea* **1833**, *8*, 335-384.

- [42] Gayral, P. *Les algues. Morphologie, cytologie, reproduction, écologie* Doin, Paris, 1975.
- [43] Chorus, I.; Bartram, J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*; WHO, 1999.
- [44] Mattox, K. R.; Stewart, K. D. *The Systematics of green algae* London, UK., 1984.
- [45] Sluiman, H. J. *Plant Syst. Evol.* **1985**, *149*, 217-232.
- [46] Bremer, K.; Humphries, C., J.; Mishler, B. D.; Churchill, S. P. *Taxon* **1987**, *36*, 339-349.
- [47] Kenrick, P.; Crane, P. R. *Nature* **1997**, *389*, 33-39.
- [48] Elliot Shubert, L. *Freshwater Algae of North America*; Elsevier Science (USA): London, 2003.
- [49] Graham, L. E.; Wilcox, L. W. *Algae* **2000**, 97-131.
- [50] Lewis, L. A.; McCourt, R. M. *Am. J. Bot.* **2004**, *91*, 1535-1556.
- [51] Flechtner, V. R.; Johansen, J. R.; Clark, W. H. *Great Basin Nat.* **1998**, *58*, 295-311.
- [52] Lewis, L. A.; Flechtner, V. R. *Taxon* **2002**, *51*, 443-451.
- [53] Borowitzka, M. A. *Curr. Microbiol.* **1986**, *3*, 372-375.
- [54] Borowitzka, L. J.; Borowitzka, M. A. *Industrial production: methods and economics*; Longman Scientific: London, 1989.
- [55] Laing, I.; Ayala, F. *Introduction to Applied Phycology* Akatsuka, 1990; Vol. 1.
- [56] Fogg, G. *ALGAL cultures and phytoplankton ecology*; Segunda ed.; The University of Wisconsin Press, 1977.
- [57] Bourrelly, P. *Les Algues d'eau douce. Algues vertes.* ; Eb Boubée: Paris, 1966.
- [58] Beijerinck, M. W. *Botanie Zeitschrift Leipzig* **1890**, *48*, 757-768.
- [59] Bourrelly, P. *Les Algues d'eau douce. Algues jaunes et brunes*; Ed. Boubée: Paris, 1981.
- [60] Roessler, P. G. *J. Phycol* **1988**, *24*, 394-400.
- [61] Round, F. E.; Crawford, R. M.; Mann, D. G. *The Diatoms. Biology and Morphology of the genera*; Cambridge University Press, 1990.
- [62] Martinez de Fabricius, A. L., UNLP, 1996.
- [63] Moll, R. A.; Stoermer, E. F. *Archiv für Hydrobiologie* **1982**, *94*, 425-440.
- [64] Stoermer, E. F.; Matthew, L. J. *Freshwater Algae of North America*; Elsevier Minnesota (USA), 2003.
- [65] Håkansson, H. *Diatom Res.* **2002**, *17*, 1-139.
- [66] Sluijs, A.; Pross, J.; Brinkhuis, H. *Earth-Sci. Rev.* **2005**, *68*, 281-315.
- [67] Llorente Isidro, M.; Cereceda Oyon, I. *Micropaleontología* **2000-2001**, 1-12.
- [68] Saldarriaga, J. F.; Taylor, F. J. R.; Keeling, P. J.; Cavalier-Smith, T. *J. Mol. Evol.* **2001**, *53*, 204-213.

- [69] Taylor, F. J. R. *Phycol. Res.* **2004**, *52*, 308-324.
- [70] Hwan Su, Y.; Müller, K. M.; Sheath, R. G.; Ott, F. D.; Bhattacharya, D. *J. Phycol.* **2006**, *482-492*.
- [71] Saunders, G. W.; Hommerdand, M. H. *American Journal of Botany* **2004**, *91*, 1494-1507.
- [72] Reboloso, M. M.; Ación, G. G.; Sánchez, J. A.; Guil, J. L. *Food Chem.* **2000**, *70*, 345-353.
- [73] You, T.; Barnett, S. M. *Biochem. Eng. J.* **2004**, *19*, 251-258.
- [74] Adda, M.; Merehuk, J. C.; Arad, S. *Biomass Bioenergy* **1986**, *10*, 131-140.
- [75] Arad, S.; Adda, M.; Cohen, E. *Plant Soil* **1985**, *89*, 117-127.
- [76] Arad, S.; Friedman, D. O.; Rotem, A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 2411-2414.
- [77] Pujals, C. *Catálogo de Rhodophyta citadas para Argentina. Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales, Serie Botánica* **1963**, *3*, 1-139.
- [78] Becker, E. W. *Microalgae. Biotechnology and Microbiology* Cambridge University Press, USA, 1994.
- [79] Morales, V. V.; De Velotti, A. *Temas de Acuicultura. Fitoplancton. Programa regional de apoyo al desarrollo de la pesca en el Istmo Centroamericano.*, 1990.
- [80] Paniagua, J. M.; Bucle, L. F.; Granados, C.; Loya, D. H. S. E.; Voltolina, D. L. *Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas*; Segunda ed. México, 1988.
- [81] Day, R. A.; Underwood, A. L. *Quantitative Analysis*; Quinta ed. Mexico, 1989.
- [82] Skoog, D. A.; West, D. M. *Analytical Chemistry An Introduccion Spain*, 1986.
- [83] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principle of Instrumental Analysis Spain*, 1971.
- [84] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Tercera ed.; Springer Berlin / Heidelberg, 2008.
- [85] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- [86] Poryvkina, L.; Babichenko, S.; Leeben, A. *Proceedings of EARSeL-SIG-Workshop LIDAR, Dresden/FRG* **2000**, 224-232.
- [87] Pérez-Urria Carril, E. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal* **2009**, *2*, 1-47.
- [88] Curtis, M.; Barnes, N. S.; Schyck, A.; Flores, G. *Invitación a la Biología*; Sexta ed., 2006.
- [89] Falkowski, P. G.; Raven, J. A. *Aquatic Photosynthesis* Malden USA, 1997.
- [90] Yentsch, C. S.; Menzel, D. W. *Deep Sea Res* **1963**, *10*, 1221-1231.
- [91] Holm-Hansen, O. *J Cons Perm Int Explor Mer* **1965**, *30*, 3-15.
- [92] Utermöhl, H. *Limnol.* **1958**, *9*, 1-38.
- [93] Gieskes, W. W. C.; Kraay, G. W. *Netherlands Journal of Sea Research* **1984**, *18*, 51-70.
- [94] Jeffrey, S. W.; Hallegraeff, G. M. *Marine Ecology-Progress Series* **1980**, *3*, 285-294.

- [⁹⁵] Mackey, M. D.; Mackey, D. J.; Higgins, H. W.; Wright, S. W. *Marine Ecology-Progress Series* **1996**, *144*, 265-283.
- [⁹⁶] Wiltshire, K. H.; Harsdorf, S.; Smidt, B.; Blocker, G.; Reuter, R.; Schroeder, F. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1998**, *222*, 113-131.
- [⁹⁷] Utermöhl, H. *Limnol. Aktuell* **1958**, *9*, 1-38.
- [⁹⁸] Kiefer, D. A. *Mar Biol* **1973**, *22*, 263-269.
- [⁹⁹] Yentsch, C. S.; Yentsch, C. M. *J Mar Res* **1979**, *37*, 471-483.
- [¹⁰⁰] Yentsch, C. S.; Phinney, D. A. *J Plankt Res* **1985**, *7*, 617-632.
- [¹⁰¹] Kolbowski, J.; Schreiber, U. In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*; Kluwer Academic Publishers, D., Ed. Boston/London, 1995; Vol. 5, p 825-828.
- [¹⁰²] Edgar, R. K.; Laird, K. *Hydrobiologia* **1993**, *264*, 65-77.
- [¹⁰³] Carrick, H. J.; Schelske, C. L. *Limnol. Oceanogr.* **1997**, *42*, 1613-1621.
- [¹⁰⁴] Beutler, M., Universität Kiel, 1998.
- [¹⁰⁵] Orellana, G.; Villén, L.; Jiménez-Hernández, M. E. In *Solar Safe Water* 2005.
- [¹⁰⁶] Najm, I.; Trussel, R. R. *New and emerging drinking water treatment technologies, in Identifying future dinking water contaminants*, 1999.
- [¹⁰⁷] Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, *22*, 113-262.
- [¹⁰⁸] Jemli, M.; Alouini, Z.; Sabbahi, S.; Gueddari, M. *J. Environ. Monitoring* **2002**, *4*, 511-517.
- [¹⁰⁹] Braun, A. M.; Murette, M. T.; Oliveros, E. *Photochemical technology* **1991**.
- [¹¹⁰] Boltovskoy, A.; Foggetta, M. *Revista Biología Acuática* **1985**, *7*, 1-26.
- [¹¹¹] Pizzolon, L.; Tracanna, B.; Prospero, C.; Guerrero, J. *Lakes and Reservoirs* **1999**, *4*, 101-105.
- [¹¹²] Lerda, D.; Prospero, C. Municipalidad de Marcos Juárez, 1994, p 1-42.
- [¹¹³] Aznar Jiménez, A. *Gestión Ambiental* **2000**, *2*, 12-19.
- [¹¹⁴] Mayagüez, U. d. P. R. R. U. d. Parámetros Físico Químicos: pH. [Online Early Access].
- [¹¹⁵] Talavera, V.; Zapata, L. M.; Sánchez, D. 1998; Vol. 3 p1-2.
- [¹¹⁶] OCDE *Eutrophisation des eaux. Méthodes de surveillance, d'évaluation et de lutte* Paris, 1982.
- [¹¹⁷] Carlson, R. E. *Limnol. Oceanography and marine biology: an annual review* **1974**, *23*, 1-369.
- [¹¹⁸] Álvarez-Arellano, H. G. Folleto de ALGAS. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador, 1994, p 29-37.
- [¹¹⁹] Arredondo, V. B. O.; Band, C. J. S. *Aislamiento, mantenimiento y cultivo de microalgas nocivas* California, 2000.

- [120] González, M. A.; Parra, O. O.; Cifuentes, A. S. *Técnicas de Cultivo de Microalgas en Laboratorio*; Manual de Métodos Ficológicos: Chile 1995.
- [121] Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J. B.; Herdman, M.; Stanier, R. Y. *J. Gen. Microbiol.* **1979**, *111*, 1-61.
- [122] Fábregas, J.; Herrera, C.; Cabezas, B.; Abalde, J. *Aquaculture* **1985**, *49*, 231-244.
- [123] Guillard, R. R. L.; Lorenzen, C. J. *J. Phycol.* **1972**, *8*, 10-14.
- [124] Bruno, S. F.; McLaughlin, J. J. A. *J. Protozool.* **1977**, *24*, 548-553.
- [125] Guillard, R. R. L. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*; Press, P., Ed. NY, USA, 1975, p 26-60.
- [126] Guillard, R. R. L.; Ryther, J. H. *Can. J. Microbiol.* **1962**, *8*, 229-239.
- [127] (OMS), O. M. d. I. S. *Guía operativa GEMS/AGUA*, 1994.
- [128] Parésys, G.; Rigart, C.; Rousseau, B.; Wong, A. W. M.; Fan, F.; Barbier, J. P.; Lavaud, J. *Water Res.* **2005**, *39*, 911-921.
- [129] Loreto, C.; Rosales, N.; Bermúdez, J.; Morales, E. *Gayana Bot.* **2003**, *60*, 83-89.
- [130] Rosales-Loaiza, N.; Guevara, M.; Lodeiros, C.; Morales, E. *Rev. Biol. Trop.* **2008**, *56*, 421-429.
- [131] Haxo, F. T.; Kycia, J. H.; Somers, G. F.; Bennett, A.; Siegelman, H. W. *Plant Physiol. Biochem.* **1976**, *57*, 297-303.
- [132] Hata, M.; Sachiko, A.; Hata, M. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **1982**, *48*, 459-461.
- [133] Gantt, E.; Lipschultz, C. A.; Grabowski, J.; Zimmerman, B. K. *Plant Physiol.* **1979**, *63*, 615-620.
- [134] Bonansea, M.; Ledesma, C.; Rodriguez, C.; Sanchez Delgado, A. R. *Revista Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science* **2012**, *7*, 1-11.
- [135] APHA, A., WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2000.
- [136] Krause, G. H. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bioi.* **1991**, *42*, 313-349.
- [137] Schreiber, U.; Schliwa, U.; Bilger, W. *Photosynth. Res.* **1986**, *10*, 51-62.
- [138] Fujiki, T.; Taguchi, S. *J. Plankton Res.* **2002**, *24*, 859-874.
- [139] González Moreno, S.; Perales Vela, H.; Salcedo Alvarez, M. O. *Revista de Educación Bioquímica* **2008**, *27*, 119-129.
- [140] Gregor, J.; Marsálek, B. *Water Res.* **2004**, *38*, 517-522.
- [141] Catherine, A.; Escoffier, N.; Belhocine, A.; Nasri, A. B.; Hamlaoui, S.; Yéprémian, C.; Bernard, C.; Troussellier, M. *Water research* **2012**, *46*, 1771-1783.
- [142] Leboulanger, C.; Dorigo, U.; Jacquet, S.; Le Berre, B.; Paolini, G.; Humbert, J.-F. *Aquat. Microb. Ecol.* **2002**, *30*, 83-89.

- [143] Catherine, A.; Bernard, C.; Troussellier, M. *Water Res.* **2008**, *42*, 4989-5001.
- [144] Izydorczyk, K.; Carpentier, C.; Mrówczyński, J.; Wagenvoort, A.; Jurczak, T.; Tarczynska, M. *Water Res.* **2009**, *43*, 989-996.
- [145] Richardson, T. L.; Lawrenz, E.; Pinckney, J. L.; Guajardo, R. C.; Walker, E. A.; Paerl, H. W.; MacIntyre, H. L. *Water Res.* **2010**, *44*, 2461-2472.
- [146] Zunino, R. C.; Migliori, S.; CNEA. Gerencia de protección radiológica y seguridad. División estudios de emplazamiento. Bs As: 1983, p 1-226.
- [147] Cossavella, A.; Rodríguez, M. I.; Rodríguez, A.; Avena, M.; Oroná, C.; Larrosa, N.; Olmo, S.; Muñoz, A.; Moya, G.; Bertucci, C.; Miatello, F.; Bazán, R.; Martínez, M. [Online Early Access]. Published Online: 2006.
- [148] Gómez, N. *Ann. Limnol.* **1991**, *27*, 3-14.
- [149] Ernst, D.; Reinhardt, D. *Dev. Hidrobiol.* **1980**, *3*, 11-18.
- [150] Mariazzi, A.; Romero, M.; Conzonno, V. *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* **1988**, *19*, 167-181.
- [151] Echarri, L. [Online Early Access]. Published Online: 1998.
- [152] APHA *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*; 18th ed.; American Public Health Association: New York, 1992.
- [153] Prospero, C.; Rodríguez, C.; Pierotto, M.; Mancini, M.; Daga, C.; Gonella, M.; Rincón, A. **2002**.
- [154] Pierotto, M.; Rincón, A.; Gonella, M.; Daga, C.; Prospero, C. **2003**.
- [155] Mariazzi, A.; Romero, M.; Conzonno, V.; Marinelarena, A. *Rev. Asoc. Cs. Nat. Lit* **1989**, *20*, 57-68.
- [156] Boltovskoy, A.; Battistoni, P. A.; Gómez, N.; Escalante, A. H.; Solari, L.; Vucetich, M. C. *In VII Reunión Argentina de Ecología* Santa Fé, 1980.
- [157] Gómez, N. *Limn.* **1984**, *2*, 579-580.
- [158] Gómez, N. *Limn.* **1984**, *2*, 556-561.
- [159] Bonnett, R. *Chemical aspects of photodynamic therapy* Gordon and Breach Science Publishers, 2000.
- [160] Bonnett, R.; Smith, K. M. *General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds*; Elsevier: Amsterdam, 1975; Vol. 1.
- [161] Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Rocha Gonsalves, A. M.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. *J Eur. Chem.* **1998**, *4*, 2299-2307.
- [162] Caminos, D. A.; Specia, M. B.; Pons, P.; Durantini, E. N. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1071-1078.

[163] Bonnett, R.; Martínez, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9513-9547.

[164] Ochsner, M. J. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, *39*, 1-18.

[165] Jori, G.; Brown, S. B. *Photochem Photobiol Sci* **2004**, *3*, 403-405.

72647

U.N.R.C
Biblioteca Central



72647