



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Facultad de Ciencias Ambientales
Ingeniería Ambiental

**EVALUACIÓN DE FACTORES AMBIENTALES QUE
FAVORECEN EL CRECIMIENTO DE *MICROCYSTIS*
*AERUGINOSA***

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE INGENIERO AMBIENTAL

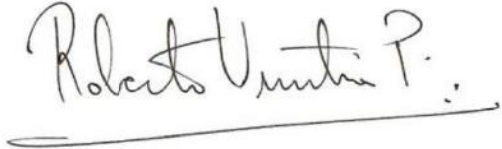
POR: WIDMER SANDOVAL ROA

Profesor Guía: Roberto Urrutia Pérez

Concepción, Chile 2024

“EVALUACIÓN DE FACTORES AMBIENTALES QUE FAVORECEN EL CRECIMIENTO DE MICROCYSTIS AERUGINOSA”

Profesor Guía: Dr. Roberto Urrutia Pérez



Profesor Comisión: Dra. Claudia Ulloa Tesser



Profesor Comisión: Dr. Mauricio Aguayo Arias



CONCEPTO: APROBADO CON DISTINCIÓN MAXIMA

Conceptos que se indica en el Título

- ✓ Aprobado por Unanimidad : (En Escala de 4,0 a 4,9)
- ✓ Aprobado con Distinción (En Escala de 5,0 a 5,6)
- ✓ Aprobado con Distinción Máxima (En Escala de 5,7 a 7,0)

Concepción, marzo 2024

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a quienes estuvieron directamente conmigo en este proceso de estudio, que fueron mi familia, mi abuela, mi primo que convivió conmigo en una etapa complicada como fue la de desarrollo de mi tesis, mi madre, que me escuchaba todos los días cuando la llamaba, mis hermanos, Ariadne y Fabián por ser siempre un apoyo incondicional y estar para mí para cada pregunta, por más mínima que fuese, mi padre, que siempre demostró gran preocupación por mi progreso. Asimismo, y en especial mis padres, fueron quienes desde que era pequeña me llevaban a la Universidad de Concepción, mostrándome lo bella que es tanto en infraestructura cómo la calidez que transmite el entorno social de la misma, motivando esto a que en el año 2018 yo decidiera venir a estudiar acá, alejándome de mi nido familiar y de amistades. Tan solo con 17 años logré venir, vivir sola, apoyada económicamente de mis padres, pero sin conocer a nadie. Fue entonces cuando conocí a mis compañeros Catalina, Francisca y Pablo, que fueron y son mi apoyo en todo, estoy enormemente agradecida por sus esfuerzos en conocerme y ayudarme en tomar decisiones y en los estudios, incluso en mis momentos difíciles de trabajo y estudio, teniendo una paciencia enorme conmigo.

En cuanto a mi proceso de tesis, quiero agradecer a quienes ayudaron a hacer esto posible, los chicos del laboratorio de Bioensayos que me ayudaron en mi Práctica Profesional y luego en mis trabajos de lab en HP, son quienes también hicieron mi contacto con mi profesor guía Roberto Urrutia, quien confió plenamente en mí y me daba ánimos y solución a todos mis problemas, también a René y Rocío quienes me apoyaron 100% desde el día uno en el lab, mandándome información y consiguiendo todo lo necesario para que mi tesis fuera más rápida y llevadera. Además, quiero agradecer a Matías, un profesional excelente, laboratorista seco y un amigo incondicional, compañero de laboratorio hasta las altas horas de la noche y de charlas psicológicas complejas e intensas.

Por último, quiero agradecer al Centro de Recursos Hídrico para la Agricultura y Minería (CHRIAM) por brindarme apoyo económico gracias a la beca de pregrado del proyecto ANID/FONDAP/15130015.

Resumen.

Las floraciones cianobacteriales tóxicas han ido en aumento en los últimos 50 años, generando consecuencias económicas, recreacionales y a la salud, tanto del medio ambiente como de la población. Esto sumado a la actual escasez hídrica significa una problemática importante. Una de las cianobacterias más comúnmente encontradas en estas floraciones es *Microcystis Aeruginosa*, que a su vez libera toxinas. En el presente estudio se busca averiguar en qué condiciones de nutrientes y temperatura existe mayor crecimiento de esta bacteria.

Índice de contenidos	
Agradecimientos:	3
Glosario.....	9
Capítulo 1: Introducción	11
1.1 Problemática actual	11
Capítulo 2: Marco teórico	12
2.1 Cianobacterias	12
2.2 Floración cianobacterial	14
2.2.1 Causas y consecuencias	15
2.3. Toxicidad de <i>Microcystis aeruginosa</i>	18
2.4 Factores condicionantes	21
2.4.1 Nitrógeno (N _x).....	21
2.4.2 Fósforo (P)	22
2.4.3 Temperatura:	22
2.5 Hipótesis	24
2.6 Objetivos	24
2.6.1 Objetivo general.....	24
2.6.2 Objetivos específicos	24
Capítulo 3: Metodología	25
3.1 Obtención de muestras	25
3.2 Acondicionamiento de muestras	25
3.3 Obtención de cultivo unialgal de <i>Microcystis aeruginosa</i>	26
3.4 Determinación de curva de crecimiento <i>Microcystis aeruginosa</i>	29
3.5 Diseño experimental.....	32
3.5.1 Nutrientes.....	34
3.5.2 Temperatura	37
3.6 Parámetros por evaluar	37
3.6.1 Cantidad celular	38
3.7 Análisis estadístico	38
Capítulo 4: Resultados	39

4.1 Obtención de cultivo unialgal de <i>Microcystis aeruginosa</i>	39
4.2 Curva de crecimiento <i>Microcystis aeruginosa</i>	43
4.3 Determinación de factores que favorecen el crecimiento de <i>Microcystis aeruginosa</i> en condiciones de laboratorio	47
4.3.1 Crecimiento celular	48
4.3.2 Análisis estadístico	50
Capítulo 5: Discusión	51
5.1 Obtención de cultivo unialgal de <i>Microcystis aeruginosa</i>	51
5.2 Curva de crecimiento <i>Microcystis aeruginosa</i>	52
5.3 Crecimiento celular	52
Capítulo 6: Conclusiones y Recomendaciones	54
Referencias	57
ANEXOS	65

Índice Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de una sección delgada de una célula de cianobacteria.	14
Figura 2. Microcystis aeruginosa. de la floración de cianobacterias en el lago Avernus	15
Figura 3. Lago Lanalhue (Extraído de Google Earth Pro).	17
Figura 4. Estructura general de las microcistinas.	19
Figura 5. El operón mcy para la biosíntesis de Microcistina en Microcystis aeruginosa	20
Figura 6. Esquema del proceso de obtención del cultivo unialgal de Microcystis aeruginosa.	28
Figura 7. Cámara De Neubauer CE - Quercuslab.es, n. d.	30
Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano con fases. (Studocu, n.d.)	32
Figura 9. Incubación en placa en período de 11 días.	39
Figura 10. Curva de crecimiento experimental Lago Villarrica utilizando la fórmula Technical Notes.	40
Figura 11. Curva de crecimiento experimental Lago Vichuquén utilizando la fórmula Technical Notes.	40
Figura 12. Curva de crecimiento experimental Lago Lanalhue utilizando la fórmula Technical Notes.	41
FIGURA 13. Resultados por etapa y lago.	42
Figura 14. Cantidad celular bacteriana al final del ciclo.	43
Figura 15. Sonicación previa a conteo	44
Figura 16. Curva de crecimiento Microcystis aeruginosa.	46
Figura 17. Disposición final del diseño experimental.	47
Figura 18. Cantidad celular. Las líneas representan el error de variables.	49

Índice Tablas

Tabla 1: Extracto Índice estado trófico (TSI)	16
Tabla 2. tipos de enzimas transcritas por genes mcy	19
Tabla 3. Composición BG-11 cultivo cianobacterias	26
Tabla 4: Composición placas agar-BG11	28
Tabla 5: Ejemplificación resultados conteo mediante cámara Neubauer	31
Tabla 6: Esquemización ensayo estudio efecto de nutrientes y temperatura	33
Tabla 7: Medio de cultivo N:P 15	34
Tabla 8: Medio de cultivo N:P 0,1	35
Tabla 9: Medio de cultivo en ausencia de N	36

Tabla 10	Conteo Inóculo inicial muestra Lanalhue filtrada 0.45mm con cámara Neubauer	43
Tabla 11	Conteo para curva de crecimiento Microcystis aeruginosa	45
Tabla 12	Conteo para realizar cantidad celular; promediando datos de triplicado.	48

Índice Ecuaciones

Ecuación 1: 1/16th de CUADRADO 3	31
--	----

Glosario.

Ambiente eutrófico: Generado por un exceso de nutrientes, déficit de OD y pérdida de la biodiversidad.

Biota: Conjunto de flora y fauna de una zona determinada.

Hipoxia: Déficit de Oxígeno en el medio.

Anoxia: Ausencia de Oxígeno en el medio.

Fitoplancton: Conjunto de organismos vegetales, principalmente algas microscópicas que flotan y son desplazados en aguas saladas o dulces.

Antropogénico: Relativo a lo que procede de los seres humanos que, en particular, tiene efectos sobre la naturaleza.

Microcystis aeruginosa: Microorganismo unicelular procarionte, capaz de realizar fotosíntesis y formar colonias. Se considera la especie dominante en aguas dulces eutróficas de todo el mundo.

Lacustre: Correspondiente a muestras originarios de lagos continentales.

Axénico: cultivo de un único organismo.

Inóculo: Pequeña cantidad de la sustancia que se inocular.

Lisis: proceso de ruptura celular.

Medio BG-11: Empleado para bacterias fotolito tróficas, principalmente cianobacterias, encontradas en el agua dulce.

Factores condicionantes: condición que determina cierto actuar de algún ser vivo a estudiar.

Método de siembra por estría: Técnica utilizada para aislar cepas puras en placa Petri.

Placas de agar-BG11: recipiente poco profundo y transparente que se utiliza en los laboratorios para cultivar y observar microorganismos y células, compuesta por una mezcla de Agar-agar como azúcar y medio de cultivo BG-11 específico para cianobacterias.

Test ANOVA: evalúa la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores.

RT-PCR: Reacción en cadena polimerasa con transcripción reversa, utiliza como material de amplificación del ADN mensajero, el cual se obtiene como producto de la transcripción reversa del ARN.

Genes mcy: Gen encargado de la síntesis de Microcistinas.

Capítulo 1: Introducción

1.1 Problemática actual

El cambio climático ha generado una serie de problemáticas a nivel global y local (Gobler, 2020). En cuanto a lo global, se encuentra el derretimiento de glaciares, aumento de la temperatura del planeta y la escasez hídrica por los prolongados períodos de sequía, además de generar estrés ecosistémico. Esto sumado a una población en constante aumento dificulta el panorama del recurso hídrico. Además de la disminución en la cantidad de agua, la calidad de estas también se ha visto perjudicada debido a lo ya mencionado anteriormente (Mendoza-Carbajal, 2016). Una de las causales de este deterioro es la aparición o el aumento de floraciones algales nocivas (FAN) las cuales se ocasionan por causas naturales o por la actividad antropogénica. La problemática radica en que; actualmente existe una disminución en la cantidad de agua que existe para consumo humano y que la misma cada vez posee peor calidad (Yin et al., 2022).

Las floraciones nocivas no solo afectan a la población, flora y fauna local, sino que le quitan el servicio de consumo y recreación al mismo cuerpo de agua, ya que, si existen Bloom tóxicos, esta agua no puede ser utilizada para consumo, ya que podría provocar diversos problemas a la salud de la población y especies habitantes (Gobler, 2020). Las cianobacterias responsables de las floraciones en cuerpos de agua dulce continental poseen un metabolito secundario tóxico, las cianotoxinas y aunque aún es un misterio el condicionante de esta toxicidad, varios estudios responsabilizan la presencia de ciertos nutrientes, como Nitrógeno o Fósforo, además de los cambios de temperatura en las masas de agua (Zhou & Wang, 2022). La especie de cianobacteria más comúnmente identificada en las FAN es *Microcystis aeruginosa*, que se relaciona, a su vez, con una de las toxinas más estudiadas y comunes a nivel global; la Microcistina (Van Le et al., 2022).

Capítulo 2: Marco teórico

2.1 Cianobacterias

Estos complejos organismos procariontes le deben su nombre a su tonalidad cian (azul-verdoso). Debido a que son las únicas células procariontes capaces de hacer fotosíntesis oxidativa son conocidas como algas verdeazuladas, a pesar de esto, corresponden a bacterias prehistóricas que cumplen diversas funciones en la Tierra. Fueron las responsables de la oxigenación de la atmósfera hace más de tres millones de años, conformando nuestra atmósfera como la conocemos actualmente, por ende, son conocidas por ser las responsables de lograr el desarrollo de flora y fauna (*Huisman, J et al, 2018*).

Dichos organismos procariontes habitan desde ecosistemas terrestres, marinos, de agua dulce o incluso de forma simbiote, debido a su capacidad de adaptación y su diverso metabolismo. Respecto a las cianobacterias acuáticas son comúnmente encontradas en aguas continentales calmas, tales como embalses, lagos, lagunas e incluso humedales (*Gaysina, Lira A. 2019*).

En cuanto a la estructura de las cianobacterias está compuesta por una membrana de doble capa, una de estas con estructura de membrana unitaria y la siguiente capa de peptidoglicano que varía de espesor según especie, adicionalmente de esta pared existen bacterias con capas adicionales a la pared exterior (*Cohen-Bazire et al., 1957*). Esta membrana posee pliegues que son artefactos de la fijación de nutrientes, parte esencial del metabolismo de las cianobacterias. Dentro del citoplasma se encuentran los tilacoides, dentro de los cuáles se realiza la fotosíntesis oxigenada, además

de poseer los complejos de pigmento accesorios como clorofila a verde, ficoeritrina roja y carotenoides amarillo-naranja (Huisman, J. 2018).

En secciones del espacio inter tilacoidal se encuentran estructuras complejas; ficobilisomas (PB, según sus siglas en inglés), las cuáles son responsables de captar la luz solar (Ris & Singh, 1961). Además, se pueden encontrar varias disposiciones de tilacoides según la cianobacteria a estudiar, disponiendo de un centro plasma que contiene el ADN, carboxisoma, cuales realizan la fijación del CO_2 , ribosomas y más (Cohen-Bazire et al., 1957). Estos organismos procariontes son capaces de regular su flotabilidad a lo largo de la columna de agua para asegurar una óptima disponibilidad de luz y nutrientes según necesiten, esto se realiza mediante vesículas de gas, que además de esto entregan una ventaja comparativa frente a algas u otros organismos en el momento de la formación de floraciones cianobacteriales. (Wu, T. et al 2023).

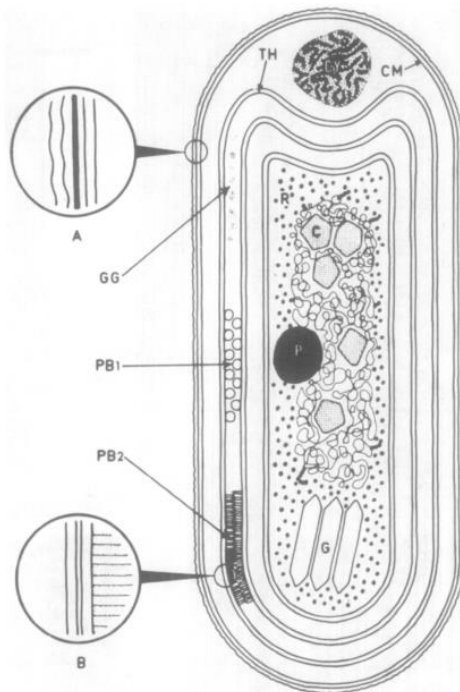


Figura 1. Diagrama esquemático de una sección delgada de una célula de cianobacteria.

CM, membrana celular; TH, tilacoide; PB1 y PB2, vistas frontal y lateral de ficobilisomas adheridos a adyacentes tilacoides; GG, gránulos de glucógeno; CY, gránulo de cianoficina; P, gránulo de polifosfato; C, carboxisoma, rodeado de nucleoplasma; R, ribosomas; G, vesículas de gas. (Insertar A) Vista ampliada de la envoltura celular que muestra la membrana externa y las capas de la pared de peptidoglicano. y la membrana citoplasmática. (Insertar B) Vista ampliada de parte de un tilacoide que muestra el Membrana unitaria emparejada con ficobilisomas adjuntos en vista lateral. Reproducido de R. Y. Stanier y G. Cohen-Bazire, *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 225 (1977), con autorización de Annual Reviews, Inc.

2.2 Floración cianobacterial

Debido al tamaño de las cianobacterias, de 0.4 a 5 mm, (Mendoza-Carbajal, 2016) resulta imposible visualizarlas singularmente sin un microscopio, sin embargo, pueden crecer en colonias o floraciones de miles o millones de células con tamaños de más de 10 mm, que si resultan visibles al ojo humano (Herdman, et al 1979). Estas floraciones al masificarse generan Bloom de cianobacterias, el cuál va ligado a una floración algal, llegando a ser nociva (FAN). Esto último trae consigo daños a la diversidad y al ecosistema en el que se encuentre, afectando a la biota y sus interacciones. En estos participa una o un número limitado de especies de fitoplancton y en general, -se utiliza el término de floración cuando “su concentración es del orden de cientos a miles de células por mililitro, dependiendo de la virulencia del brote” (Diersing,2009).

Científicos de Australia’s Flinders University creen que el primer Bloom algal documentado se produjo en el Lago Tuchomskie, en el siglo 17 por Christopher Kirkby, quien describió el área con el término de “florescencia peluda” debido a las algas, lo cual provocó muerte en perros, bovinos y pájaros (Kelly, 2016). Luego de esto se comenzaron a estudiar y documentar gran cantidad de lagos eutrofizados en diversas regiones de Australia. Sin embargo, lo que resulta nocivo y hasta mortal es el grado de toxicidad que va ligado a dicha floración algal, lo cual es debido al tipo de

cianobacteria que se esté desarrollando y si esta metaboliza o no la toxina. La cianobacteria más común en FAN es la llamada *Microcystis aeruginosa*, que es un género de cianobacterias compuesta por varias especies, entre ellas; *M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. firma*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. natans*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. smithii*, *M. viridis* y *M. wesenbergii*, entre otras (Komárek y Komárkova, 2002).

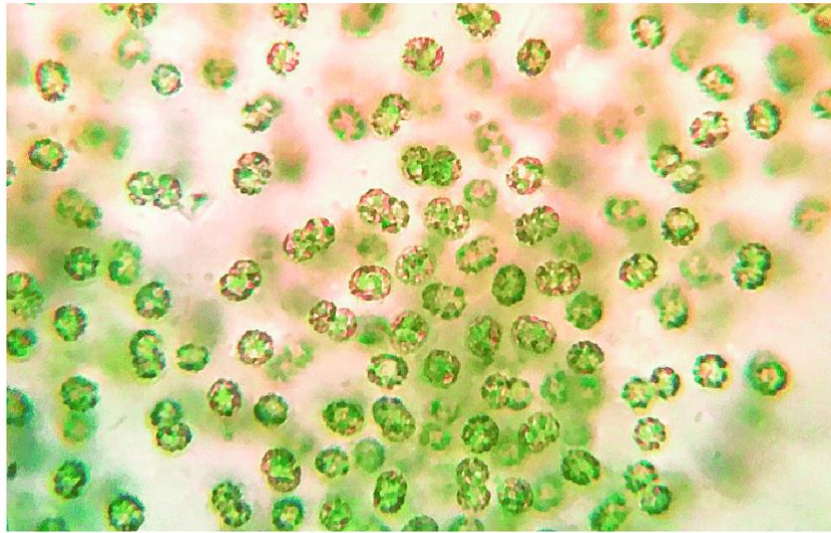


Figura 2. *Microcystis aeruginosa*. de la floración de cianobacterias en el lago Avernus

2.2.1 Causas y consecuencias

El principal causante de floraciones algales y bacterianas en cuerpos de agua calmada es el estado trófico de dicho cuerpo de agua, el cual entrega información sobre productividad del lago, calidad del agua, integridad biológica y cumplimiento de los criterios de uso designados (Maloney, 1979; USEPA, 1994). El caso común de proliferación algal ocurre en ambientes principalmente eutrofizados, los cual ocurre por el desequilibrio del ambiente acuático, generado por un aumento de nutrientes, tales como fósforo y nitrógeno, el cambio de temperaturas o la falta de estabilidad en la columna de agua (Stager, 2012) Este ambiente trófico está relacionado con

la pérdida de diversidad, ya que la degradación de algas y fauna lacustre por parte de microorganismos consume oxígeno, generando ambientes de hipoxia o incluso anoxia y junto a esto la muerte de peces e invertebrados (Rabalais, et al, 2010). La tabla 1 corresponde a un extracto de 4 niveles tróficos, con sus respectivas características, definidas por la cantidad de nutrientes presentes en el medio y la relación que existe entre estos.

Tabla 1: Extracto Índice estado trófico (TSI)

Clase trófica	P (µg P/L)	N (µg N/L)	Nivel trófico	N/P
Oligotrófico	<15	<400	<30	<26.67
Mesotrófico	15-25	400-600	30-45	26,67-24
Eutrófico	25-100	600-1500	46-70	24-15
Hipertrófico	>100	>1500	70-100	<15

Método de cálculo del índice del estado trófico de Florida, FDEP 305 (B) de 1996.

El aumento en el nivel trófico del agua es inversamente proporcional a la razón de concentración de nitrógeno a fósforo, esto genera un desbalance de nutrientes, lo cual afecta directamente al cuerpo. Las principales causas de este desbalance y desequilibrio pueden ser naturales o de origen antropogénico; en el primer grupo se encuentra el cambio climático, que engloba el cambio de temperatura ambiental, por ende, un aumento o disminución anormal en la temperatura del lago. Las inundaciones y el propio flujo del ciclo del agua arrastran gran cantidad de nutrientes al agua que se deposita en aguas calmas favoreciendo este proceso. En cuanto a las causas antropogénicas, se encuentra; la actividad económica, ganadería, debido al excremento de animales; agricultura, gracias a los fertilizantes que contienen grandes cantidades de nitratos y fosfatos; residuos urbanos, tales como detergentes o jabones; residuos industriales, debido a los compuestos que se generan en cada industria llegando a ser, incluso, tóxicos; emisiones atmosféricas generadores de lluvias ácidas; entre otros (Lürling, et al, 2017).

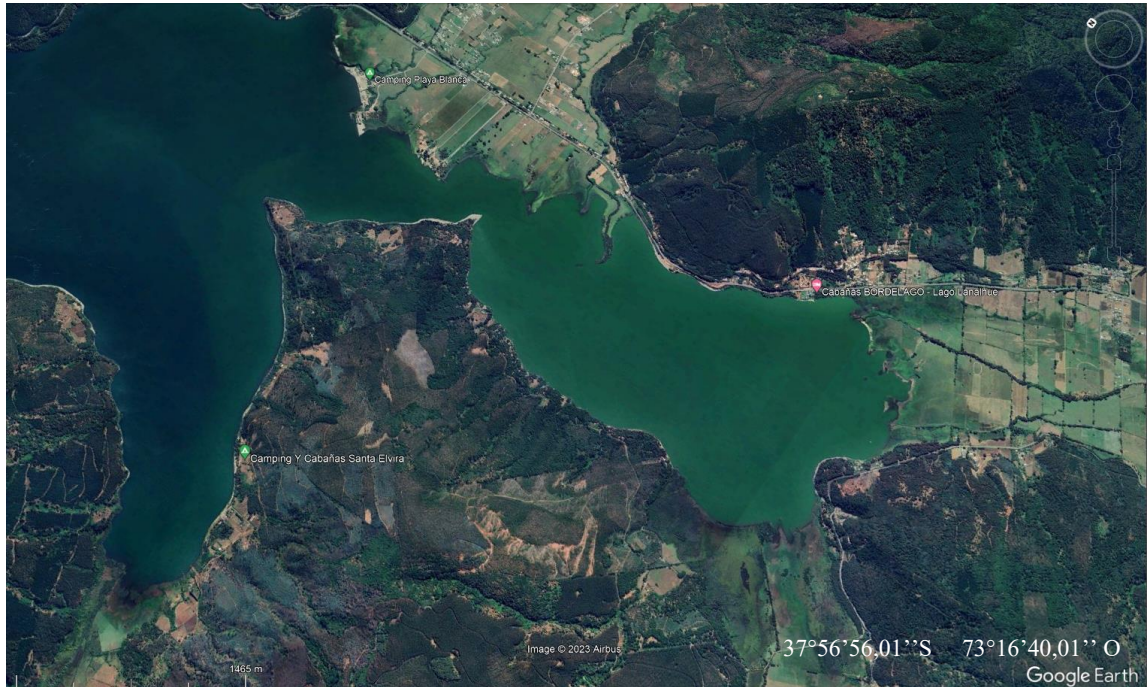


Figura 3. Lago Lanahue (Extraído de Google Earth Pro).

Este fenómeno tiene como consecuencia la proliferación masiva de algas y microalgas, las cuales aumentan el oxígeno disuelto disponible en el agua, sin embargo, cuando comienza la descomposición de estas algas por microorganismos como bacterias, debido a esto aumenta la población de organismos descomponedores, los cuales utilizan todo el oxígeno disponible para los procesos de respiración, al agotarse este por completo se consigue un ambiente anóxico, lo cual en cuerpos de agua estancados, como son los lagos, debido a su baja productividad no se regenera fácilmente (Ricardo, 2020). Además de esto, al generarse un Bloom cianobacterial y debido a la capacidad de flotabilidad de estos organismos, se genera la acumulación de cianobacterias en la superficie del cuerpo de agua, en aguas con poco movimiento de viento, lo cual, provoca turbidez y sofocamiento de la vegetación acuática sumergida, haciendo aún más extremo la escasez de oxígeno. Estas bacterias a su vez provocan compuestos odorantes y saborizantes (Ibelings & Maberly, 1998).

Todo esto afecta la calidad y servicios ecosistémicos de soporte, aprovisionamiento, regulación y cultural (Camacho, 2012), dado que se pierde el potencial recreacional del cuerpo lacustre, por la imposibilidad del uso humano para actividades de baño o deporte, entre otros, también afecta el consumo de agua, si el lago tiene fin de provisión o riego. En cuanto al ciclo natural ecosistémico, se imposibilita o interrumpe el ciclo de nutrientes, fotosintético habitacional de especies, entre otros.

2.3. Toxicidad de *Microcystis aeruginosa*

Las cianobacterias que se generan en estas floraciones pueden producir metabolitos secundarios tóxicos, los cuales son conocidos como cianotoxinas (Carmichael, 2001), aun es desconocido el origen o el factor condicionante de la producción de estas toxinas, varios estudios sugieren que este proceso está directamente ligado al nivel trófico del cuerpo de agua (Hairston, et al, 2001).

Existe una gran cantidad de cianotoxinas producidas por más de 10 cianobacterias, variando el grado de toxicidad entre cada una y a su vez, en cada tipo de cianotoxinas existen diversas variantes. La Microcistina posee más de 90 variantes con grados de toxicidad diferentes, como es la Microcistina-LR (MC-LR). Al desarrollarse estas toxinas se aumentan las consecuencias negativas de las floraciones, agregándose el posible desarrollo de enfermedades o hasta muerte de animales y humanos. La Microcistina se considera una hepatotoxina, ya que afecta al sistema hepático hasta el punto de ser posible generador de cáncer (Braun, *et al* 2002).

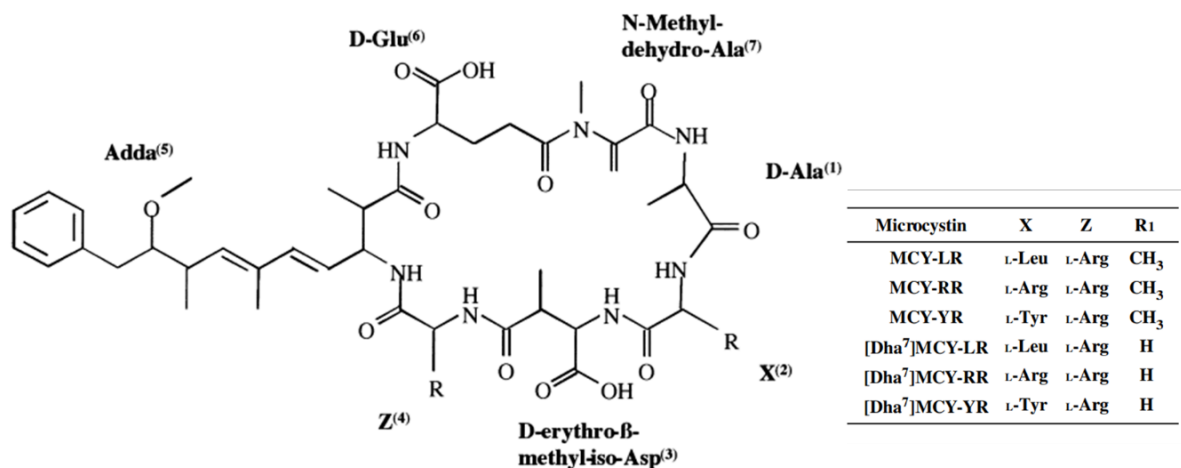


Figura 4. Estructura general de las microcistinas.

El L-amino es variable y se encuentre en la posición X y Z, como se puede ver en la tabla asociada (Tillett et al., 2000; Tanabe et al., 2009)

La toxicidad de la *Microcystis aeruginosa* depende de la expresión del gen tóxico que se expresa, como ya se planteó, bajo el nombre de metabolito secundario. Estos genes son principalmente los genes NRPS (Sintetasas peptídicas no ribosómicas, por sus siglas en ingles), genes PKS (policétido sintasa, por sus siglas en inglés), transportador ABC y enzimas tailoring.

Tabla 2. tipos de enzimas transcritas por genes mcy

Enzima	Gen mcy
NRPS	Mcy G _P -E _P -A-B-C
PKS	Mcy G _K -D-E _K
Transportador ABC	Mcy H
Enzimas tailoring	Mcy J-I-F

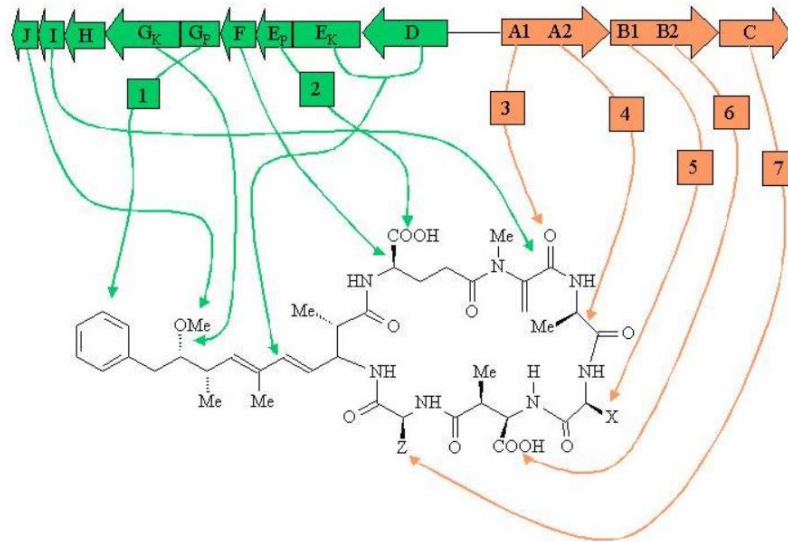


Figura 5. El operón mcy para la biosíntesis de Microcistina en *Microcystis aeruginosa*

Los genes se denominan A-J y son responsables de agregar partes individuales de la molécula de toxina. (Tillett et al, 2000).

Aún es desconocida la función de dicha toxina, aunque un estudio de Rantala et al. (2004) proponen que los genes responsables de la expresión tóxica en *Microcystis aeruginosa* tienen sus orígenes hace 3500 millones de años, antes de la aparición de células eucariontes, lo cual anularía su potencial función de defensa frente a predadores u competencia.

2.4 Factores condicionantes

Debido a la actual incertidumbre frente al por qué se expresa o no el gen tóxico de la *Microcystis aeruginosa* es que en este estudio se considerarán los factores de nitrógeno y fósforo, en combinación con temperatura, para así conocer como este nuevo ambiente afecta en la producción y crecimiento de la bacteria.

2.4.1 Nitrógeno (N_x)

Algunas cianobacterias fijan nitrógeno atmosférico como parte de su metabolismo, por lo tanto, es un nutriente clave en el correcto funcionamiento de éstas. Para la fijación de N_2 se requiere del complejo enzimático nitrogenasa, que reduce a NH_4^+ con la incorporación de un grupo amino (NH_2) a la glutamina, y está localizado en los heterocistos, aunque hay algunas especies filamentosas no heterocíticas que también tienen la enzima y podrían fijar N_2 (Aguilera et al., 2011). La fijación de este elemento dependerá de la disponibilidad de el mismo, además de fierro y fósforo, comportándose como elementos limitantes del crecimiento fitoplanctónico.

Se ha demostrado de manera experimental que una disminución en la concentración de este elemento genera una limitante en el crecimiento celular, así como, el crecimiento en concentraciones de exceso de nitrato (mayor a 20 M) también generó una disminución en la velocidad de desarrollo y crecimiento (Sevilla, E, 2010).

En cuanto a su efecto en la liberación de Microcistina, se considera el nitrógeno, con relación a su concentración con fosforo; ya que la *Microcystis es* una bacteria no fijadora de este nutriente. Según un estudio realizado en el 2022 por Benjun Zhou, el nitrógeno resulta ser el factor limitante cuando esta relación N:P es menor a 10, por lo contrario, si esta es mayor a 20, el elemento limitante es el fósforo. En este mismo

experimento se determinó un aumento de crecimiento de *Microcystis* en una proporción de 100.

2.4.2 Fósforo (P)

Este elemento tiene función estructural debido a su presencia en los ácidos nucleicos y membrana plasmática celular, por ende, de esta disponibilidad depende la cantidad de divisiones celulares que se llevarán a cabo, pudiendo llegar de 2 a 4 con almacenamiento de fósforo (Scheurs, 1992).

Debido a la instancia que tiene este elemento en la subsistencia de las cianobacterias, este se considera el principal factor limitante del crecimiento, ya que cuando existen altos niveles disponibles, son incorporados y utilizados rápidamente por los organismos. Debido a este alto requerimiento el nivel de fósforo decrece hasta llegar a un valor umbral, si no se excede este alcance no se produce crecimiento poblacional (Rosso, L. 2011).

En lagos del hemisferio norte, específicamente Estados Unidos, la proliferación algal y fenómenos de floración cianobacterial están dadas por las grandes cantidades de fósforo dispuesto en estos (US EPA, n.d). Es por esto, que las medidas de mitigación y prevención se enfocan a disminuir las cantidades de este mismo elemento, utilizando agentes coagulantes, (TECPA, 2022) dicho método es utilizado en aguas residuales en Chile, pero aun no se ha logrado estandarizar un método según las necesidades propias del territorio. (Fósforo: Transporte Y Disponibilidad En Aguas Superficiales, n.d.)

2.4.3 Temperatura:

Se ha observado una fuerte relación entre los cambios de temperatura y el desarrollo de cianobacterias, ya que en zonas templadas se observa un

aumento en las floraciones algales en estaciones de verano, primavera y hasta otoño. El máximo desarrollo se observó en cultivos con temperaturas de 20°C a 35°C (Rosso et al., 2014).

Sin embargo, debido a la gran capacidad de adaptación a condiciones extremas de temperatura, los distintos tipos de cianobacterias pueden variar, observando floraciones en zonas templadas o incluso con temperaturas extremas polares, o termales (Ward, et al 1994).

El efecto directo del aumento de la temperatura aún sigue siendo tema controversial, pero según experimentos realizados por Lozano, F. et. al, el aumento en la temperatura tiene un efecto directamente proporcional con el desarrollo bacteriano.

En estudios en los cuales se analiza el contenido de toxinas en las cianobacterias, se concluyó que la manipulación de esta revela un aumento de estas (Rapala et al., 1997) (Brutemark et al., 2015). Asimismo, a temperaturas más cálidas la tasa de crecimiento aumenta y se promueve la replicación de toxinas (Davis et al., 2009).

2.5 Hipótesis

Se espera que el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* se vea favorecido por el aumento de la concentración de fósforo y de la temperatura.

2.6 Objetivos

2.6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los factores ambientales de temperatura y nutrientes (P y N) sobre el crecimiento de *Microcystis aeruginosa*.

2.6.2 Objetivos específicos

- Obtener un cultivo unialgal de *Microcystis aeruginosa* en condiciones controladas de laboratorio.
- Determinar la curva de crecimiento de *Microcystis aeruginosa*.
- Determinar cómo los factores nutrientes (N/P) y temperatura favorecen el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio.

Capítulo 3: Metodología

3.1 Obtención de muestras

Para este estudio se utilizaron muestras de agua de tres lagos del Centro Sur de Chile, obtenidas por diferentes proyectos de investigación del Centro EULA-Chile.

Las muestras obtenidas corresponden a los lagos Vichuquén (Región del Maule), Lago Lanalhue (Región del Biobío) y lago Villarrica (Región de la Araucanía).

3.2 Acondicionamiento de muestras

Luego de obtenidas e identificadas las muestras se procedió a acondicionarlas a los parámetros de volumen (45 ml), temperatura: ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), iluminación ($30 \mu\text{mol fotones}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), fotoperiodo (ciclos de luz-oscuridad 14-10 horas) y medio de cultivo BG-11 (Tabla 4). El medio de cultivo fue cambiado cada cinco días para fomentar la proliferación bacteriana, este proceso se realizó vaciando el 50% del cultivo y rellenando con medio.

Todo el proceso se realizó en ambiente estéril utilizando mechero o bajo campana de flujo laminar, según fue necesario.

Tabla 3. Composición BG-11 cultivo cianobacterias

Reactivos	Cantidad
Stock I	1000ml → 100x
	K ₂ HPO ₄ 4,0 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O 7,5 g
	CaCl ₂ .2H ₂ O 3,6 g
	Citrato NH ₄ ⁺ 0,6 g
Stock II	1000ml → 100x
	Na ₂ Mg EDTA 0,1 g
	Na ₂ CO ₃ 2,0 g
Stock traza metales	1000ml → 1000x
	H ₃ BO ₃ 2,86 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O 1,81 g
	ZnSO ₄ .5H ₂ O 0,22 g
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,39 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O 0,079 g
Stock NaNO₃	1000ml → 20x
	NaNO ₃ 30,0 g
Stock Tiosulfato	24,8% g/L
	Na ₂ S ₂ O ₃ . 5H ₂ O 49,6 g/200 ml
Medio (1000ml)	*Reactivos: Solución 1:8 10.0 ml c/u
	**Reactivos: Solución 9 1.0 ml

Adaptación de Culture Collection of algae & protozoa, 2019

Completar hasta 1 litro con agua desionizada. Ajuste el pH a 7,2 con NaOH o HCl 1M.

*Reactivos Stock I, II, NaNO₃ y Tiosulfato. **Reactivos Stock traza metales.

3.3 Obtención de cultivo unialgal de *Microcystis aeruginosa*

Para lograr mayor representatividad y pureza de resultados, se lleva a cabo una “siembra por agotamiento del cultivo” la cual, comienza, para cada una de las muestras lacustres, con un análisis de muestra bajo microscopio “Carl Zeiss AxioPlan 2 Imaging”, con este se realiza un reconocimiento de especies, buscando lograr una muestra unialgal de *Microcystis aeruginosa*.

Debido a las propiedades de flotabilidad de esta bacteria se debe centrifugar la muestra en centrifuga “MiniSpin®” 4.000 rpm por 10 minutos, utilizando tubos eppendorf de 2ml, luego extraer con un asa de siembra de platino con mango de plástico, se utiliza una “técnica de siembra por estría”, por duplicado de cada muestra en placas de agar-BG11.

Tabla 4: Composición placas agar-BG11

	Volumen (ml)	% Composición
Medio BG-11	30,00	20
Agar-agar	49,95	33,3
Agua Desionizada	70,05	46,7

Composición para 15 placas de 10ml cada una.

Estas placas se mantienen con las condiciones del cultivo inicial, siendo observadas cada 3 días para el monitoreo del crecimiento y desarrollo bacteriano, una vez se logra apreciar crecimiento se extrae un inóculo para su evaluación bajo microscopio, esperando observar cada vez menos especies algales y bacterianas. Si al observar se encuentran especies no deseadas se debe cultivar nuevamente en el medio líquido, utilizando un filtro de membrana PTFE (teflón) poro tamaño 0.45 μm y 0.25 μm para así retener cualquier especie de mayor tamaño, luego se debe esperar crecimiento celular de cinco a siete días y realizar nuevamente el procedimiento de siembra en placa, hasta que al observar bajo microscopio el inóculo, solo cuente con la especie *Microcystis aeruginosa*.

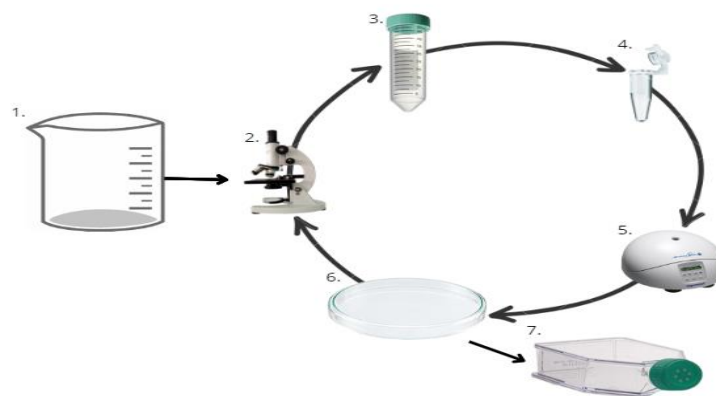


Figura 6. Esquema del proceso de obtención del cultivo unialgal de *Microcystis aeruginosa*.

1. Muestra lacustre. 2. Observación bajo microscopio. 3. Siembra en medio de cultivo BG-11. 4. Tubo eppendorf 2ml. 5. Centrifuga Mini Spin. 6. Siembra en placa Petri agar-BG11. 7. Frasco de cultivo en suspensión.

Luego de realizar este procedimiento se seleccionó la muestra con mayor cantidad y calidad de células basada en la observación de microscopio, descartando las dos muestras restantes para el presente estudio.

3.4 Determinación de curva de crecimiento *Microcystis aeruginosa*

Para determinar el crecimiento bacteriano es necesario conocer cada una de las fases de la curva de crecimiento de una especie. Debido a que en este estudio se busca analizar la respuesta de esta cepa a alteraciones en la concentración de nutrientes en el medio y temperatura de cultivo, se debe buscar el tiempo correcto de realización de dichos experimentos, para evitar alteraciones en los parámetros de crecimiento celular, logrando hacer dos extracciones que se encuentren dentro de la etapa de crecimiento exponencial o logarítmico de la bacteria.

Para esto, una vez aislada la bacteria, obteniendo un cultivo unialgal y uniforme, desde la palca Petri se procede a extraer un inóculo hacia un tubo Falcón de 50ml. El cuál estará en análisis por un máximo de 25 días (Jung et al., 2022), realizando cada 2 días conteo celular con “cámara Neubauer”, con previa sonicación en “Retsch Serie 70.791.0006 UR 3 Baño ultrasónico”, (capacidad 45L, tanque de oscilación de 11.8 x 19.7 x 11.8 in 110-130V) para lograr una separación de las colonias y hacer más fácil el recuento.

Para la utilización de la cámara Neubauer se homogeniza la muestra en un sonicador en tubos eppendorf de 2ml, luego se arma la cámara colocando la laminilla limpia en la zona central de la cámara, luego se llena con una pipeta, sin sobrecargar la zona, se deja reposar un aproximado de dos

minutos para lograr la precipitación de las células. Finalmente se visualiza la muestra en un microscopio con objetivo de 10X y de ser necesario 40X, usando un contador manual para facilitar el proceso, se deben realizar 3 conteos en la cuadrilla superior y 3 de la inferior, mediante la Figura 7.

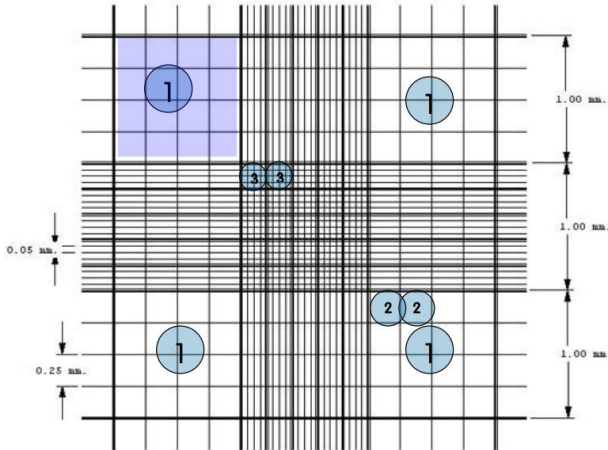


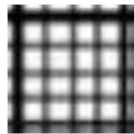
Figura 7. Cámara De Neubauer CE - Quercuslab.es, n. d

Tabla 5: Ejemplificación resultados conteo mediante cámara Neubauer

	1	2	3	Promedio
RETÍCULO SUPERIOR	X ₁	X ₂	X ₃	$\Sigma X_{1-3}/3$
RETÍCULO INFERIOR	Y ₁	Y ₂	Y ₃	$\Sigma Y_{1-3}/3$

Luego de obtener los datos detallados en la Tabla 6 se calcula la concentración celular en base al volumen

Ecuación 1: 1/16th de CUADRADO 3



$$\text{Concentración celular} = (\bar{X} + \bar{Y})/4.000.000$$

*Área = 0,05 mm x 0,05 mm = 0,0025 mm²

*Volumen = 0,0025mm² x 0,1 mm = 2,5 x 10⁻⁴ mm³ = 2,5 x 10⁻⁷ ml

Finalizados los 25 días de conteo se realiza la curva de crecimiento celular (Figura 8), en base a la concentración y tiempo para así, definir el tiempo de experimentación con la cepa utilizada.

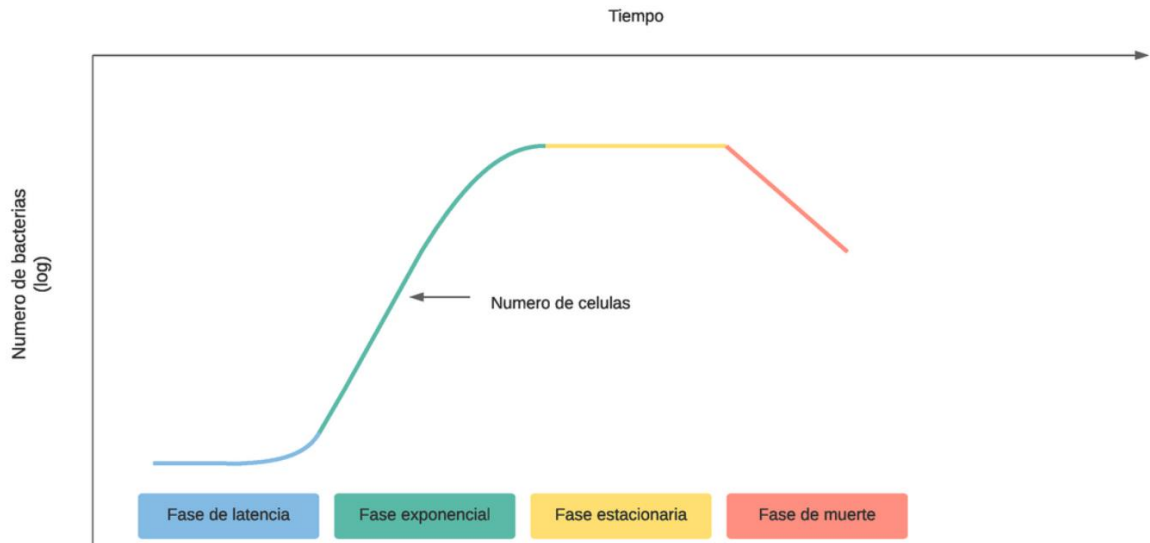


Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano con fases. (Studocu, n.d.)

3.5 Diseño experimental

Una vez determinado el tiempo de fase logarítmica de *Microcystis aeruginosa* en las condiciones de laboratorio ya descritas, se llevó a cabo con el diseño experimental que tiene como objetivo determinar cómo los factores nutrientes (N/P) y temperatura favorecen la producción de *Microcistinas*, esto se logra realizando cambios en las concentraciones de dichos nutrientes al medio BG-11 y a 3 temperaturas distintas.

Esta etapa experimental busca conocer la respuesta de *Microcystis aeruginosa* a estos cambios, lo cual contará con un análisis de representatividad y significancia, por ende, se trabajará por triplicados de muestras (Tabla 7), siendo posible así realizar las pruebas posteriores. El medio de cultivo control BG-11 se realizará a cada temperatura, para conocer el comportamiento de la bacteria sin estresarlo a condiciones

cambiantes de nutrientes, solo el efecto de temperatura y a la vez, para llevar un seguimiento del normal funcionamiento de crecimiento de esta.

Tabla 6: Esquematización ensayo estudio efecto de nutrientes y temperatura

	T₁=15°C	T₂=20°C	T₃=26°C
*Control	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
[N:P]=15	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
[N:P]=0,1	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
Ausencia de N	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○

* El medio de cultivo BG-11 se considera como control.

3.5.1 Nutrientes

Para la variación de nutrientes se trabajó con las razones N:P iguales a 15, 0,1 y en ausencia de N. A continuación, se presenta la composición de cada uno de esos escenarios:

N:P=15

Cambio en la solución Stock NaNO_3 148,741 gramos en 250 ml (7 M).

Tabla 7: Medio de cultivo N:P 15

Reactivos	Cantidad
Stock I	1000ml → 100x
	K_2HPO_4 4,0 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,5 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,6 g
	Citrato NH_4^+ 0,6 g
Stock II	1000ml → 100x
	$\text{Na}_2\text{Mg EDTA}$ 0,1 g
	Na_2CO_3 2,0 g
Stock traza metales	1000ml → 1000x
	H_3BO_3 2,86 g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,22 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,39 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079 g
Stock NaNO_3	1000ml → 20x
	NaNO_3 148,74 g
Stock Tiosulfato	24,8% g/L
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 49,6 g/200 ml
Medio (1000ml)	*Reactivos: Solución 1:8 10.0 ml c/u
	**Reactivos: Solución 9 1.0 ml

Adaptación de Culture Collection of algae & protozoa, 2019

Completar hasta 1 litro con agua desionizada. Ajuste el pH a 7,2 con NaOH o HCl 1M.

*Reactivos Stock I, II, NaNO_3 y Tiosulfato.

**Reactivos Stock traza metales.

N:P=0,1

Se crea nueva solución Stock I con las siguientes características (Tabla 9):

K ₂ HPO ₄	10g	}	en 250ml
MgSO ₄	1,875g		
CaCl ₂	0,9g		

No se adicionó el reactivo citrato NH₄⁺

Tabla 8: Medio de cultivo N:P 0,1

Reactivos	Cantidad	
Stock I	1000ml → 100x	
	K ₂ HPO ₄	10,0 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,88 g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9 g
Stock II	1000ml → 100x	
	Na ₂ Mg EDTA	0,1 g
	Na ₂ CO ₃	2,0 g
Stock traza metales	1000ml → 1000x	
	H ₃ BO ₃	2,86 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g
	ZnSO ₄ .5H ₂ O	0,22 g
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079 g
Stock NaNO₃	1000ml → 20x	
	NaNO ₃	148,74 g
Stock Tiosulfato	24,8% g/L	
	Na ₂ S ₂ O ₃ . 5H ₂ O	49,6 g/200 ml
Medio (1000ml)	*Reactivos: Solución 1:8	10.0 ml c/u
	**Reactivos: Solución 9	1.0 ml

Adaptación de Culture Collection of algae & protozoa, 2019

Completar hasta 1 litro con agua desionizada. Ajuste el pH a 7,2 con NaOH o HCl 1M.

*Reactivos Stock I, II, NaNO₃ y Tiosulfato.

**Reactivos Stock traza metales.

Ausencia de N

Se elabora un nuevo medio sin adición de solución NaNO_3 (Tabla 10).

Tabla 9: Medio de cultivo en ausencia de N

Reactivos	Cantidad
Stock I	1000ml → 100x
	K_2HPO_4 4,0 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,5 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,6 g
	Citrato NH_4^+ 0,6 g
Stock II	1000ml → 100x
	$\text{Na}_2\text{Mg EDTA}$ 0,1 g
	Na_2CO_3 2,0 g
Stock traza metales	1000ml → 1000x
	H_3BO_3 2,86 g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,22 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,39 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079 g
Stock Tiosulfato	24,8% g/L
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 49,6 g/200 ml
Medio (1000ml)	*Reactivos: Solución 1:8 10.0 ml c/u
	**Reactivos: Solución 9 1.0 ml

Adaptación de Culture Collection of algae & protozoa, 2019

Completar hasta 1 litro con agua desionizada. Ajuste el pH a 7,2 con NaOH o HCl 1M.

*Reactivos Stock I, II, NaNO_3 y Tiosulfato.

**Reactivos Stock traza metales.

3.5.2 Temperatura

La variación de temperaturas se realizó en tres cámaras de cultivo, programadas con ciclos de luz: oscuridad 14:10 hrs. Las temperaturas para esta experimentación han sido escogidas en base a condiciones extremas que se pudieran presentar en lagos de la zona centro sur de Chile, siendo el máximo de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y el mínimo $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, y un rango medio de temperatura correspondiente a los $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A continuación, se realiza un análisis para cada uno de esos casos:

26°C ; La temperatura máxima promedio de los lagos concentrados en la zona del Ecuador, principalmente en el continente europeo es de 26°C , por esta razón será considerada la temperatura extrema (Water Temperature, n.d.).

20°C ; Este corresponde al parámetro medio y se acerca a la media de temperatura analizada y modelada para los lagos continentales en los próximos 30 años (Ágora, 2020).

15°C ; en el estudio realizado por Lagos Climate se analizan lagos de todo el mundo, donde la temperatura mínima alcanza hasta 5°C , pero en promedio de los lagos continentales centrales del globo, se obtiene la temperatura de 13°C , para lograr hacerlo representativo y no aislar parámetros el extremo menor será de 15°C

3.6 Parámetros por evaluar

Se realizaron 3 mediciones en un tiempo experimental obtenido según los resultados de la curva de crecimiento bacteriano. La primera medición fue la condición inicial “tiempo 0”, la cual fue obtenida directamente desde el inóculo inicial en el medio de cultivo BG-11.

A esto se le adicionan 2 extracciones de muestra, la primera extracción será en la mitad del tiempo de experimento total o a la mitad de la fase

logarítmica y la segunda al final de la fase estacionaria, para comprobar el pick celular.

3.6.1 Cantidad celular

La cantidad de células se midió para así conocer cómo los cambios de parámetros a estudiar afectan el crecimiento tanto en las colonias como en la cantidad de células, la obtención de este resultado será en concentración celular, es decir, número celular por volumen estudiado.

Este análisis se llevó a cabo de la misma manera que se realizó la curva de crecimiento, mediante conteo utilizando la cámara Neubauer y próximo cálculo de concentración celular, en cada uno de los ensayos y en cada extracción. Luego graficó comparativamente el crecimiento obtenido, así como también, singularmente. Se realizó un recuento por muestra en los dos tiempos de extracción, para posteriormente ser comparados y analizados tanto aislados como en conjunto.

3.7 Análisis estadístico

Luego de obtenidos los datos se analizó la significancia de los datos y la correlación de estos. Para esto se realizó ANOVA de dos vías y luego se realizó Test posthoc de Tukey.

Capítulo 4: Resultados

4.1 Obtención de cultivo unialgal de *Microcystis aeruginosa*

El ciclo de observación, trasvasiado, centrifuga, pipeteo, filtrado y siembra se llevó a cabo 3 veces, lográndose observar resultados importantes en los cultivos. Cada proceso tuvo una duración aproximada de 3 semanas, ya que el cultivo en placa demora al menos 7 días para mostrar crecimiento.



Figura 9. Incubación en placa en período de 11 días.

Se realizó conteo continuo cada dos días, para simular curva de crecimiento de cada cepa (Figura 10, 11 y 12), como acción preliminar a la realización de la curva de crecimiento que se utilizó en este estudio, esta se realizó únicamente con el fin de familiarizarse con el método de conteo. Finalmente se contabilizó las células de bacterias cultivadas, para tener un estimativo de cantidad y poder comparar la eficacia del método de purificación.

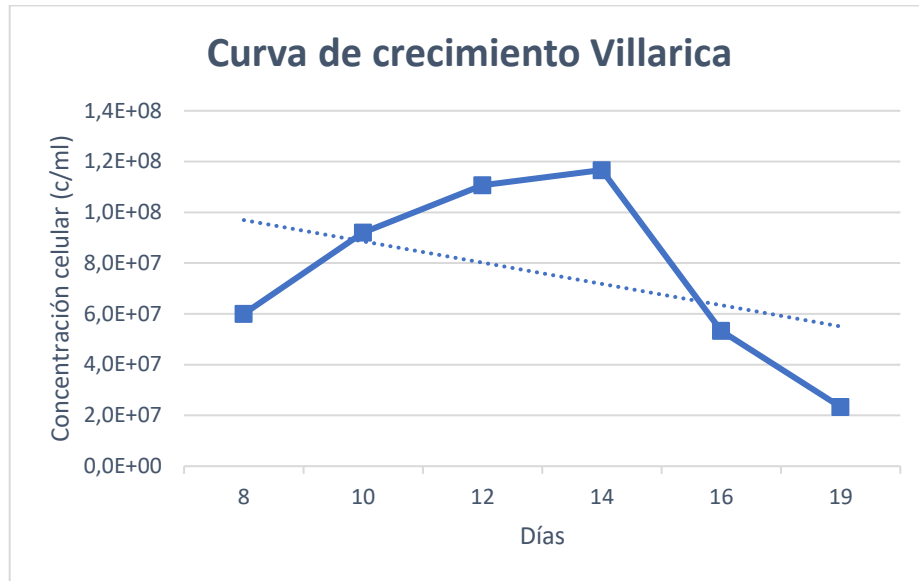


Figura 10. Curva de crecimiento experimental Lago Villarrica utilizando la fórmula *Technical Notes*.

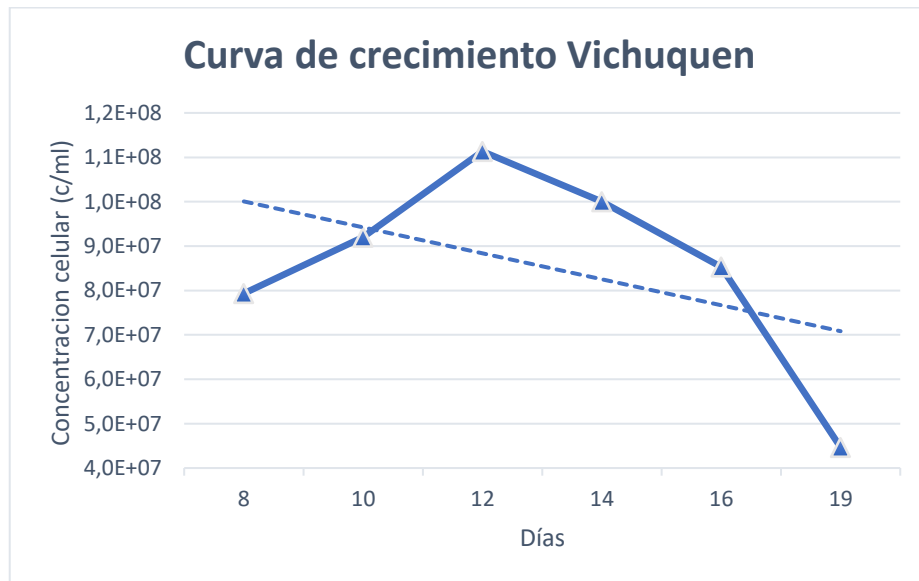


Figura 11. Curva de crecimiento experimental Lago Vichuquén utilizando la fórmula *Technical Notes*.

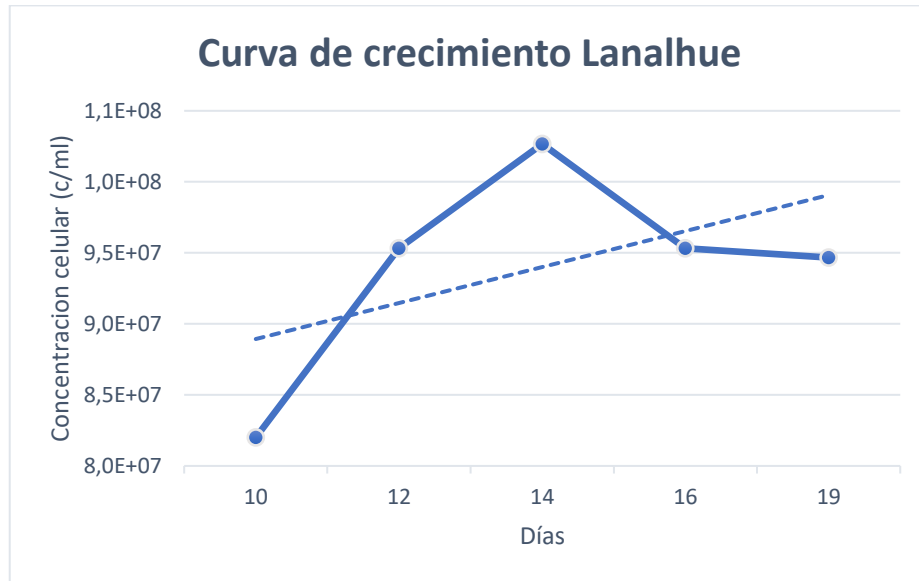


Figura 12. Curva de crecimiento experimental Lago Lanalhue utilizando la fórmula *Technical Notes*.

Las imágenes presentadas en la Figura 13 corresponden al último ciclo de limpieza, teniendo un buen resultado en las tres muestras, ya que se logró el aislamiento de la bacteria, sin presencia de algas presentes naturalmente en este tipo de muestras. Se observó (Figura 14) en el Lago Vichuquén una menor cantidad celular, siguiendo el Lago Lanalhue y por último el Lago Villarrica, con una mayor cantidad por volumen. La integridad celular en el Lago Lanalhue con la implementación del filtro 0,45mm fue mayor, lo cual confirma lo planteado en la Técnica de Aislamiento propuesta por la Universidad de Miguel Hernández. Esta última se determinó bajo observación en microscopio y comparación entre las muestras, usando criterio propio.

Es por estas razones que el cultivo elegido para realizar el diseño experimental, con la previa curva de crecimiento fue el Lago Lanalhue, filtrado con poro de apertura 0,45mm posterior a 3 ciclos de purificación.

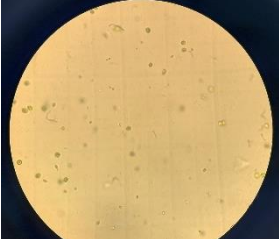
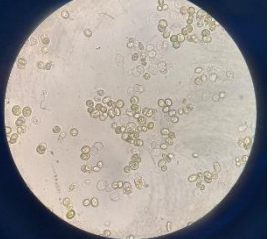
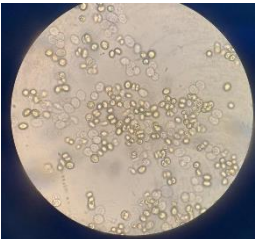




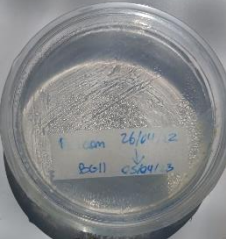

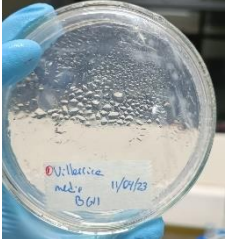
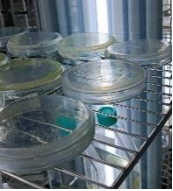



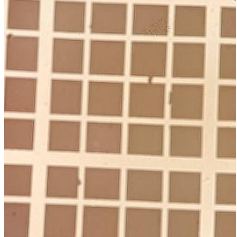

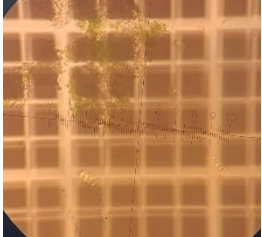
Etapa	Lago Vichuquen	Lago Lanalhue	Lago Villarrica
Observación bajo microscopio Carl Zeiss AxioPlan 2 Imaging obj. 4X			
Centrifuga Mini Spin 4.000rpm x 10 minutos			
Filtrado 0,45 y 0,25 mm filtros estériles.			
Siembra día 1			
Siembra día 7 			
Resultado final observación bajo microscopio tercer ciclo			

FIGURA 13. Resultados por etapa y lago

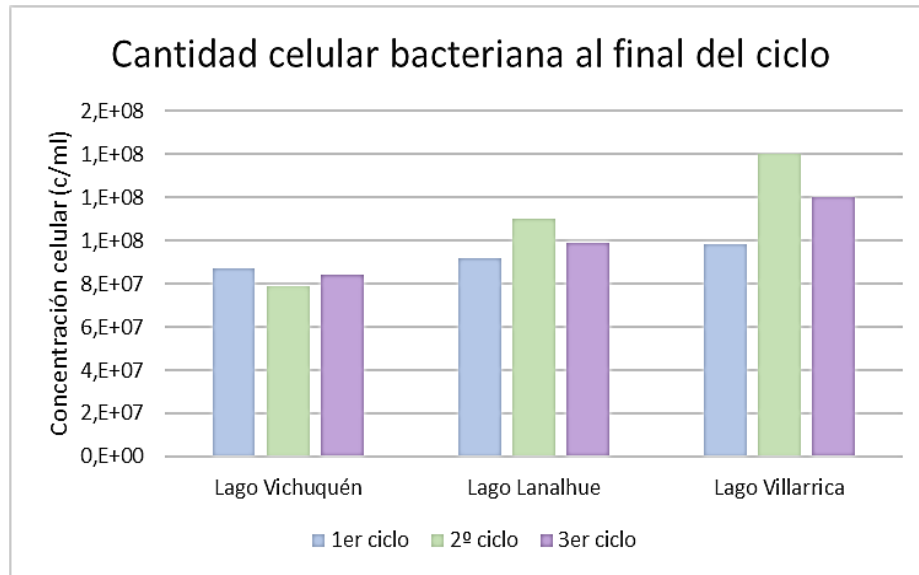


Figura 14. Cantidad celular bacteriana al final del ciclo

4.2 Curva de crecimiento *Microcystis aeruginosa*

Una vez escogido el cultivo a utilizar, se procedió a sembrar este únicamente en placa Petri Agar-BG11 y una vez observado crecimiento de colonias, se hizo el conteo del inóculo inicial desde el mismo.

Tabla 10 Conteo Inóculo inicial muestra Lanalhue filtrada 0.45mm con cámara Neubauer

Conteo Inóculo inicial muestra Lanalhue filtrada 0.45mm	
Retículo superior	Retículo inferior
236	209
58	84
245	170
Concentración inicial (c/ml)	6,68 E+08

Para generar la curva de crecimiento se realizaron 9 conteos, en un total de 18 días, con sonicación previa de la muestra (Figura 15), para lograr una mayor separación de moléculas y visualización.



Figura 15. Sonicación previa a conteo, duración de 10 minutos a 35.000 oscilaciones por segundo

Se realizaron intentos de conteo sin la sonicación previa, en la cual se observó aglomeraciones de *Microcystis aeruginosa*, debido a la capacidad de formación de colonias que tiene esta bacteria, lo cual, según Piccini (2022) resulta complejo de cuantificar y poco representativo, esto genera que exista acumulación de células en una zona del retículo, pero sin encontrar en otras regiones de este mismo.

Debido a esto se intentó realizar vortex a bajas rpm, basado en la propuesta de procedimiento de aislación celular de Rodríguez-Pardo (n.d), pero este es más agresivo, por lo que puede existir lisis celular no deseada o llegar a tener el efecto contrario, que es que la unión celular de *Microcystis aeruginosa* sea más fuerte que el poder mecánico que está ejerciendo el equipo.

Tabla 11 Conteo para curva de crecimiento *Microcystis aeruginosa*

Conteo para realización de curva de crecimiento <i>Microcystis aeruginosa</i>			
Conteo	Retículo superior	Retículo inferior	Concentración celular
1	18	41	6,40 E+07
	9	3	
	19	6	
2	119	102	1,67 E+08
	6	8	
	13	3	
3	90	153	3,26 E+08
	144	166	
	33	41	
4	172	88	3,35 E+08
	24	44	
	110	64	
5	170	39	4,74 E+08
	34	82	
	172	214	
6	140	143	6,13 E+08
	91	228	
	205	113	
7	235	95	6,32 E+08
	49	99	
	405	65	
8	78	160	5,87 E+08
	149	130	
	219	145	
9	142	46	3,74 E+08
	72	104	
	40	157	

En base a los datos de la Tabla 13 se realiza en el Software Excel una gráfica (Figura 16) muestra el comportamiento de crecimiento celular en el medio de cultivo utilizado.

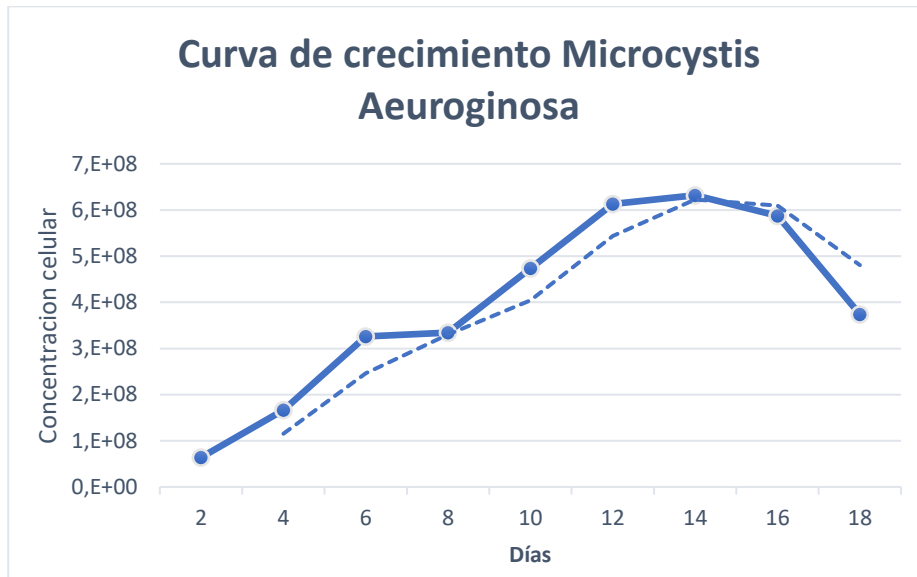


Figura 16. Curva de crecimiento *Microcystis aeruginosa*.

La línea punteada representa la línea de tendencia de tipo media móvil, con período 2, esta ofrece la indicación más temprana de una posible tendencia cambiante.

Según un estudio realizado por Giannuzzi (2019) el tiempo máximo de desarrollo cianobacteriano es de 20 días, por ende y comparando dichos resultados con los propios se logró conocer el tiempo de desarrollo y la duración de cada fase bacteriana dentro de la gráfica de crecimiento; Fase logarítmica o exponencial (11-12 días), fase estacionaria (12-16 días) y finalmente fase de latencia o muerte celular (16 días en adelante).

Se puede observar en la fase logarítmica, entre los días 6 y 8, un fenómeno de retraso en el crecimiento, ya que no cumple con la exponencialidad, esto podría deberse al acondicionamiento de la muestra previo al conteo, lo cual no generaría, a su vez, la correcta separación de las células, complicando el proceso y comprometiendo los resultados.

4.3 Determinación de factores que favorecen el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio

El resultado del diseño experimental implementado (Figura 17) se llevó a cabo en 30 tubos falcón de plástico 15ml graduado, en área esterilizada, inóculo inicial por muestra, además de un control negativo por cada temperatura.



Figura 17. Disposición final del diseño experimental

4.3.1 Crecimiento celular

Luego de montar el diseño experimental bajo los diferentes factores, de nutrientes y temperatura, como se describieron anteriormente y posterior al conteo de inóculo inicial, los tubos se mantienen en fase de crecimiento hasta el día 8, a la mitad de la fase logarítmica, aquí se realizó la primera extracción de muestras, para realizar el primer recuento celular y el segundo en el día 14, cuando la célula se encuentra en la mitad de la fase estacionaria. Estos resultados se ven expuestos en la Tabla 14, donde se comparan ambos con el inóculo inicial, para tener una representación del comportamiento integral de la *Microcystis aeruginosa*.

Tabla 12 Conteo para realizar cantidad celular; promediando datos de triplicado.

	CONTEO INICIAL		15°C	20°C	25°C
PRIMERA EXTRACCIÓN	6,40 E+07	Ausencia N	4,80 E+08	6,37 E+08	4,69 E+08
	6,40 E+07	N/P 15	6,41 E+08	6,81 E+08	6,06 E+08
	6,40 E+07	N/P 0.1	4,80 E+08	1,98 E+08	1,81 E+08
SEGUNDA EXTRACCIÓN	6,40 E+07	Ausencia N	4,01 E+08	4,68 E+08	4,56 E+08
	6,40 E+07	N/P 15	1,41 E+08	3,44 E+08	7,76 E+08
	6,40 E+07	N/P 0.1	3,30 E+08	1,32 E+08	8,80 E+07

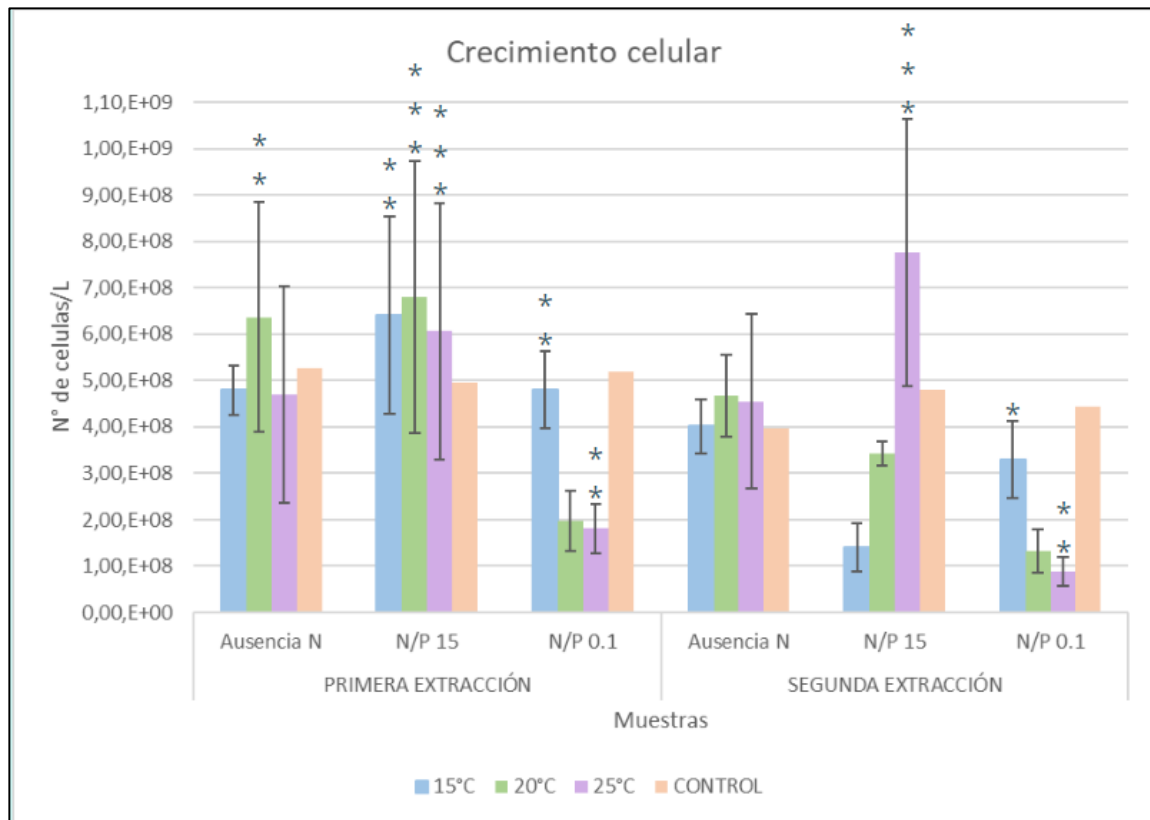


Figura 18. Cantidad celular. Las líneas representan el error de variables. Diferencia significativa; (***) muy significativo, (**) significativo, (*) poco significativo.

Como se logra observar en la Figura 18, en varias muestras se observó que la segunda extracción resultó tener menor cantidad celular que la primera, lo cual rechaza la hipótesis planteada que buscaba un aumento de cantidad al aumentar la cantidad de Fósforo, es decir, en las muestras con concentración N/P 0.1 o en ausencia de Nitrógeno, esto ya que, la especie *Microcystis aeruginosa* no fija Nitrógeno, por ende, según Ding, D.B et al (2019) “El fósforo biodisponible se correlaciona con la abundancia y tasas de crecimiento del fitoplancton”. Sin embargo, lo encontrado en el presente estudio fue que, la cantidad celular aumentó, únicamente en las muestras a 25°C con concentración N/P 15. Esto se podría explicar como un error de análisis por falta de datos, o conteos, lo cual no permite realizar una crítica sobre el cambio específico en cada curva de crecimiento de la bacteria, para cada experimento.

4.3.2 Análisis estadístico

Al obtener todos los resultados se analizó en Excel su validez de comportamiento, comparando medias; encontrando mayor diferencia significativa entre la muestra y el control de cada extracción en los experimentos N/P15 a las tres temperaturas en la primera extracción (Anexo 1).

Como se observó, el único factor que es significativo por sí mismo es la variación de nutrientes, por ende, es el factor o variable clave para el aumento en la cantidad de células de *Microcystis Aeruginosa*, asimismo, la interacción entre nutrientes y temperatura (Anexo 2). Por otra parte, la interacción entre nutrientes, temperatura y tiempo, primera y segunda extracción, también es significativo, es decir, que se deben cumplir todas estas variables para tener un escenario como la figura 18.

Capítulo 5: Discusión

5.1 Obtención de cultivo unialgal de *Microcystis aeruginosa*

En los resultados expuestos por las figuras 10, 11 y 12 se presentó un descenso en la cantidad de *Microcystis aeruginosa* posterior al día 14, lo que difiere a lo expuesto por Bortoli et al. (2014), quienes obtuvieron esta baja en el conteo, posterior al día 18. En contraste, la muestra Villarrica 1 presentaba el mayor conteo celular entre las muestras (en torno a los 1.1×10^8 c/ml) al día 12, supera en gran medida los 10^7 c/ml que expone Bortoli et al. (2014), siendo inclusive menor que los obtenidos por la muestra Lanalhue quien fue la marcaba cerca de 10^8 c/ml para el mismo día. Esta última, es la que ha sido seleccionada para proseguir pues, posterior al día 16 ha presentado una estabilización en la cantidad de *Microcystis aeruginosa* hasta el día 19, similar a la meseta que han indicado otros estudios, en torno al día 20 en sus modelos (Cresttaz-Minaglia et al., 2017; Cresttaz, 2018), a diferencia de la abrupta caída expuesta por las otras muestras (Villarrica 1 y Vichuquén 1).

En cuanto a los observado en la figura 14, la muestra de Vichuquén 1, presenta un comportamiento anómalo entre sus pares, dado que en su segundo ciclo se redujo la población en comparación a su cantidad inicial y final en vez de haber crecido de forma notoria para luego caer a un nivel superior al original, tal y como se ha observado en estudio de hasta 100 días de seguimiento, los cuales a lo largo de su fase de decaimiento o muerte poblacional, llegan a un punto de estabilización superior al de la cantidad inicial del experimento (Chen et al., 2017).

5.2 Curva de crecimiento *Microcystis aeruginosa*

La curva de crecimiento de cultivo de la muestra Lanalhue, bajo los parámetros de control, expuesta en la figura 16, presentan una mayor estabilidad que los expuestos durante el análisis comparativo (figura 12), coincidiendo en una meseta o estabilidad poblacional hasta por 5 días (día 12 a 16), esto es un comportamiento acelerado en comparación a lo expuesto por otros estudios que indican las curvas de crecimiento de *Microcystis* hasta terminar la fase de latencia duran entre 17-22 días (Giannuzzi, 2019; Tomioka et al., 2008; Vézic et al., 2002), por ende, realizar experimentos en un período mayor a 25-27 días sería sobreestimar la actividad celular. Esto es igualmente expuesto por Vézic et al. (2002), quien realizó mediciones a nivel de laboratorio en el lago Kasumigaura (en estado eutrofico), donde las cantidades de *Microcystis* contadas en el cultivo de laboratorio eran superiores por un amplio margen, pero que predecían ciertos patrones de comportamiento en la población del lago Kasumigaura.

5.3 Crecimiento celular

Según Crettaz (2018) y Crettaz-Minaglia et al. (2017) el aumento de temperatura como los nutrientes es directamente proporcional al crecimiento celular, medido en micrómetros y este mismo crecimiento alcanza su pick entre los días 7 y 12, probado entre 15 y 35 °C. Esto coincide con los resultados expuestos en la figura 18, la cual muestra un pick de conteo a una temperatura de 25 °C, marcando en su segunda extracción $7,76 \times 10^8$ células por ml, en contraste a los 15° y 20 °C utilizados, igual como lo ha expuesto Crettaz-Minaglia et al. (2017). Por otra parte, Yan et al. (2024) plantea que al aumentar a 30 °C, los resultados no habrían sido mejores que los obtenidos, dado que al realizar esta comparativa los resultados eran inferiores en comparación a los 25 °C, siendo peor aun cuando se incluía la influencia de la radiación UV.

Según lo obtenido en los recuentos realizados la calidad y cantidad celular en las muestras con mayor concentración de fósforo es baja, asimismo, hay menor cantidad de colonias y se encuentran más dispersas. Además, dichos resultados rechazan lo propuesto por los autores ya nombrados (Bortoli et al., 2014, Ramos-Higuera, 2008), ya que la primera extracción, al día 8, tiene mayor cantidad celular que la segunda extracción, al día 14, exceptuando la muestra N/P 15 a 25°C, en la cual la segunda extracción, aumentando de 6,06 E+08 a 7,76 E+08.

En dichos estudios se compara la cantidad de concentración N/P, en la cual aumenta la cantidad celular (medida mediante recuento celular y clorofila-a) los resultados demuestran cómo en presencia de ambos elementos aumenta la cantidad, llegando a valores de 3 microgramos por litro (Ramos-Higuera, 2008) y cómo a concentración N/P 10 se obtiene mayor cantidad de células por ml que en concentración N/P 100 (Bortoli et al. 2014). Los resultados propios son coherentes con los ya planteados, ya que, en ambas extracciones, la mayor cantidad obtenida es en la relación de nutrientes N/P 15, exceptuando en la segunda extracción, las temperaturas 15 y 20 grados Celsius, en las cuales las muestras con mayor cantidad celular pertenecen a aquellas en ausencia de Nitrógeno.

Capítulo 6: Conclusiones y Recomendaciones

- La etapa de experimentación que más tiempo llevó fue la de aislamiento de la bacteria, correspondiente al objetivo específico número uno, esto debido a que, se probó varios métodos diversos, por separado y en conjunto, en lugar de realizar una metodología estandarizada. Asimismo, esto podría haber llevado a incoherencias o errores en los resultados posteriores.
- Resulta de suma importancia al realizar una curva de crecimiento el estudio de esta para la cepa específica que se utilizará, esto para no generar más conteos de los necesarios, que además de significar un alargue del estudio en sí, genera un gasto innecesario de instrumentaria. Para esto se obtiene un estimativo del máximo tiempo que debe durar la misma, que en mi caso fue de 22 días, ayudándome a generar únicamente conteos dentro de este tiempo, aunque se halló que a los 16 la cepa de *Microcystis Aeruginosa* llegó a su fase de muerte celular. Asimismo, dependiendo del organismo que se desee estudiar o cultivar, dependerá si requiere de una metodología de disgregación molecular, siendo útil la sonicación para bacterias que contengan mucilagos, como diversas cianobacterias.
- En cuanto al capítulo 4.3.1 “Determinación de factores que favorecen el crecimiento celular de *Microcystis aeruginosa*”; se recomienda, al llevar a cabo el análisis experimental, ósea, la extracción para los próximos conteos, realizar mayor cantidad de extracciones, es decir, llevar a cabo un conteo para poder realizar curvas de crecimiento para cada condición, de esta manera, se podría analizar no solo los datos por separado, sino que, se podrá estudiar cómo varía la curva de crecimiento, el comportamiento y división de la bacteria frente a los cambios realizados. Al no haber realizado esto y sólo contar con dos extracciones a tiempos separados, se puede cometer el error de sobreestimar los datos, ya que, posiblemente existieron datos mayores a los expuestos, a tiempos diferentes, esto sucedería cambiando la curva de crecimiento,

adelantando las fases de esta o atrasándolas, lo cual no significa que haya habido un error de datos, sino que, resulta más complejo analizar o sacar conclusiones con los pocos datos obtenidos.

- Según lo obtenido en los resultados y el análisis bibliográfico realizado, se rechaza parcialmente la Hipótesis Nula que plantea el aumento celular al aumentar la cantidad de fósforo, aunque esto esté justificado en estudios como los de Yao et al (2023), Wu et al (2023) y Li et al (2023), los resultados muestran que el único aumento significativo en la cantidad de *Microcystis aeruginosa* ocurrió al aumentar la temperatura a una extrema y con un exceso de Nitrógeno. Esto puede deberse a que, mi hipótesis fue planteada según estudios que analizaban lagos fuera de Chile, en el territorio nacional, toda la información sobre análisis de Bloom o medidas de mitigación encontrada trataba sobre aguas marinas, debido a la importancia económica de estas, principalmente en el sur de Chile, por la salmonicultura, por ende, los parámetros de fosforo como elemento limitante corresponde a lo analizado en lagos del hemisferio norte del planeta, que cumplen con otras características, tanto de nutrientes, como flora y fauna. Se observó que el lago Lanalhue analizado, respondió al alza de *Microcystis* con un aumento de Nitrógeno principalmente.

- En la propuesta inicial de trabajo se deseaba conocer bajo los mismos parámetros, cómo cambiaría la cantidad de toxina o Microcistina liberada por la bacteria, con el fin de conocer o estimar la razón de esta misma. Esta toxicidad se mediría mediante PCR, (Reacción de cadena Polimerasa) proceso que requiere una serie de pasos previos, tanto la extracción de ARN, creación de cadena ADNc, entre otros, lo cual significó un tiempo de análisis y experimentación mayor. A la hora de llevar a cabo el PCR, los primer o partidores que se iban a emplear (mcyA y mcyE) estaban degradados, esto debido a que el ARN o primer en base ARN son sensibles e inestables a condiciones ambientales normales, al igual que su empleamiento, deben almacenarse de manera

cuidadosa y bajo condiciones específicas, estas estarán dadas por el laboratorio elaborador.

Referencias

Ágora, E. (2020, March 10). La temperatura de los lagos subirá 4oC en 2100. EL ÁGORA DIARIO. <https://www.elagoradiario.com/agua/temperatura-lagos-aumento-2100/>

Aguilera, A., Amé, M. V., Andrinolo, D., & Wunderlin, D. A. (2011). CIANOBACTERIAS COMO DETERMINANTES AMBIENTALES DE LA SALUD Edición 2011 SERIE: TEMAS DE SALUD AMBIENTAL N°. .ResearchGate.https://www.researchgate.net/publication/321228174_CIANOBACTERIAS_COMO_DETERMINANTES_AMBIENTALES_DE_LA_SALUD_Edicion_2011_SERIE_TEMAS_DE_SALUD_AMBIENTAL_N_5_DEPARTAMENTO_DE_SALUD_AMBIENTAL

Amazon.com: Retsch Serie 70.791.0006 UR 3 Baño ultrasónico, capacidad 45L, tanque de oscilación de 11.8 x 19.7 x 11.8 in (H x W x D) 110-130V : Industrial y Científico. (n.d.). <https://www.amazon.com/-/es/70-791-0006-ultras%C3%B3nico-capacidad-oscilaci%C3%B3n-110-130V/dp/B00C1NJSY8>

Bortoli, S., Oliveira-Silva, D., Krüger, T., Dörra, F. A., Colepicolo, P., Volmerb, D. A., & Pinto, E. (2014). Growth and microcystin production of a brazilian microcystis aeruginosa strain (LTPNA 02) under different nutrient conditions. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(4), 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.019>

Braun, A., & Pfeiffer, T. (2002). Cyanobacterial blooms as the cause of a pleistocene large mammal assemblage. *Paleobiology*, 28(1), 139–154. <https://www.jstor.org/stable/3595513>

Camacho, V. (2012). Marco conceptual y clasificación de los servicios ecosistémicos. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/235985361_Marco_conceptual_y_clasificacion_de_los_servicios_ecosistemicos

Cámara de Neubauer CE - Quercuslab.es. (n.d.). <https://quercuslab.es/recuento-celular/940-camara-de-neubauer-ce.html>

Carmichael, W. W. (2001). Health effects of Toxin-Producing cyanobacteria: “The CyanoHABs.” *Human and Ecological Risk Assessment*, 7(5), 1393–1407.

<https://doi.org/10.1080/20018091095087CCAP>,

Chen, J., Gao, N.-Y., Li, L., Zhu, M., Yang, J., Lu, X., & Zhang, Y. (2017). Disinfection by-product formation during chlor(am)ination of algal organic matters (AOM) extracted from *Microcystis aeruginosa*: effect of growth phases, AOM and bromide concentration. *Environmental Science and Pollution Research*, 24. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8515-6>

Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R., & Stanier, R. Y. (1957). Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49(1), 25–68. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490104>

Cortés, F. H., Villca, S. R. C., Toro, D. V., Sarmiento, H. A., & Gómez, R. M. (2017). Variables influyentes en la conducta ambiental en alumnos de unidades educativas, región de Coquimbo-Chile. *Estudios Pedagógicos*, 43(2), 27–46. <https://doi.org/10.4067/s0718-07052017000200002>

Cresttaz-Minaglia, M. C., Rosso, L., Aranda, J. O., Sedán, D., Juárez, I., Ventosi, E., Andrinolo, D., & Giannuzzi, L. (2017). Modelado matemático del crecimiento *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio bajo diferentes temperaturas. *AIDIS Argentina*, 130.

Crettaz, M. (2018). ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE MICROCYSTIS AERUGINOSA Y DE LA PRODUCCIÓN DE MICROCYSTINA EN CULTIVO DE LABORATORIO [UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA]. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/83223>

Cruzito. (2020, September 30). Ambiente anóxico: definición y condiciones | Estudiando. <https://estudiando.com/ambiente-anoxico-definicion-y-condiciones/>

Del Carmen Perez, M., Bonilla, S., De León, L., Šmarda, J., & Komárek, J. (1999). A bloom of *Nodularia baltica-spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. *Archiv Für Hydrobiologie*, 93, 91–101. https://doi.org/10.1127/algol_stud/93/1999/91

Diersing, N. (2009) Water Quality Frequently Asked Questions. Florida Brooks National Marine Sanctuary, Key West, FL. - References - Scientific Research Publishing. (n.d.).

<https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=2692557>

Fósforo: transporte y disponibilidad en aguas superficiales. (n.d.). Extensión

De La UMN. <https://es.extension.umn.edu/f%C3%B3sforo-y->

[potasio/transporte-y-disponibilidad-de-f%C3%B3sforo-aguas-superficiales](https://es.extension.umn.edu/f%C3%B3sforo-y-potasio/transporte-y-disponibilidad-de-f%C3%B3sforo-aguas-superficiales)

Garrido, A. C. (2013, May 2). Método de siembra en estríaMétodo de siembra en estríaStreaking method. SERAMIX.

<https://seramix.blogs.uv.es/2013/05/02/metodo-de-siembra-en-estria/>

Gaysina, L. A., Saraf, A., & Singh, P. (2019). Cyanobacteria in diverse habitats. In Elsevier eBooks (pp. 1–28). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814667-5.00001-5>

Giannuzzi, L. (2019). Cyanobacteria growth kinetics. In IntechOpen eBooks. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81545>

Gobler, C. J. (2020). Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective. Harmful Algae, 91, 101731. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101731>

Hairston, N. G., Holtmeier, C. L., Lampert, W., Weider, L. J., Post, D. M., Fischer, J. M., Cáceres, C. E., Fox, J., & Gaedke, U. (2001). NATURAL SELECTION FOR GRAZER RESISTANCE TO TOXIC CYANOBACTERIA: EVOLUTION OF PHENOTYPIC PLASTICITY? Evolution, 55(11), 2203–2214. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00736.x>

Herdman, M., Janvier, M., Rippka, R., & Stanier, R. Y. (1979). Genome size of cyanobacteria. Journal of General Microbiology, 111(1), 73–85. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-73>

Ibelings, B. W., & Maberly, S. C. (1998). Photoinhibition and the availability of inorganic carbon restrict photosynthesis by surface blooms of cyanobacteria. *Limnology and Oceanography*, 43(3), 408–419.
<https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.3.0408>

Incubadora climática, Ventas Incubadora climática Por mayor. (n.d.).
<http://es.biobase.com/product-list/climate-incubator>

Instituto de Salud Pública de Chile. (n.d.).
<https://www.ispch.gob.cl/biomedico/vigilancia-de-laboratorio/ambitos-de-vigilancia/vigilancia-bacteriologia/>

Jung, J., Baek, J. H., Lee, Y., Jeong, S. E., & Jeon, C. O. (2022). The Self-Bleaching Process of *Microcystis aeruginosa* is Delayed by a Symbiotic Bacterium *Pseudomonas* sp. MAE1-K and Promoted by Methionine Deficiency. *Microbiology Spectrum*, 10(4).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01814-22>

Kelly, D. (2021, November 10). Oldest recorded toxic algal bloom - Lake scientist. *Lake Scientist*. <https://www.lakescientist.com/oldest-recorded-toxic-algal-bloom/>

Lagos climate: Average Temperature by month, Lagos water temperature. (n.d.). <https://en.climate-data.org/africa/nigeria/lagos/lagos-552/>

Li, Z., An, L., Feng, Y., Shen, W., Du, W., & Dai, R. (2023). Evaluation of the Effects of Different Phosphorus Sources on *Microcystis aeruginosa* Growth and Microcystin Production via Transcriptomic Surveys. *Water*, 15(10), 1938. <https://doi.org/10.3390/w15101938>

Lozano2008CianoalertaEP (2008), Cianoalerta: estrategia para predecir el desarrollo de cianobacterias tóxicas en embalses
<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:85583735>

Lürling, M., Van Oosterhout, F., & Faassen, E. J. (2017). Eutrophication and warming boost cyanobacterial biomass and microcystins. *Toxins*, 9(2), 64. <https://doi.org/10.3390/toxins9020064>

Media Recipes – CCAP. (n.d.). <https://www.ccap.ac.uk/index.php/media-recipes/>

Mendoza-Carbajal, L. (2016). El género *Sphaerocavum* y dominancia de *S. brasiliense* y *Microcystis wesenbergii* (Microcystaceae, Cyanophyceae) en la floración algal de la laguna Huacachina, Perú. *Revista Peruana De Biología*, 23(1), 53–60. <https://doi.org/10.15381/rpb.v23i1.11835>

MiniSpin®/ MiniSpin® plus - Mini Centrifuge - Eppendorf US. (n.d.). <https://www.eppendorf.com/us-en/eShop-Products/Centrifugation/Microcentrifuges/MiniSpin-MiniSpinplus-p-PF-240750>

MN Editors. (2023, June 26). Petri Dish - Definition, structure, Types, uses. *Microbiology Note – Online Biology Notes*. <https://microbiologynote.com/es/placa-de-Petri/>

Ngwa, F. F., Madramootoo, C. A., & Jabaji, S. (2014). Comparison of cyanobacterial microcystin synthetase (mcy) E gene transcript levels, mcy E gene copies, and biomass as indicators of microcystin risk under laboratory and field conditions. *MicrobiologyOpen*, 3(4), 411–425. <https://doi.org/10.1002/mbo3.173>

Obaíd, M., Riquelme, R., Calderón, W., Raue, M., & Rojas, M. (2019). Método de aislamiento, cultivo y acondicionamiento con hipoxia de células madre derivadas de tejido adiposo en ratas. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*. <https://doi.org/10.4321/s0376-78922019000200003>

Pesticide Registration | US EPA. (2024, February 12). US EPA. <https://www.epa.gov/pesticide-registration>

Piccini, C. (2015). Caracterización morfológica, genética y óptica de floraciones tóxicas y no tóxicas del Complejo *Microcystis aeruginosa*. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/4973798>

Puschner, B., & Humbert, J. (2007). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In *Elsevier eBooks* (pp. 714–724). <https://doi.org/10.1016/b978-012370467-2/50156-5>

Rabalais, N. N., Díaz, R. J., Levin, L. A., Turner, R. E., Gilbert, D., & Zhang, J. (2010). Dynamics and distribution of natural and human-caused

hypoxia. *Biogeosciences*, 7(2), 585–619. <https://doi.org/10.5194/bg-7-585-2010>

Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., & Sivonen, K. (2003). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 568–573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304489101>

Ris, H., & Singh, R. N. (1961). ELECTRON MICROSCOPE STUDIES ON BLUE-GREEN ALGAE. *Journal of Cell Biology*, 9(1), 63–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.1.63>

Rodríguez-Pardo, V. M. (n.d.). Aislamiento y caracterización de células “stem” mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832010000300004

Rosso, L., Sedan, D., Kolman, M., & Andrinolo, D. (2014). *Microcystis aeruginos strain [D-Leu1] Mcyst-LR producer, from Buenos Aires province*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/306200596_Microcystis_aeruginos_strain_D-Leu1_Mcyst-LR_producer_from_Buenos_Aires_province

Stager, C, (2012). *El futuro profundo* PlanetadeLibros. <https://www.planetadelibros.cl/libro-el-futuro-profundo/128937>

Studocu. (n.d.). Curva del crecimiento bacteriano - Numero de bacterias (log) Fase de latencia Fase exponencial - Studocu. <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-de-guadalajara/microbiologia/curva-del-crecimiento-bacteriano/10174658>

Tanabe, Y., Sano, T., Kasai, F., & Watanabe, M. M. (2009). Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (mcy) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 115. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-115>

Teta, R., Della Sala, G., Esposito, G., Stornaiuolo, M., Scarpato, S., Casazza, M., Anastasio, A., Lega, M., & Costantino, V. (2021). Monitoring Cyanobacterial Blooms during the COVID-19 Pandemic in Campania, Italy: The Case of Lake Avernus. *Toxins*, 13(7), 471. <https://doi.org/10.3390/toxins13070471>

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Von Döhren, H., Börner, T., & Neilan, B. A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, 7(10), 753–764. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(00\)00021-1](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(00)00021-1)

Tomioka, N., Nagai, T., Kawasaki, T., Imai, A., Matsushige, K., & Kohata, K. (2008). Quantification of microcystis in a eutrophic lake by simple DNA extraction and SYBR green real-time PCR. *Microbes and Environments*, 23(4), 306–312. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME08515>

Universidad Miguel Hernández. Técnicas de Aislamiento y Recuento - Prácticas Microbiología UMH. Prácticas Microbiología UMH. <https://docenciamicrobiologia.umh.es/indice-de-practicas/3-tecnicas-de-aislamiento-y-recuento/>

Van Le, V., Srivastava, A., Ko, S., Ahn, C., & Oh, H. (2022). Microcystis colony formation: Extracellular polymeric substance, associated microorganisms, and its application. *Bioresource Technology*, 360, 127610. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127610>

Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., & Sivonen, K. (2002). Effect of Nitrogen and Phosphorus on Growth of Toxic and Nontoxic *Microcystis* Strains and on Intracellular Microcystin Concentrations. *Microbial Ecology*, 43(4), 443–454. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-0041-9>

Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C., Bateson, M. M., Kopczynski, E. D., & Ruff-Roberts, A. L. (1994). Species diversity in hot spring microbial mats as revealed by both molecular and enrichment culture approaches — relationship between biodiversity and community structure. In Springer eBooks (pp. 33–44). https://doi.org/10.1007/978-3-642-78991-5_3

WebDuck Designs. (n.d.). ALT ITEM: 25937 | AxioPlan 2 Imaging Microscope. <https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/carl-zeiss-axioplan-2-imaging-microscope-13929>

Wu, H., Zhang, W., Huang, X., Gu, P., Li, Q., Luo, X., & Zhang, Z. (2023). Phosphorus conditions change the cellular responses of *Microcystis aeruginosa* to perfluorooctanoic acid. *Science of the Total Environment*, 903, 166707. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166707>

Wu, T.; Dai, R.; Chu, Z.; Cao, J. Rapid Recovery of Buoyancy in Eutrophic Environments Indicates That Cyanobacterial Blooms Cannot Be Effectively Controlled by Simply Collapsing Gas Vesicles Alone. *Water* 2023, 15, 1898. <https://doi.org/10.3390/w15101898>

Yan, F., Li, M., Zang, S., Xu, Z., Bao, M., & Wu, H. (2024). UV radiation and temperature increase alter the PSII function and defense mechanisms in a bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1351796. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1351796>

Yao, S., Li, R., Song, W., Tang, Y., Sun, S., & Mao, G. (2023). *Microcystis* spp. and phosphorus in aquatic environments: A comprehensive review on their physiological and ecological interactions. *Science of the Total Environment*, 878, 163136. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163136>

Yin, D., Li, Q., Li, X., & Zhu, R. (2022). Annual water deficit in response to climate variabilities across the globe. *Environmental Research Letters*, 17(5), 054021. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac5d9b>

Zhou, B., & Wang, Z. (2022). Effects of nitrogen and phosphorus on *Microcystis aeruginosa* growth and microcystin production. *Green Processing and Synthesis*, 11(1), 64–70. <https://doi.org/10.1515/gps-2022-0003>

ANEXOS

Anexo 1:

TABLA ANOVA						
	SumaCuadrados	Grado de Libe	Cuadrado Me	F CALC	F TABLA	CONCLUSION
Temperatura	4,12,E+15	2	2,06,E+15	0,02	6,94	EL EFECTO DEL FACTOR NO ES SIGNIFICATIVO
Nutrientes	9,17,E+17	2	4,58,E+17	5,18	6,94	EL EFECTO DEL FACTOR NO ES SIGNIFICATIVO
Tiempo	2,55,E+17	1	2,55,E+17	2,88	7,71	EL EFECTO DEL FACTOR NO ES SIGNIFICATIVO
T°- Nutr	5,75,E+17	4	1,44,E+17	1,62	6,39	EL EFECTO DEL FACTOR NO ES SIGNIFICATIVO
Nutr.T°	1,06,E+21	14	7,54,E+19	3764,00	5,87	EL EFECTO DEL FACTOR ES SIGNIFICATIVO
Nutr-Tiempo	4,93,E+16	2	2,47,E+16	0,28	6,94	EL EFECTO DEL FACTOR NO ES SIGNIFICATIVO
T°-Tiempo	1,76,E+17	2	8,81,E+16	0,99	6,94	EL EFECTO DEL FACTOR NO ES SIGNIFICATIVO
ABC	-1,05,E+21	4	-2,64,E+20	1,00	6,39	EL EFECTO DEL FACTOR NO ES SIGNIFICATIVO

Anexo 2:

		EXTRACCIONES							
		1a extraccion				2a extracción			
		NUTRIENTES							
		CONTROL	sin N	N/P 15	N/P 0.1	CONTROL	sin N	N/P 15	N/P 0.1
TEMPERATURA	15°C	5,27,E+08		**	**	3,98,E+08			*
	20°C	4,96,E+08	**	***		4,79,E+08			
	25°C	5,19,E+08		***	**	4,43,E+08		***	**