
Puesta a punto y validación de un método basado en la fluorescencia *in vivo* de pigmentos como indicador de biomasa de fitoplancton y cianobacterias en cuerpos de agua de Uruguay

Tesis para la Maestría en Biotecnología

Bruno Cremella

2017

Orientadora: Sylvia Bonilla

Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Director externo: Yannick Huot

Laboratoire d'Analyses Environnementales, Université de Sherbrooke, Canadá.

ÍNDICE

FINANCIACIÓN	6
DIFUSIÓN DE RESULTADOS:	6
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Floraciones de cianobacterias y métodos de monitoreo	9
1.2 Bases biológicas de la fluorescencia <i>in vivo</i>	12
1.3 Fluorescencia <i>in vivo</i> aplicada al monitoreo de ecosistemas acuáticos	16
1.4 Situación en Uruguay	18
1.5 Justificación y objetivos	19
1.5.1 Justificación:	19
1.5.2 Objetivo general:	20
1.5.3 Objetivos específicos:	20
1.6 Aproximación:	21
1.7 Estructura de la tesis:	22
1.8 Referencias:	22
CAPÍTULO 2. A SIMPLE QUANTITATIVE MODEL BASED ON <i>IN VIVO</i> PIGMENT FLUORESCENCE FOR MONITORING PHYTOPLANKTON AND CYANOBACTERIA	27
2.1 Abstract	27
2.2 Introduction	28
2.3 Materials and methods	30
2.3.1 Cultures and equipment	30
2.3.2 Raw fluorescence	31
2.3.3 Cross calibration of fluorometers and culture dilution series experiments	

2.3.4	A new model to predict total phytoplankton and cyanobacterial Chl a ...	33
2.3.5	Effects of CDOM and turbidity on total and cyanobacterial chlorophyll a predictions	34
2.3.6	Application of the new in vivo fluorescence model in natural phytoplankton samples	35
2.3.7	Statistical analysis	36
2.4	Results.....	36
2.4.1	RASSS opening and calibration	36
2.4.2	Comparison of independently calibrated fluorometer measurements	37
2.4.3	New model to predict total and cyanobacterial chlorophyll a concentration based on in vivo fluorescence signals.....	37
2.4.4	Effects of CDOM and turbidity on fluorescence.....	38
2.4.5	Comparison with natural samples.....	39
2.4.6	Test of the new model on field measurements	39
2.5	Discussion.....	39
2.5.1	Calibration and secondary standards:.....	40
2.5.2	Measurements with cross-calibrated fluorometers.....	40
2.5.3	Chlorophyll a concentration prediction models.....	40
2.5.4	Optical interferences.....	42
2.5.5	Prediction of field phytoplankton and cyanobacteria chl a	45
2.6	Final remarks	45
2.7	References.....	45
2.8	Tables and Figures	49
CAPÍTULO 3.	DARK STEP CORRECTS PHYTOPLANKTON PHOTOREGULATION EFFECT ON <i>IN VIVO</i> CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE	64
3.1	Abstract.....	64
3.2	Introduction.....	65

3.3	Materials and methods	67
3.4	Results.....	69
3.5	Discussion.....	70
3.6	Referencias.....	71
3.7	Figures and tables	74
CAPÍTULO 4. IMPLEMENTACIÓN Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA		78
4.1	Introducción	78
4.2	Materiales y métodos	78
4.3	Resultados.....	80
4.3.1	Talleres y protocolos	80
4.3.2	Implementación de los modelos en planilla electrónica interactiva	83
4.4	Discusión	84
4.5	Referencias.....	85
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS ...		86
5.1	Discusión general.....	86
5.2	Conclusiones globales.....	89
5.3	Perspectivas	90
5.4	Referencias.....	91
ANEXO 1: DISEÑO EXPERIMENTAL DE LAS PRUEBAS DE CALIBRACIÓN ..		94
ANEXO II: INSTRUCTIVO REDUCIDO PARA LA CALIBRACIÓN DIARIA, TOMA DE MUESTRA Y MEDICION CON EL FLUORÓMETRO MODELO AQUAFUOR, MARCA TURNER.....		96
	CALIBRACIÓN.....	96
	PROCEDIMIENTO DE MEDIDA	97
	Pasos para tomar las medidas:	97
	Cuidados de la cubeta:	97

AGRADECIMIENTOS

A mi orientadora Sylvia, por su confianza, su tiempo, su paciencia, por haber gestado la oportunidad de conocer a Yannick y por introducirme al mundo de los pigmentos en la Université Laval. Por preocuparse por mí y recibirme cálidamente junto a su familia en Québec, haciendo que me sienta como si estuviera en Uruguay, y a la vez mostrándome muchas facetas de Canadá.

A Yannick Huot, por haber confiado en mí, por abrirme las puertas para que pueda trabajar junto a su equipo en Sherbrooke, y por alentar mi curiosidad de entender los secretos de la fotosíntesis.

A mis amigos de la Sección Limnología, por el apoyo y por hacer las tardes muy fáciles de llevar. A Natalie por recibirme en su casa en Québec y por su energía para llevarme a muchas actividades divertidas por el crudo invierno. A los compañeros de la Université de Sherbrooke por recibirme amistosamente. A la gente de DINAMA por su compañerismo en los muestreos.

A mi familia: a mi madre Patricia, a mi padre Jorge, a mi hermana Luciana, a mi abuela Clara, a mis abuelos Juan y Zulma, y a mis tíos y primos, por seguir creyendo en mí y por apoyarme en mis sueños, aún sabiendo los muchos momentos que ellos nos logran quitar. A los gurises: Daniel, Joaquín, Juampi, Martín, Maxi, Michel, Nacho, Pablo, Rodrigo y Tabaré, por todos estos años y que ojalá sean doscientos más. A las maestras y profesores que creyeron en mí. A mi pueblo Fray Bentos por ser siempre mi hogar.

FINANCIACIÓN

Esta maestría fue financiada en parte por una beca de posgrados nacionales de la Asociación Nacional de Investigación e Innovación (ANII), código POS_NAC_2014_1_102517.

Los experimentos en la sección limnología y en el campo fueron financiados por el convenio DINAMA (Dirección Nacional de Medio Ambiente) - Facultad de Ciencias “Desarrollo de un método simple de cuantificación de cianobacterias” (2013-2015) a cargo de la Dra. Sylvia Bonilla.

Desde setiembre de 2015 a marzo de 2016 realicé una pasantía en la Université de Sherbrooke, Canadá, financiada mediante una beca del programa *Emerging Leaders of the Americas Program* (ELAP) del gobierno de Canadá bajo la supervisión del Dr. Yannick Huot.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS:

Póster: Fluorescencia in vivo de pigmentos de microalgas y cianobacterias aplicado a monitoreos ambientales de calidad de agua. Cremella, B.; Masdeu, M. y Bonilla, S. Encuentro de Jóvenes Microbiólogos del IIBCE (2014).

Presentación oral: Evaluación de la fluorescencia de pigmentos in vivo como herramienta de monitoreo de floraciones fitoplanctónicas en Uruguay. Cremella, B.; Masdeu, M.; Somma, A. y Bonilla, S. Primeras Jornadas sobre eutrofización y floraciones algales nocivas (FAN) en el río Uruguay (2015).

Presentación oral: Multiplicando las capacidades regionales de monitoreo de cianobacterias mediante un modelo basado en la fluorescencia de pigmentos in vivo. Cremella, B.; Huot, Y.; Masdeu, M.; Somma, A.; Aubriot, L. y Bonilla, S. VII Congreso Argentino de Limnología (2016). Asistencia con financiación de la Maestría en Biotecnología.

RESUMEN

El incremento de la ocurrencia de floraciones de cianobacterias tóxicas en ecosistemas límnicos ha impulsado el desarrollo de nuevos métodos de detección de estos organismos. La fluorescencia de pigmentos *in vivo* brinda información cuantitativa en tiempo real, permitiendo desarrollar modelos predictivos. Sin embargo, esta metodología aún se utiliza con alcance local, generalmente con equipos costosos, limitando su implementación con múltiples equipos y ecosistemas. El objetivo de esta tesis fue desarrollar y evaluar un modelo de predicción de la concentración de la clorofila *a* de fitoplancton total y de cianobacterias basado en la fluorescencia de pigmentos (clorofila *a* y ficocianina) para ser implementado por instituciones públicas en monitoreos de calidad de agua en Uruguay. Se buscó que el modelo fuera de uso simple y aplicable a múltiples equipos de bajos costos. El trabajo integró las fases de investigación, validación e implementación biotecnológica. Para desarrollar el modelo se trabajó con experimentos con cultivos unialgales y mixtos de diversas cianobacterias y microalgas y el modelo se puso a prueba con muestras naturales de fitoplancton (Río de la Plata, campañas de verano: 2014 a 2016, n= 1227). Se evaluó el efecto de la turbidez y la materia orgánica disuelta coloreada (MODC) en la matriz y el efecto de la aclimatación y regulación lumínica de los organismos en las respuestas de fluorescencia.

Tras diversas pruebas de ajuste, la fluorescencia fue intercomparable entre 7 fluorómetros de mano. A partir de los experimentos (n=66, $R^2=0.985$) se logró ajustar un modelo lineal simple de predicción de la clorofila *a* total y de cianobacterias en función de la fluorescencia de los dos pigmentos. El modelo tuvo una alta capacidad de predicción para concentraciones de clorofila *a* $<57 \mu\text{g L}^{-1}$ en el laboratorio, y resultados variables según el ambiente acuático (fluvial, estuarino o marino), en concordancia con otros indicadores cuantitativos de cianobacterias. Las interferencias ópticas de la matriz no fueron significativas en la cuantificación de cianobacterias, mientras que la MODC presentó su mayor efecto sobre la clorofila *a* total. Exponiendo la muestra a 3 minutos en oscuridad antes de la medición se logró eliminar el efecto fisiológico de regulación de la fluorescencia. Para avanzar en la transferencia tecnológica de este tipo de métodos, se realizaron talleres de capacitación dirigidos a técnicos de DINAMA e intendencias departamentales (red FREPLATA). Se puso a punto un protocolo de uso de los equipos y una matriz electrónica interactiva, permitiendo la obtención de los resultados predichos en forma sencilla. El modelo desarrollado en esta tesis es innovador ya que permite la cuantificación de cianobacterias en tiempo real, con múltiples equipos, contribuyendo a mejorar significativamente la obtención de datos en programas de monitoreos a gran escala en nuestro país. Este trabajo es el primer esfuerzo para superar obstáculos técnicos entre el uso de la fluorescencia de pigmentos en investigación y su aplicación biotecnológica.

Development and application of an *in vivo* pigment fluorescence method to track phytoplankton and cyanobacteria biomass in water bodies of Uruguay

ABSTRACT

Increasing occurrences of toxic cyanobacterial blooms in limnic environments have pushed the development of new methods to detect these organisms. *In vivo* pigment fluorescence delivers quantitative information in real time, allowing the development of predictive models. However, this methodology is still used with local reach, generally with expensive equipment, limiting its implementation across multiple instruments and ecosystems. The objective of this thesis was to develop and evaluate a predictive model of total and cyanobacterial chlorophyll *a* concentrations based on pigment fluorescence (chlorophyll *a* and phycocyanin), to be implemented by public institutions in water quality monitoring in Uruguay. We sought a simple model applicable to multiple, low cost instruments, integrating biotechnology research, validation and implementation. To fit the model, we used mono specific and mixed cultures of diverse cyanobacteria and microalgae, after which the model was tested with natural phytoplankton samples (Río de la Plata, summer campaigns: 2014 to 2016, n=1227). We evaluated the effect of turbidity and colored dissolved organic matter (CDOM) in the aqueous matrix on the fluorescence response, as well as the effect of organism light acclimation and photoregulation.

After an intercalibration test, 7 field fluorometers recorded comparable fluorescence measurements. From the mixed culture experiments (n=66, R²=0.985), we fitted a linear model of total and cyanobacterial chlorophyll *a* as a function of the two pigments' *in vivo* fluorescence. The model showed a high prediction capacity for chlorophyll *a* concentration below 57 µg L⁻¹ in lab samples, and mixed results for field samples from different aquatic environments (fluvial, estuarine or marine), in concordance with other quantitative cyanobacterial indicators. Matrix effects did not interfere significantly with the optical quantification of cyanobacteria, while CDOM had the biggest effect on total Chl *a*. Keeping the sample in the dark for 3 minutes before measurements relaxed the photo regulation effect on fluorescence. For technology transfer, we organized training workshops aimed at technicians of DINAMA and the municipalities of the FREPLATA network. Protocols were developed for fluorometer use and an interactive spreadsheet allowing the simple application of the models was made. The model developed in this thesis allows the quantification of cyanobacteria in real time, with multiple instruments, innovatively improving data acquisition in large-scale monitoring programs in Uruguay. This research is one of the earliest efforts to overcome the technical obstacles between the use of pigment fluorescence for research and its biotechnological application.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Floraciones de cianobacterias y métodos de monitoreo

Las floraciones fitoplanctónicas nocivas se definen como el incremento súbito en la biomasa de una o pocas especies de fitoplancton (Reynolds 1984) y pueden comprometer los recursos hídricos. Las floraciones más frecuentes en ecosistemas límnicos son producidas por cianobacterias (Cyanobacterial harmful algal blooms: CyanoHABs) que pueden producir potentes toxinas para animales y el ser humano (Carmichael 2001). Las cianobacterias son un clado de microorganismos procariotas que surgieron en el precámbrico (ca. 2.700 millones de años) y que realizan fotosíntesis oxigénica, siendo muy exitosos actualmente en los cuerpos de agua límnicos, formando parte del fitoplancton (Whitton & Potts 2002).

Las floraciones de cianobacterias limitan o impiden el uso del agua destinada al consumo, recreación y actividades productivas porque producen metabolitos que confieren mal olor o sabor al agua (geosmina y 2-metilisoborneol) (Izaguirre et al. 1982), provocan mortandad de peces por anoxia (Chellappa et al. 2008) y principalmente porque producen toxinas que afectan la salud humana y animal (Carmichael 2008). Además, las paredes celulares bacterianas son inmunogénicas pudiendo generar alergias y erupciones en la piel al contacto (Stewart et al. 2006). Las cianotoxinas son metabolitos con efectos nocivos en la salud humana tanto agudos como crónicos, produciendo muertes en animales terrestres (ganado, aves) (Chorus et al. 1999). Las cianotoxinas incluyen diferentes familias según su estructura química y modo de acción: microcistinas y nodularina (hepatotoxinas), cylindrospermopsina (citotoxina), anatoxinas y saxitoxinas (neurotoxinas), entre otras (Leflaive & Ten-Hage 2007).

La aparición de CyanoHABs usualmente responde a la eutrofización, que es el conjunto de fenómenos resultantes del aumento en el aporte de nutrientes a los cuerpos de agua y el subsiguiente aumento de la producción primaria (Paerl & Otten 2013). En ambientes límnicos este aumento responde positivamente al fósforo y nitrógeno, principales nutrientes reguladores del crecimiento del fitoplancton (Smith & Schindler 2009). Por otro lado, el cambio climático podría ocasionar un aumento en la frecuencia de

floraciones de cianobacterias dadas las predicciones de aumento de la temperatura y sus efectos asociados, como cambios en el régimen hidrológico, transparencia del agua y disponibilidad de materia orgánica disuelta coloreada (MODC) (Paerl & Paul 2012).

En Uruguay, las floraciones de cianobacterias tóxicas son frecuentes en numerosos cuerpos de agua (Bonilla 2009; Bonilla et al. 2015) y, de acuerdo a las predicciones de cambio climático para la región (IPCC 2007), se puede esperar que este fenómeno sea más frecuente y de mayor duración en el futuro. Para implementar planes fiables de monitoreo de cianobacterias en ecosistemas acuáticos se requieren indicadores de la biomasa de fitoplancton en general y de cianobacterias a diferentes escalas temporales y espaciales, para generar alertas tempranas (Koreivienė et al. 2014). Los indicadores cuantitativos más utilizados y recomendados por la OMS son la concentración de clorofila *a* por extracción (indicador indirecto de la biomasa total del fitoplancton) y el número de células totales y el biovolumen de cianobacterias (Chorus et al. 1999). A partir de estos indicadores la OMS ha establecido niveles guía y niveles de alerta de peligrosidad de exposición a cianobacterias para la toma de decisiones de acuerdo al uso del agua (recreación y potabilización, respectivamente) (Chorus et al. 1999), las que luego se han adaptado según las legislaciones ambientales de los diferentes países (Chorus 2012). Los métodos de análisis de estos bioindicadores requieren tiempo y personal altamente capacitado, lo que puede limitar su uso en monitoreos ambientales (Fig.1.1, Tabla 1.1).

Más recientemente, la presencia de pigmentos marcadores de ciertos grupos de fitoplancton ha surgido como un nuevo bioindicador. Los pigmentos pueden ser una herramienta quimiotaxonómica poderosa para rastrear cianobacterias, permitiendo su uso biotecnológico para desarrollar métodos de detección y cuantificación aplicables en programas de monitoreo de calidad de agua (Jeffrey & Humphrey 1997). Las moléculas de clorofila y de las ficobilinas son fluorescentes, es decir que se excitan al absorber un fotón y se relajan, emitiendo un fotón de mayor longitud de onda y menor energía. Esta propiedad la cumplen tanto en solución como *in vivo* dentro de las células (Wright et al. 2005), lo que hace posible el desarrollo de métodos basados en fluorescencia. Además, la fluorescencia *in vivo* ocurre en tiempo real, convirtiéndola en una herramienta innovadora para la biotecnología ambiental y que la distingue de los bioindicadores clásicos anteriormente mencionados (Fig. 1.1). Recientemente han surgido las primeras

propuestas para incluir la fluorescencia *in vivo* de pigmentos como herramienta para el monitoreo de cianobacterias e la gestión de cuerpos de agua (Chang et al. 2012a; Koreivienė et al. 2014; Kong et al. 2014).

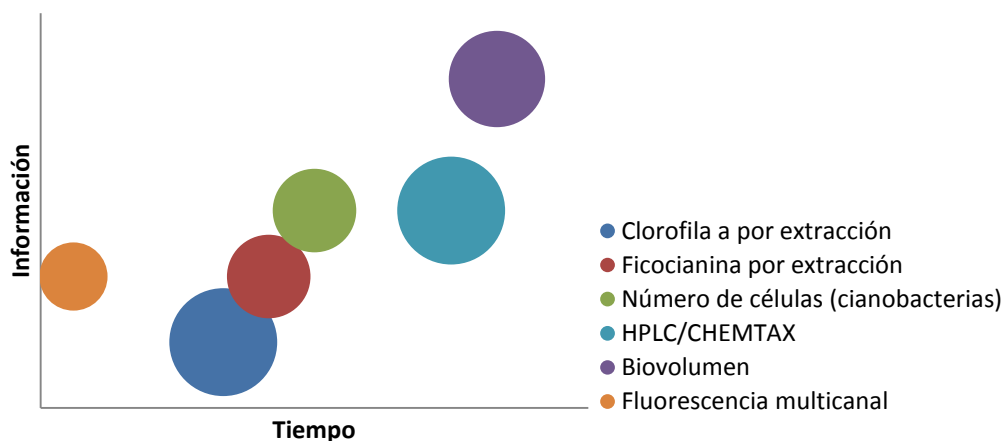


Figura 1.1: Bioindicadores de cianobacterias utilizados en monitoreos de calidad de agua según la cantidad de información que brindan en función del tiempo que se requiere obtener la información. El tamaño de círculo indica la precisión de la información obtenida. Cianos: cianobacterias, HPLC/CHEMTAX: cuantificación de pigmentos lipídicos por cromatografía líquida de alta definición (HPLC) y estimación de biomasa por modelo matemático (CHEMTAX), clo-a: clorofila a, FC: ficocianina. Dibujo: Bruno Cremella.

Tabla 1.1: Ventajas y desventajas de los diferentes bioindicadores de cianobacterias y los diferentes niveles de alerta (agua para consumo humano) y de guía (agua de recreación) basados en dichos indicadores.

Indicador de biomasa	Ventajas	Desventajas	Aguas para consumo			Aguas recreativas		Fuente
			Nivel de vigilancia	Nivel de alerta 1	Nivel de alerta 2	Nivel guía 1	Nivel guía 2	
Clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rápido (horas), sencillo, accesible	No aporta información sobre cianobacterias	0.1	1	50	10	50	OMS (Chorus & Bartram 1999)
Número de células (células L^{-1})	Rápido (horas), sencillo, mayor especificidad	Pobre indicador por variación en tamaño celular; necesarios conocimientos taxonómicos	200	2000	100000	20000	100000	OMS (Chorus & Bartram 1999)
Biovolumen ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$)	Lento, complejo, información detallada	Necesarios conocimientos taxonómicos; complejo procesamiento	0.02	0.2	10	2	10	OMS (Chorus & Bartram 1999)
Ficocianina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Especificidad en cianobacterias de agua dulce	Complejo procesamiento de la muestra; difícil extracción				30	700	Koreivienė et al. (2014)

1.2 Bases biológicas de la fluorescencia *in vivo*

La fluorescencia de pigmentos *in vivo* tiene su origen en estructuras y procesos relacionados a la fotosíntesis. En particular, está relacionada con los *fotosistemas* I y II (PSI y PSII), complejos proteicos conformados por un Centro de Reacción (RC) y la antena interna (*core antennae*), más una antena periférica más variable y asociada débilmente a los fotosistemas (Hohmann-Marriott & Blankenship 2011). El fotón absorbido excita a las moléculas de pigmentos de las antenas periféricas e internas, que transfieren la energía a clorofilas *a* del PSII donde luego puede tener destinos diferentes. De esta forma, la energía de excitación del fotón se puede disipar por tres vías principales: 1- Pérdida por calor, 2- Reacción fotoquímica (pares especiales p680 y p700) y 3- Emisión de fluorescencia (a 685 nm) (Fig. 1.2). Las constantes cinéticas de los tres procesos son muy diferentes entre los fotosistemas, siendo la fluorescencia en el PSII mucho más importante que en el PSI, donde es usualmente insignificante (Krause & Weis 1991).

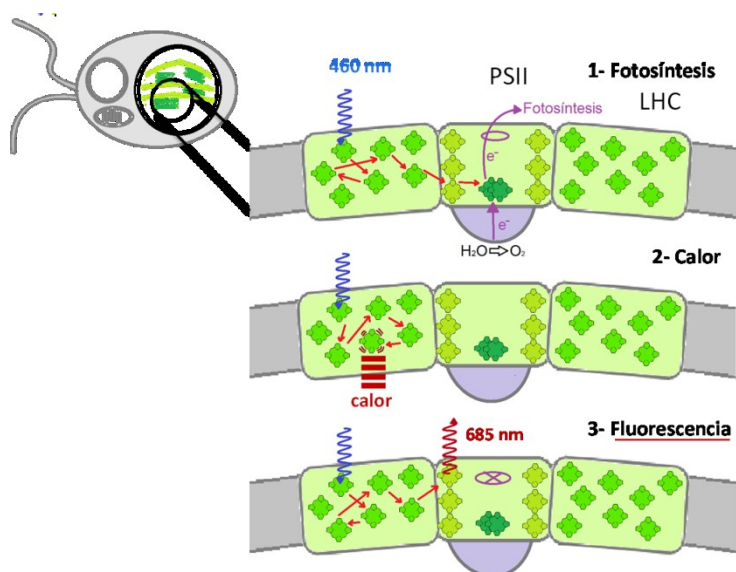


Figura 1.2: Principio de la fluorescencia de pigmentos *in vivo* en el PSII. El fotón absorbido por los pigmentos de los complejos antena (onda azul) tiene tres destinos posibles: 1- Separación de cargas por reacción fotoquímica (fotosíntesis); 2- Disipación de energía por vibraciones (calor); 3- Emisión de un fotón con menor energía que la original (fluorescencia, onda roja). Dibujo: Bruno Cremella, modificado de diversas fuentes.

Las antenas periféricas varían de acuerdo al fotosistema, al grupo filogenético y al nicho lumínico de los organismos (Stomp et al. 2007), pudiendo contener clorofilas, carotenoides y ficobilinas (Wright et al. 2005). La mayoría de las cianobacterias presentan ficobilisomas (PBS) como principal complejo antena. Los PBS están compuestos de ficobiliproteínas, que se clasifican según su contenido en ficobilinas, en ficoeritrinas, C-ficocianina y aloficocianina (Bryant 1982). La estructura modular del PBS consiste en un núcleo de aloficocianina (máxima absorbancia, máx. abs., a $\lambda=650$ nm) anclada al PSII, al que se unen "bastones" de ficocianina (máx. abs. a $\lambda=620$ nm) y ficoeritrinas (usualmente ausente en cianobacterias de agua dulce, máx. abs. en el rango de 500-600 nm) (Grossman et al. 1993). Por otro lado, el fitoplancton eucariota (microalgas) presenta una gran diversidad de pigmentos que refleja la historia evolutiva del cloroplasto (Falkowski et al. 2004). Algunos presentan PBS como las cianobacterias (glaucofitas, rodofitas), y la mayoría, a diferencia de las cianobacterias, tienen complejos antena de membrana llamados LHCs (*light harvesting complex*, complejos de captura de luz) con clorofilas y carotenoides como pigmentos accesorios, con su máxima absorbancia en el rango de 400-500nm (Mackey et al. 1996; Durnford et al. 1999; Beutler et al. 2000; Seppälä et al. 2005; Johnsen & Sakshaug 2007; MacIntyre et al. 2010).

Además de sus diferencias filogenéticas, las algas y las cianobacterias pueden modificar sus pigmentos en cuestión de días, de acuerdo a los cambios en la intensidad y calidad lumínica, modificando el número de fotosistemas y las concentraciones de sus complejos antena y de pigmentos accesorios. Particularmente las cianobacterias pueden realizar la aclimatación cromática mediante cambios en las concentraciones de ficobiliproteínas (Dubinsky & Stambler 2009). Las grandes diferencias pigmentarias entre eucariotas y procariotas resultan en divergencias fisiológicas. En general, las cianobacterias son más eficientes en la captura de luz y crecen mejor a intensidades de luz más bajas que las algas eucariotas (Schwaderer et al. 2011).

La variabilidad en la composición pigmentaria de los complejos antena genera señales ("fingerprints") de fluorescencia que permiten la discriminación de grupos fitoplanctónicos según sus espectros de excitación (Fig. 1.3) (Yentsch & Yentsch 1979; Simis et al. 2012). Los eucariotas presentan su mayor fluorescencia con excitación entre 400 y 500 nm y emisión desde el PSII (685 nm). Las cianobacterias responden

emitiendo fluorescencia con longitud de onda de excitación entre 590 y 620 nm debido a la ficocianina, emitiendo a 650 (ficocianina) y 685 nm (PSII) (Millie et al. 2002). Si bien las cianobacterias tienen clorofila *a*, ésta se encuentra principalmente en el PSI, lo que, sumado a la ausencia de LHCs, genera una baja emisión de fluorescencia de la clorofila *a* (Beutler et al. 2003; Suggett et al. 2004).

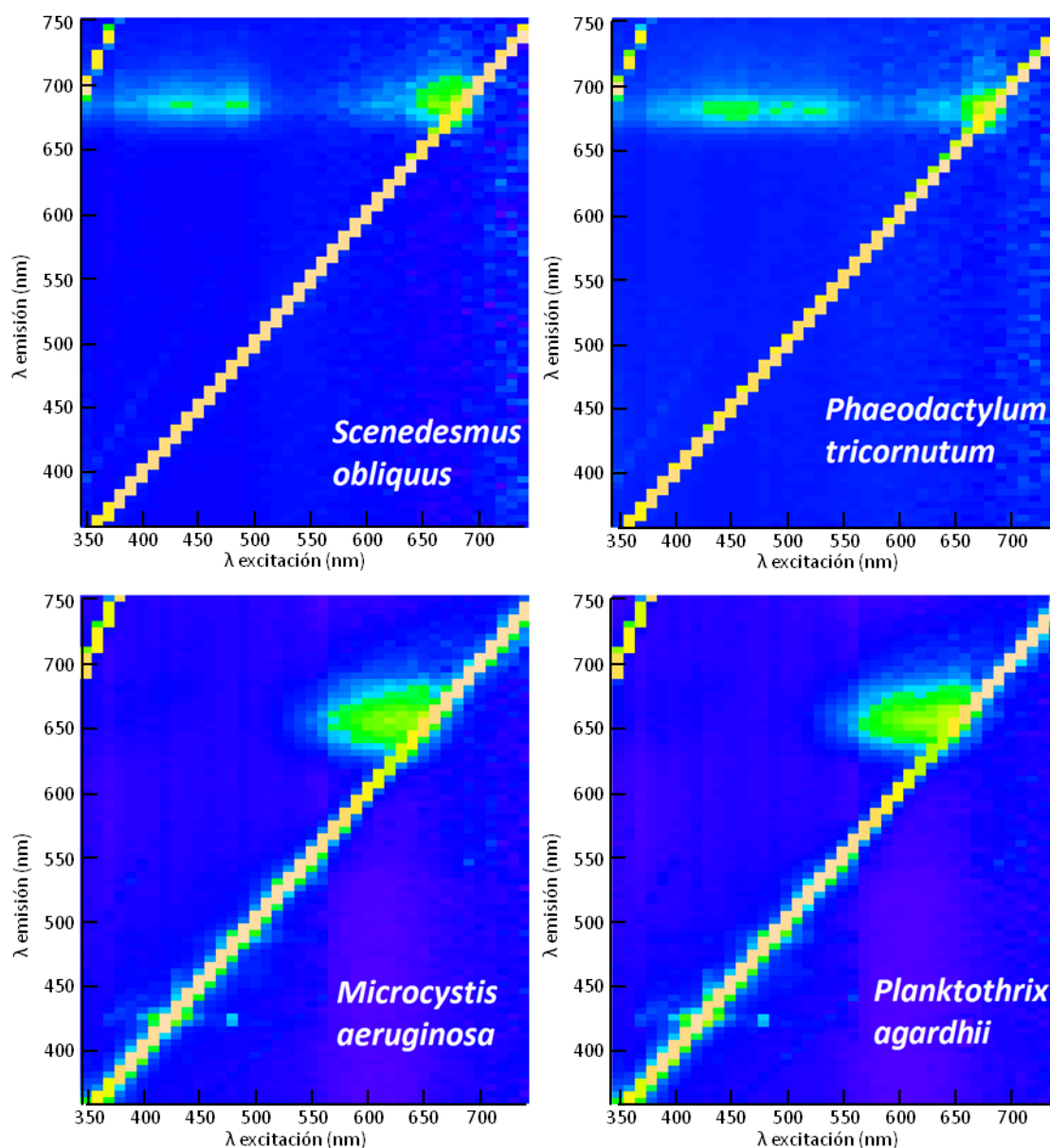


Figura 1.3: Espectros de fluorescencia de cultivos de cianobacterias (*M. aeruginosa* y *P. agardhii*, arriba) y algas (*S. obliquus*, clorofita y *P. tricornutum*, cromofita). En las abscisas se indica la longitud de onda de excitación (350-740 nm), en las ordenadas la longitud de onda de emisión (360-750 nm). En escala cromática, colores más cálidos indican mayor intensidad de emisión. La línea en diagonal se genera por la coincidencia de las longitudes de onda de excitación y emisión (Cremella et al., datos no publicados).

Por simplicidad, las señales o “fingerprints” de eucariotas y cianobacterias se llaman fluorescencia de la clorofila *a* y de la ficocianina, respectivamente (Fig. 1.4). La fluorescencia de la clorofila *a* fue sugerida como indicador de fitoplancton eucariota (Lorenzen 1966) y luego la fluorescencia de la ficocianina como indicador de cianobacterias (Watras & Baker 1988). Ambas pueden ser combinadas para diferenciar las proporciones de microalgas y cianobacterias a la clorofila *a* total (Lee et al. 1994).

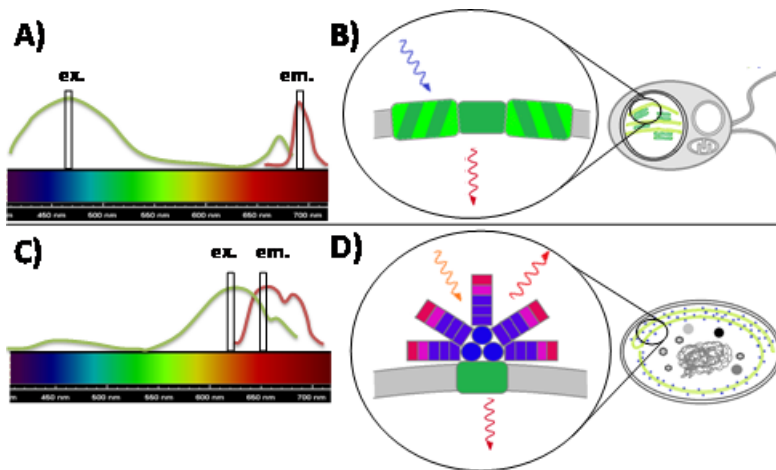


Figura 1.4: Señales de fluorescencia *in vivo* de eucariotas y cianobacterias, incluyendo las diferencias espectrales y los complejos antena. A, C: Espectros de excitación (verde, λ emisión a 685 nm) y emisión (rojo, λ de excitación a 460 nm en eucariotas y 620 nm en cianobacterias), y de fluorescencia de la clorofila *a* y la ficocianina (barras verticales). B, D: Diferencias entre los complejos antena de eucariotas (verde rayado, LHC) y las cianobacterias (PBS, azul: alloficocianina, violeta: ficocianina, fucsia y rojo: ficoeritrina), asociados al PSII (verde liso), incluyendo los colores de los respectivos fotones de excitación y emisión. A, B: eucariotas. C, D: cianobacterias. Dibujo: Bruno Cremella, modificado de diversas fuentes.

Sin embargo, la fluorescencia no es constante y varía de acuerdo a los procesos involucrados en la fotosíntesis. El PSII presenta fluorescencia variable (F_V) debido a que la reacción fotoquímica está limitada cinéticamente. Esto implica que a intensidades de luz de saturación los PSII "se cierran" produciendo un máximo de emisión de fluorescencia (F_M), mientras que si todos los PSII estuvieran abiertos la fluorescencia será mínima (F_0). La fluorescencia variable se ve afectada por procesos regulatorios como son las transiciones de estado (a bajas irradiancias), el apagado dependiente de la energía (qE , a altas irradiancias) y el fotodaño (a irradiancias muy altas) que pueden

interferir con las mediciones en el campo. Estos procesos se denominan colectivamente NPQ (*Non-photochemical quenching*, apagado no fotoquímico) (Huot & Babin 2010). Las transiciones de estado son mecanismos rápidos que se dan en minutos y consisten en el cambio en el fotosistema al que los complejos antena transfieren su energía, resultando en cambios en la fluorescencia. Este mecanismo es divergente entre cianobacterias y eucariotas. Mientras que en las cianobacterias puede ser muy importante a bajas irradiancias (Campbell et al. 1998; Xu et al. 2012), en eucariotas ocurre con menor intensidad (Gibbs & Biggins; Biggins & Bruce 1989; Cheregi et al. 2015) o está ausente (Owens 1986; Kanazawa et al. 2014; Lavaud & Goss 2014). El apagado dependiente de la energía (qE) ocurre a altas irradiancias y consiste en una serie de mecanismos regulatorios que permiten la disipación de la energía en forma de calor. Las cianobacterias presentan un qE de relajación rápida (Boulay et al. 2008) en comparación con los eucariotas (Goss & Lepetit 2015).

1.3 Fluorescencia *in vivo* aplicada al monitoreo de ecosistemas acuáticos

La fluorescencia de pigmentos puede ser utilizada como un indicador de la biomasa de fitoplancton y sus diferentes grupos (Yentsch & Yentsch 1979), por lo que se ha comenzado a utilizar como herramienta biotecnológica para programas de monitoreo desde la última década. Las señales de fluorescencia deben ser convertidas a otro indicador de biomasa (clorofila *a*, número de células, biovolumen) debido a su naturaleza no absoluta. Además, mediante el uso de diferentes combinaciones de longitudes de onda se puede estimar la partición de la clorofila *a* entre los diferentes grupos pigmentarios del fitoplancton a través de algoritmos matemáticos (Lee et al. 1994; Beutler et al. 2002; MacIntyre et al. 2010).

Se han diseñado fluorómetros específicos para el monitoreo de fitoplancton, de menores costos que los espectrofluorómetros de laboratorio y de mayor adecuación para su implementación en el campo. Los fluorómetros se basan en el uso de lámparas LEDs y fotodetectores con filtros que se asocian a marcadores pigmentarios de los diferentes grupos (Fernandez-Jaramillo et al. 2012). Debido a las diferencias en la fluorescencia entre cianobacterias y algas eucariotas, los fluorómetros deben contar mínimamente con dos canales (para la excitación de los LHCs y de los PBS) (Lee et al. 1994). Se pueden

clasificar de acuerdo a su aplicabilidad en fluorómetros de mesa, de mano “handheld”, sondas sumergibles y sistemas online *in situ* usualmente instalados en boyas (Pires & Deltares 2010). Algunas sondas poseen más canales, permitiendo identificar diferentes grupos eucariotas (Beutler et al. 2002; Yoshida et al. 2011), e incluso algunos pueden medir fluorescencia variable (Schreiber et al. 2012). Los fluorómetros de mano (“*handheld*”) son fácilmente transportables y de uso simple para técnicos y operarios. Por otro lado, algunos fluorómetros vienen pre-calibrados por el fabricante con cultivos y con los algoritmos incorporados, proporcionando una concentración de clorofila *a* de los diferentes grupos taxonómicos como resultado directo en la pantalla del equipo (Beutler et al. 2002; Richardson et al. 2010). Sin embargo, esta configuración tipo “caja negra” impide el seguimiento del rendimiento del equipo y por lo tanto los usuarios dependen del fabricante para las pruebas regulares de rutina y la calibración. Existe una notoria falta de estandarización de las configuraciones ópticas de los equipos, impidiendo la comparación de monitoreos realizados con diferentes modelos de fluorómetros sin una calibración conjunta.

La calibración de los fluorómetros y el tipo de estándar seleccionado son dos factores que afectan las mediciones y son muy variables entre diferentes artículos científicos y protocolos. Además, la fluorescencia de pigmentos también varía mucho entre extractos con pigmentos en solución orgánica o acuosa y muestras naturales con células intactas (*in vivo*), por lo que no existen estándares para la calibración de los fluorómetros. Esto requiere utilizar estándares secundarios, compuestos estables que fluorescen en los mismos canales que los pigmentos (Earp et al. 2011), y calibraciones con curvas de dilución de cultivos (células, biovolumen o clorofila *a*). Se ha utilizado ficocianina purificada como estándar, pero su fluorescencia difiere de la de la muestra *in vivo* (Ahn et al. 2007), por lo que igualmente se requiere una calibración con cultivos.

El efecto de las condiciones lumínicas inmediatas a la medición debe ser tenido en cuenta a la hora de la implementación biotecnológica de esta metodología. La exposición del fitoplancton a altas intensidades lumínicas dispara las respuestas de qE (Huot & Babin 2010; Kong et al. 2014), y puede llegar a disminuir hasta un 50% de la fluorescencia de comunidades naturales (Serra et al. 2009). Este efecto se puede corregir imponiendo un tiempo de 1 a 10 minutos de aclimatación a la oscuridad (Ruban et al.

2004; Bailey et al. 2005; Grouneva et al. 2008) para relajar el qE previo a la lectura de la fluorescencia.

Otro factor importante que interfiere en la fluorescencia medida es la característica óptica de la matriz. Las aguas naturales son matrices complejas, y sus componentes tienen diversas propiedades ópticas que pueden interferir con las mediciones de los fluorómetros. Los componentes predominantes son la turbidez y la materia orgánica disuelta coloreada (MODC) (Brient et al. 2008; Chang et al. 2011; Ferreira et al. 2012). El espectro de absorción y fluorescencia de la MODC disminuye exponencialmente con la longitud de onda (Nelson & Siegel 2013), emitiendo en el canal de la clorofila. El efecto de la turbidez es más difícil de aislar debido a la amplia variación en el tamaño de las partículas (limos y arcillas). Algunas sondas fluorométricas son insensibles a la turbidez (Zamyadi et al. 2012) y otras tienen correcciones para el efecto de la MODC por fluorescencia UV (Catherine et al. 2012). Sin embargo, si la sonda es susceptible a la turbidez y la MODC, los algoritmos post-lectura deben incluir factores de corrección basados en la concentración de estos componentes (Ferreira et al. 2012).

En resumen, existen tres grupos principales de factores ajenos a los organismos que afectan el resultado de la fluorescencia *in vivo* medida por los fluorómetros y que pueden ser atendidos: 1- propios del equipo y la calibración; 2- propios de las condiciones lumínicas locales; y 3- propios de la matriz acuosa. Esto hace que la implementación de esta metodología necesite de etapas previas de investigación con cultivos y con muestras naturales de los lugares de interés (Chang et al. 2012b; Koreivienė et al. 2014; Kong et al. 2014). En cuanto a su implementación, actualmente existen algunos protocolos en etapa de validación y prueba que proponen valores guías incluyendo la fluorescencia para la cuantificación de cianobacterias en el ambiente (Chorus 2012). Al presente no existen métodos para monitoreos en amplia extensión geográfica y de bajos costos, y la fluorescencia *in vivo* de pigmentos es una herramienta innovadora en la biotecnología ambiental que puede cumplir ese papel.

1.4 Situación en Uruguay

En Uruguay múltiples instituciones realizan monitoreos de calidad de agua, siendo las más importantes DINAMA, DINAGUA, OSE, intendencias departamentales, UTE (embalses), CARU y LATU. Con respecto a la cuantificación del fitoplancton, se

realizan conteos en OSE, CARU, LATU y UTE y se cuantifica la clorofila *a* por extracción en la Intendencia de Montevideo, DINAMA, LATU, UTE y más recientemente en OSE. Hasta 2013, el monitoreo estival y semanal de playas del Río de la Plata y oceánicas (desde Colonia a Rocha), realizado por las intendencias departamentales y coordinado por DINAMA-FREPLATA, no incluía ningún indicador de presencia de cianobacterias (ni visual ni cuantitativo).

Recientemente, distintas instituciones públicas responsables del monitoreo de la calidad de agua como DINAMA y OSE adquirieron numerosos equipos de fluorescencia de mano para mejorar la detección de las cianobacterias e implementar un sistema de alertas tempranas de floraciones en aguas recreacionales y para potabilizar (DINAMA y OSE, respectivamente). Esto generó un antecedente y un desafío para la investigación ya que no existían métodos que permitieran intercomparar los resultados de varios equipos utilizados en simultáneo en una gran área geográfica. Hasta el presente no hay antecedentes de la implementación de la fluorescencia *in vivo* en planes de monitoreo, lo que implica además la intercalibración de múltiples equipos para su aplicación simultánea en un amplio rango de tipos de cuerpos de agua, y la formación y capacitación de personal técnico.

1.5 Justificación y objetivos

1.5.1 Justificación:

Las floraciones de cianobacterias nocivas (CyanoHABs) son uno de los efectos más notorios de la eutrofización (Paerl & Otten 2013). Además, es un fenómeno complejo que podrá verse potenciado por el efecto sinérgico del cambio climático y la eutrofización (Paerl & Paul 2012). En Uruguay numerosos cuerpos de agua eutrofizados registran eventos frecuentes de CyanoHABs, comprometiendo el uso del agua con fines recreacionales y para consumo (Bonilla et al. 2015). Por lo tanto, es fundamental para el país generar nuevas metodologías de monitoreo que permitan adaptarse rápidamente a los cambios ambientales y mejorar las alertas de la presencia de CyanoHABs.

Si bien la OSE sigue las recomendaciones de la OMS (Vidal & Britos 2012), al presente Uruguay no cuenta con legislación ambiental para el monitoreo de CyanoHABs. El uso de la fluorescencia *in vivo* e *in situ* resulta una herramienta crucial para complementar

otros indicadores y optimizar la toma temprana de decisiones. Para ello, es necesario considerar equipos de bajos costos, de uso y transporte simple y operable por técnicos de diversas instituciones luego de un entrenamiento sencillo. Los fluorómetros “handheld” (de mano) son adecuados para técnicos y muestreadores de capacitación media, principales destinatarios del resultado de este proyecto. La extensión de las playas en la costa uruguaya hacen apropiado el uso de la fluorescencia *in vivo* estimada con equipos pequeños, facilitando el monitoreo de numerosos cuerpos de agua en una sola jornada. Por lo tanto, el desarrollo de modelos de predicción de la biomasa basados en la fluorescencia *in vivo*, incluyendo la intercalibración, protocolos de medición y evaluación de las interferencias, tendrían necesariamente aplicabilidad inmediata.

1.5.2 Objetivo general:

Desarrollar y validar un método de fluorescencia *in vivo* como indicador de clorofila *a* de fitoplancton total y de cianobacterias para su aplicación en monitoreos de calidad de agua a nivel nacional.

1.5.3 Objetivos específicos:

- 1- Determinar la correlación entre la fluorescencia *in vivo* e indicadores de biomasa de algas y cianobacterias para intercalibrar múltiples equipos.
- 2- Desarrollar un modelo de predicción de clorofila *a* total y de cianobacterias a partir de la fluorescencia *in vivo* de clorofila *a* y ficocianina.
- 3- Determinar la interferencia óptica en la matriz debido a la turbidez y la materia disuelta coloreada sobre la fluorescencia *in vivo*.
- 4- Determinar la interferencia de la exposición a luz solar/oscuridad en la fluorescencia *in vivo*.
- 5- Evaluar el rendimiento del modelo con muestras naturales.
- 6- Generar un protocolo adecuado para ser utilizado en programas de monitoreo y generar una matriz electrónica interactiva para la aplicación sencilla del modelo.
- 7- Realizar la transferencia de conocimiento brindando talleres de capacitación para el uso del modelo dirigidos a técnicos de entidades públicas.

1.6 Aproximación:

Se trabajó combinando cuatro fases:

1- Ajustes entre equipos y calibración. Se analizaron comparativamente las mediciones de fluorescencia de diferentes equipos del mismo fabricante para evaluar su variabilidad y consecuencias en las mediciones utilizando diversos cultivos de concentraciones conocidas. Se probó la calibración con uno y múltiples estándares sólidos universales y el efecto de la apertura de la ventana de los mismos. (*Objetivo 1*).

2- Desarrollo del modelo predictivo y aplicación en campo. Se ajustaron modelos lineales múltiples de predicción de la clorofila *a* total y de cianobacterias a partir de las señales de fluorescencias *in vivo*, en experimentos con cultivos simples y mixtos de cianobacterias y microalgas en un gradiente de concentraciones conocidas. Se realizaron mediciones de clorofila *a* por extracción y de muestras obtenidas de las campañas de muestreo de DINAMA y FREPLATA en las que se midió la fluorescencia de pigmentos para probar el valor predictivo del modelo con muestras naturales. (*Objetivos 2 y 5*).

3- Ponderación de las interferencias de la matriz y la fluorescencia variable. Se evaluó el efecto de las interferencias ópticas en la fluorescencia de diferentes cultivos mediante experimentos con curvas de dilución en aguas con diferentes concentraciones de MODC y turbidez de fuentes artificiales, y se comparó su magnitud con MODC y turbidez en el campo. Mediante experimentos se evaluó la fluorescencia variable y los parámetros fotosintéticos de múltiples cultivos aclimatados a un gradiente de luz y su respuesta a la exposición a crecientes intensidades de luz. (*Objetivos 3 y 4*).

4- Transferencia del conocimiento. Se realizaron talleres de trabajo con técnicos y gestores para implementar el uso de los fluorómetros de acuerdo a su metodología establecida de monitoreo. Se prepararon protocolos de uso de fluorómetros para instituciones estatales (i.e.: DINAMA). (*Objetivos 6 y 7*).

1.7 Estructura de la tesis:

Los resultados obtenidos en esta tesis se presentan ordenados como se indica en la siguiente tabla:

Sección o capítulo	Objetivos específicos	Páginas
2- Artículo en prep.: “A simple quantitative model based on <i>in vivo</i> pigment fluorescence to monitor phytoplankton and cyanobacteria”	1, 2, 3, 5	27 a 63
3- Artículo en prep.: “Dark step corrects phytoplankton photoregulation effect on <i>in vivo</i> chlorophyll <i>a</i> fluorescence”	4	64 a 77
4- Talleres de capacitación y transferencia biotecnológica	6, 7	78 a 85

1.8 Referencias:

- Ahn, C.-Y., S.-H. Joung, S.-K. Yoon, & H.-M. Oh. 2007. Alternative alert system for cyanobacterial bloom, using phycocyanin as a level determinant. *J. Microbiol.* **45**: 98–104.
- Bailey, S., N. H. Mann, C. Robinson, & D. J. Scanlan. 2005. The occurrence of rapidly reversible non-photochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence in cyanobacteria. *FEBS Lett.* **579**: 275–280. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.091
- Beutler, M., K. H. Wiltshire, M. Arp, J. Kruse, C. Reineke, C. Moldaenke, & U.-P. Hansen. 2003. A reduced model of the fluorescence from the cyanobacterial photosynthetic apparatus designed for the *in situ* detection of cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1604**: 33–46. doi:10.1016/S0005-2728(03)00022-7
- Beutler, M., K. H. Wiltshire, C. Lüring, & C. Moldaenke. 2000. Fluorometric depth-profiling of chlorophyll corrected for yellow substances. Poster Present. Aslo 3–4.
- Beutler, M., K. H. Wiltshire, B. Meyer, C. Moldaenke, C. Lüring, M. Meyerhöfer, U.-P. Hansen, & H. Dau. 2002. A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynth. Res.* **72**: 39–53. doi:10.1023/A:1016026607048
- Biggins, J., & D. Bruce. 1989. Regulation of excitation energy transfer in organisms containing phycobilins. *Photosynth. Res.* **20**: 1–34. doi:10.1007/BF00028620
- Bonilla, S. 2009. Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión, S. Bonilla [ed.]. PHI-LAC 17, UNESCO.
- Bonilla, S., S. Haakonsson, A. Somma, A. Gravier, & A. Britos. 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *Innotec*.
- Boulay, C., L. Abasova, C. Six, I. Vass, & D. Kirilovsky. 2008. Biochimica et Biophysica Acta Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. **1777**: 1344–1354. doi:10.1016/j.bbabi.2008.07.002
- Brient, L., M. Lengronne, E. Bertrand, et al. 2008. A phycocyanin probe as a tool for monitoring

- cyanobacteria in freshwater bodies. *J. Environ. Monit.* **10**: 248–255. doi:10.1039/B714238B
- Bryant, D. a. 1982. Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. *Microbiology* **128**: 835–844. doi:10.1099/00221287-128-4-835
- Campbell, D., V. Hurry, A. K. Clarke, & P. Gustafsson. 1998. Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation.
- Carmichael, W. 2008. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. *Adv. Exp. Med. Biol.* **619**: 831–53. doi:10.1007/978-0-387-75865-7
- Carmichael, W. W. 2001. Health effects of toxin-producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs.” *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* **7**: 1393–1407. doi:10.1080/20018091095087
- Catherine, A., N. Escoffier, A. Belhocine, A. B. Nasri, S. Hamlaoui, C. Yéprémian, C. Bernard, & M. Troussellier. 2012. On the use of the FluoroProbe®, a phytoplankton quantification method based on fluorescence excitation spectra for large-scale surveys of lakes and reservoirs. *Water Res.* **46**: 1771–84. doi:10.1016/j.watres.2011.12.056
- Chang, D.-W., P. Hobson, M. Burch, & T.-F. Lin. 2011. The limitation of measurement in cyanobacteria using *in vivo* fluoroscopy. *Seventh Int. Conf. Intell. Sensors, Sens. Networks Inf. Process.* 184–188. doi:10.1109/ISSNIP.2011.6146614
- Chang, D.-W., P. Hobson, M. Burch, & T.-F. Lin. 2012a. Measurement of cyanobacteria using *in-vivo* fluoroscopy - effect of cyanobacterial species, pigments, and colonies. *Water Res.* **46**: 5037–48. doi:10.1016/j.watres.2012.06.050
- Chang, D., P. Hobson, M. Burch, & T. Lin. 2012b. Measurement of cyanobacteria using *in vivo* fluoroscopy - Effect of cyanobacterial species, pigments, and colonies. *WR* **46**: 5037–5048. doi:10.1016/j.watres.2012.06.050
- Chellappa, N. T., S. L. Chellappa, & S. Chellappa. 2008. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of northeast Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **51**: 633–641. doi:10.1590/S1516-89132008000400022
- Cheregi, O., E. Kotabová, O. Prážil, W. P. Schröder, R. Kaňa, & C. Funk. 2015. Presence of state transitions in the cryptophyte alga *Guillardia theta*. *J. Exp. Bot.* **66**: 6461–6470. doi:10.1093/jxb/erv362
- Chorus, I. 2012. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries, I. Chorus [ed.]. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt).
- Chorus, I., J. Bartram, & World Health Organization. 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management., E & FN Spon.
- Dubinsky, Z., & N. Stambler. 2009. Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquat. Microb. Ecol.* **56**: 163–176. doi:10.3354/ame01345
- Durnford, D. G., J. a. Deane, S. Tan, G. I. McFadden, E. Gantt, & B. R. Green. 1999. A Phylogenetic Assessment of the Eukaryotic Light-Harvesting Antenna Proteins, with Implications for Plastid Evolution. *J. Mol. Evol.* **48**: 59–68. doi:10.1007/PL00006445
- Earp, A., C. E. Hanson, P. J. Ralph, et al. 2011. Review of fluorescent standards for calibration of *in situ* fluorometers: Recommendations applied in coastal and ocean observing programs. *Opt. Express* **19**: 26768. doi:10.1364/OE.19.026768
- Falkowski, P. G., M. E. Katz, A. H. Knoll, A. Quigg, J. A. Raven, O. Schofield, & F. J. R. Taylor. 2004. The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. *Science (80-.)*. **305**: 354–360.
- Fernandez-Jaramillo, A. A., C. Duarte-Galvan, L. M. Contreras-Medina, I. Torres-Pacheco, R. G. Guevara-Gonzalez, J. R. Millan-Almaraz, P. S. Division, & E. Faculty. 2012. Instrumentation in Developing Chlorophyll Fluorescence Biosensing: A Review. 11853–11869. doi:10.3390/s120911853
- Ferreira, R. D., C. C. F. Barbosa, & E. M. L. de M. Novo. 2012. Assessment of *in vivo* fluorescence method for chlorophyll *a* estimation in optically complex waters (Curuai floodplain, Pará - Brazil). *Acta Limnol. Bras.* **24**: 373–386. doi:10.1590/S2179-975X2013005000011

- Gibbs, P. B., & J. Biggins. Regulation of the distribution of excitation energy in *Ochromonas danica*, an organism containing a chlorophyll-A/C/carotenoid light harvesting antenna. *Photosynth. Res.* **21**: 81–91. doi:10.1007/BF00033362
- Goss, R., & B. Lepetit. 2015. Biodiversity of NPQ. *J. Plant Physiol.* **172**: 13–32. doi:10.1016/j.jplph.2014.03.004
- Grossman, A. R., M. R. Schaefer, G. G. Chiang, & J. L. Collier. 1993. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.* **57**: 725–49. doi:10.1007/s11120-010-9573-5
- Grouneva, I., T. Jakob, C. Wilhelm, & R. Goss. 2008. A new multicomponent NPQ mechanism in the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1217–1225. doi:10.1093/pcp/pcn097
- Hohmann-Marriott, M. F., & R. E. Blankenship. 2011. Evolution of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 515–48. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103811
- Huot, Y., & M. Babin. 2010. Overview of fluorescence protocols: theory, basic concepts, and practice, p. 31–74. *In* D.J. Suggett, O. Prášil, and M.A. Borowitzka [eds.], *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer Netherlands.
- IPCC. 2007. Mitigation of climate change: Contribution of working group III to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change,.
- Izaguirre, G., C. J. Hwang, S. W. Krasner, & M. J. McGuire. 1982. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 708–14.
- Jeffrey, S., & G. Humphrey. 1997. Application of pigment methods to oceanography.
- Johnsen, G., & E. Sakshaug. 2007. Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulseamplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry. *J. Phycol.* **43**: 1236–1251. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00422.x
- Kanazawa, A., G. J. Blanchard, M. Szabó, P. J. Ralph, & D. M. Kramer. 2014. The site of regulation of light capture in *Symbiodinium*: Does the peridinin–chlorophyll a–protein detach to regulate light capture? *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**: 1227–1234. doi:10.1016/j.bbapbio.2014.03.019
- Kong, Y., I. Lou, Y. Zhang, C. U. Lou, & K. M. Mok. 2014. Using an online phycocyanin fluorescence probe for rapid monitoring of cyanobacteria in Macau freshwater reservoir. *Hydrobiologia* **741**: 33–49. doi:10.1007/s10750-013-1759-3
- Koreivienė, J., O. Anne, J. Kasperovičienė, & V. Burškytė. 2014. Cyanotoxin management and human health risk mitigation in recreational waters. *Environ. Monit. Assess.* **186**: 4443–59. doi:10.1007/s10661-014-3710-0
- Krause, G. H., & E. Weis. 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 313–349. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
- Lavaud, J., & R. Goss. 2014. The Peculiar Features of Non-Photochemical Fluorescence Quenching in Diatoms and Brown Algae, p. 421–443. *In* Springer Netherlands.
- Lee, T., M. Tsuzuki, T. Takeuchi, K. Yokoyama, & I. Karube. 1994. In-Vivo Fluorometric Method for Early Detection of Cyanobacterial Waterblooms. *J. Appl. Phycol.* **6**: 489–495.
- Leflaive, J., & L. Ten-Hage. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw. Biol.* **52**: 199–214. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x
- Lorenzen, C. J. 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* **13**: 223–227. doi:10.1016/0011-7471(66)91102-8
- MacIntyre, H. L., E. Lawrenz, & T. L. Richardson. 2010. Taxonomic discrimination of phytoplankton by spectral fluorescence, p. 129–169. *In* *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*.
- Mackey, M., D. Mackey, H. W. Higgins, & S. Wright. 1996. CHEMTAX- a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **144**: 265–283.
- Millie, D. F., O. M. E. Schofield, G. J. Kirkpatrick, G. Johnsen, & T. J. Evens. 2002. Using absorbance

- and fluorescence spectra to discriminate microalgae. *Eur. J. Phycol.* **37**: 313–322. doi:10.1017/S0967026202003700
- Nelson, N. B., & D. a Siegel. 2013. The global distribution and dynamics of chromophoric dissolved organic matter. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **5**: 447–76. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100751
- Owens, T. G. 1986. Light-Harvesting Function in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*: II. Distribution of Excitation Energy between the Photosystems. *Plant Physiol.* **80**: 739–46. doi:10.1104/PP.80.3.739
- Paerl, H. W., & T. G. Otten. 2013. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb. Ecol.* **65**: 995–1010. doi:10.1007/s00248-012-0159-y
- Paerl, H. W., & V. J. Paul. 2012. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* **46**: 1349–63. doi:10.1016/j.watres.2011.08.002
- Pires, M. D., & Deltares. 2010. Evaluation of fluorometers for the in situ monitoring of chlorophyll and/or cyanobacteria.
- Reynolds, C. S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*, Cambridge University Press.
- Richardson, T. L., E. Lawrenz, J. L. Pinckney, R. C. Guajardo, E. a Walker, H. W. Paerl, & H. L. MacIntyre. 2010. Spectral fluorometric characterization of phytoplankton community composition using the Algae Online Analyser. *Water Res.* **44**: 2461–72. doi:10.1016/j.watres.2010.01.012
- Ruban, A., J. Lavaud, B. Rousseau, G. Guglielmi, P. Horton, & A. L. Etienne. 2004. The super-excess energy dissipation in diatom algae: Comparative analysis with higher plants,.
- Schreiber, U., C. Klughammer, & J. Kolbowski. 2012. Assessment of wavelength-dependent parameters of photosynthetic electron transport with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.* **113**: 127–44. doi:10.1007/s11120-012-9758-1
- Schwaderer, A. S., K. Yoshiyama, P. de Tezanos Pinto, N. G. Swenson, C. A. Klausmeier, & E. Litchman. 2011. Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **56**: 589–598. doi:10.4319/lo.2011.56.2.0589
- Seppälä, J., P. Ylöstalo, & H. Kuosa. 2005. Spectral absorption and fluorescence characteristics of phytoplankton in different size fractions across a salinity gradient in the Baltic Sea. *Int. J. Remote Sens.* **26**: 387–414. doi:10.1080/01431160410001723682
- Serra, T., C. Borrego, X. Quintana, L. Calderer, R. López, & J. Colomer. 2009. Quantification of the effect of nonphotochemical quenching on the determination of in vivo Chl a from phytoplankton along the water column of a freshwater reservoir. *Photochem. Photobiol.* **85**: 321–331. doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00441.x
- Simis, S. G. H., Y. Huot, M. Babin, J. Seppälä, & L. Metsamaa. 2012. Optimization of variable fluorescence measurements of phytoplankton communities with cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **112**: 13–30. doi:10.1007/s11120-012-9729-6
- Smith, V. H., & D. W. Schindler. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends Ecol. Evol.* **24**: 201–7. doi:10.1016/j.tree.2008.11.009
- Stewart, I., P. J. Schluter, & G. R. Shaw. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environ. Health* **5**: 7. doi:10.1186/1476-069X-5-7
- Stomp, M., J. Huisman, L. J. Stal, & H. C. P. Matthijs. 2007. Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. *ISME J.* **1**: 271–82. doi:10.1038/ismej.2007.59
- Suggett, D. J., H. L. MacIntyre, & R. J. Geider. 2004. Evaluation of biophysical and optical determinations of light absorption by photosystem II in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr. Methods* **2**: 316–332. doi:10.4319/lom.2004.2.316
- Vidal, L., & A. Britos. 2012. Uruguay: Occurrence, Toxicity and Regulation of Cyanobacteria, p. 130–136. *In* Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries.
- Watras, C. J., & A. L. Baker. 1988. Detection of planktonic cyanobacteria by tandem in vivo fluorometry. *Hydrobiologia* **169**: 77–84. doi:10.1007/BF00007935

- Whitton, B. A., & M. Potts. 2002. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space, B.A. Whitton and M. Potts [eds.]. Springer Netherlands.
- Wright, S., S. Jeffrey, & R. Mantoura. 2005. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods, Unesco Publishing.
- Xu, X., S. Yang, J. Xie, & J. Zhao. 2012. Kinetics and dynamics for light state transition in cyanobacterium *Spirulina platensis* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**: 233–237. doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.131
- Yentsch, C. S., & C. M. Yentsch. 1979. Fluorescence Spectral Signatures the Characterization of Phyto Plankton Populations by the Use of Excitation and Emission Spectra. *SO - J. Mar. Res.* 37(3). 1979. 471-484.
- Yoshida, M., T. Horiuchi, & Y. Nagasawa. 2011. In situ multi-excitation chlorophyll fluorometer for phytoplankton measurements: Technologies and applications beyond conventional fluorometers. *Proceedings of the OCEANS 2011*. MTS/IEEE. 1–4.
- Zamyadi, A., N. McQuaid, S. Dorner, D. F. Bird, M. Burch, P. Baker, P. Hobson, & M. Prévost. 2012. Cyanobacterial detection using in vivo fluorescence probes: Managing interferences for improved decision-making. *J. Am. Water Works Assoc.* **104**: 466–480. doi:10.5942/jawwa.2012.104.0114

CAPÍTULO 2. A SIMPLE QUANTITATIVE MODEL BASED ON *IN VIVO* PIGMENT FLUORESCENCE FOR MONITORING PHYTOPLANKTON AND CYANOBACTERIA

Bruno Cremella¹, Yannick Huot², Sylvia Bonilla¹

1: Phytoplankton Ecology and Physiology Group, Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

2: Laboratory of environmental analysis, Université de Sherbrooke, Quebec, Canada

e-mail: brunocremella@gmail.com

Keywords: chlorophyll *a*, phycocyanin, blooms, pigments, management, water ecosystems.

2.1 Abstract

In vivo pigment fluorescence methods allow simple and real-time detection and quantification of cyanobacteria in freshwaters. Available predictive models are still limited due to high-cost fluorometers and restricted to individual water bodies, impeding comparisons of data between fluorometers and thus their use in large geographic monitoring programs. Moreover, few models have corrections for optical interference (water turbidity and colored dissolved organic matter, CDOM). We develop a simple, *in vivo* fluorescence model for the prediction of phytoplankton and cyanobacteria chlorophyll *a* (chl *a*) concentration, based on chl *a* and C-phycocyanin fluorescence, that can be applied with low-cost fluorometers and is consistent between multiple instruments. We aimed to: 1—perform several experiments with cyanobacterial and microalgal cultures to select the algorithms, 2- inter-calibrate seven units of the same model fluorometer, 3—correct for CDOM and turbidity interference and 4—test the performance of the model with natural samples. We achieved comparable results between instruments after intercalibration corrections, allowing the simultaneous use of multiple fluorometers. The selected linear model fulfilled the linear regression assumptions up to 57 $\mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$, and showed a good performance ($n = 268$, $R^2 = 0.85$, root mean square error, $\text{RMSE} = 6.3 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$) using culture experiments but

performed less well when applied to natural samples ($n = 106$, $R^2 = 0.71$, $RMSE = 14 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$), suggesting the presence of additional interference or sources of variability that needs further evaluation. We developed an algorithm to correct for the significant interference of CDOM and turbidity in total phytoplankton chl *a* quantification. The new model allows the detection and quantification of total phytoplankton and cyanobacteria chl *a* in real time with multiple low-cost fluorometers and will contribute to the implementation of large scale monitoring programs.

2.2 Introduction

Eutrophication and climate change effects promote toxic cyanobacteria blooms that threaten drinking and recreational water sources (Chorus and Bartram 1999; Paerl and Otten 2013). Monitoring programs include cyanobacteria biomass surveillance in order to implement early warning alerts of these organisms or to select appropriate mitigation actions (Chorus 2012). The most used biomass indicators, the total phytoplankton chl *a* concentration and cyanobacteria total cell abundance and biovolume (Chorus & Bartram, 1999), are time consuming, training intensive and costly techniques (Ahn et al. 2007). Marker pigments are molecules that can be used to detect and quantify phytoplankton. Because of major evolutionary differences, fluorescence “fingerprints” allow the discrimination of algal groups by their excitation spectra. Freshwater algae have peripheral antennae called light harvesting complexes (LHCs) composed of chlorophylls and carotenoids with an excitation range of 400 to 500 nm. These pigments share/transfer their excitation energy to chlorophyll *a* molecules within the antenna and part is fluoresced near 685 nm. Cyanobacteria have phycobilisomes (PBS) containing mainly phycocyanin, with an excitation range from 590 to 620 nm and emission at 650 nm (Millie et al. 2002). Separate excitation and emission measurements in these two band sets, called chlorophyll *a* and phycocyanin *in vivo* fluorescence (from eukaryotic LHCs and cyanobacterial PBSs, respectively) are useful for predicting the cyanobacterial fraction of the total Chl *a* phytoplankton, due to the cross residual fluorescence of cyanobacteria (low fluorescence of their Chl *a*) and algae (residual excitation of chlorophylls-based antennae in the C-PC channel) (Lee et al. 1995). Some cryptophytes contain phycocyanin, but they emit fluorescence mostly in the Chl *a* channel (Van Der Weij-De Wit et al. 2006; Hoef-Emden 2008) and thus do not overlap with cyanobacterial phycocyanin signals.

In vivo fluorescence of phytoplankton photosynthetic pigments is a tool increasingly used to quantify phytoplankton and cyanobacteria due to its simplicity and real-time diagnostic capacity (Ghadouani and Smith 2005; Seppälä et al. 2007; Ye et al. 2014; Kong et al. 2014; Zamyadi et al. 2016). Although these methods are still under evaluation, their use has been introduced in water management regulations (Ibelings et al. 2012). C-PC *in vivo* fluorescence is a promising indicator of cyanobacteria in water monitoring programs and has been suggested as an integral part in alert systems frameworks (Ahn et al. 2007; Izydorczyk et al. 2009; Koreivienė et al. 2014). However, the lack of standardization between equipment and the variability in pigment composition and variable fluorescence kinetics currently limit the use of this methodology (Zamyadi et al. 2016). In addition, only a few available Chl *a* prediction algorithms include corrections for major water interferences (absorption and scattering) (Beutler et al. 2000; Ferreira et al. 2012). Despite the increasing number of publications using this approach, each method corresponds to an individual instrument (Zamyadi et al. 2012, 2016). Implementation of this technique in large scale monitoring programs requires the use of multiple, intercalibrated fluorometers, which has not been achieved yet. In addition, large scale programs result in high operational cost, and the use of simple low cost instruments becomes critical, although no methods are available for simple handheld fluorometers.

Scattering, absorption and fluorescence by non-algal substances in the water can cause significant interference with measurement of pigment fluorescence. In natural waters the turbidity, generated by particle scattering, and colored dissolved organic matter (CDOM; see Table 2.1 for abbreviations, symbols and units) fluorescence can affect the *in vivo* cell fluorescence measurements (Brient et al. 2008; Chang et al. 2011; Ferreira et al. 2012). CDOM is a complex mix of colored organic molecules whose absorption decreases exponentially with wavelength. It contains a variable fluorescent fraction (FDOM), also with intensity decreasing exponentially with wavelength (Nelson and Siegel 2013). Non-algal particles (NAP) can have absorption properties similar to CDOM, and in inland waters could reach the same magnitude of interference as CDOM (Kirk 1994; Gilerson et al. 2007). Turbidity is caused by biological and abiotic particles in suspension, which are hard to isolate. Some fluorometers are largely insensitive to turbidity (Zamyadi et al. 2012), while others have CDOM corrections using UV excited

fluorescence in their algorithms (Catherine et al. 2012). However, if the probe is susceptible to turbidity and CDOM, post-measurement corrections could be applied (Ferreira et al. 2012). There are no methods with algorithm to correct both turbidity and CDOM effects for handheld, low cost fluorometers.

We developed an *in vivo* fluorescence model to predict the total phytoplankton Chl *a* concentration and the cyanobacterial Chl *a* concentration using multiple low cost fluorometers of the same model. To achieve this, we defined four main goals: 1) to calibrate and compare multiple fluorescence probes of the same model; 2) to establish an algorithm for total and cyanobacterial Chl *a* based on the *in vivo* fluorescence of Chl *a* and C-PC; 3) to empirically determine and quantify the optical interferences of the matrix; and 4) to evaluate the performance of the new method in field sampling campaigns.

2.3 Materials and methods

We designed our study in three steps. First, we inter-calibrated seven handheld Aquafluor fluorometers (Turner Designs) configured with two channels (chlorophyll *a* and phycocyanin). Second, we developed new algorithms to predict total phytoplankton and cyanobacterial chlorophyll *a* based on the fluorescence readings of mixed cyanobacteria and algal cultures, including corrections for optical interferences (CDOM and turbidity). Third, we tested the new algorithms on the results of monitoring campaigns (84 natural samples, 2014-2016) along a gradient of 35 beaches from fresh to marine waters of the la Plata river and Atlantic ocean.

2.3.1 Cultures and equipment

Eight strains of cyanobacteria (4) and microalgae (4) were grown in modified full BG-11 medium. Experiments took place at Sección Limnología (Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay) and Laboratoire d'Analyses Environnementales, (Université de Sherbrooke, Canada) (Table 2.2). Cultures in Uruguay were grown at $25\pm 1^\circ\text{C}$ and 16:8h light:dark photoperiod; light was provided by white LED tubes (GR-T8-418LI-55C-NWRV2, Green Ray), with irradiances varying from 60 for cyanobacteria to $80\ \mu\text{mol quanta m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ for algae. Cultures in Canada were grown at $20\pm 1^\circ\text{C}$ and 12:12h light:dark photoperiod; light was provided by white fluorescent tubes (Silhouette F14T5/841/ALTO, Phillips), with irradiances $\sim 80\ \mu\text{mol quanta m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

In vivo fluorescence was measured with Aquafluor fluorometers (Turner Designs), with two channels corresponding to the *in vivo* fluorescence of Chl *a* (part number: 8000-406; excitation 460 nm, emission \geq 660 nm, longpass), and the *in vivo* fluorescence of C-PC (part number: 8000-412; excitation 590 nm, emission 673 nm with 85 nm bandpass, covering C-PC and Chl *a* emission bands). Measurements were made in polystyrene cuvettes, at room temperature (\sim 20 °C) and dim light.

2.3.2 Raw fluorescence

To develop a new model we needed to work from raw fluorescence signals. The Aquafluor fluorometer reports fluorescence values that are already standardized against stored calibration values. The instrument has a two-point calibration system (0 and an arbitrary value, StdVal). These are stored in the fluorometer's internal raw scale as %blk and %std respectively; the calibration is such that the fluorometer returns a value *F* equal to StdVal when the standard is read:

$$F = F^* \left(\frac{\text{StdVal}}{\%Std - \%blk} \right). \quad (1)$$

Where *F** is the raw fluorescence (percentage of the saturation value of each channel), and *F* (RFU) is the measurement returned by the fluorometer. By reorganizing eq. 1, one can obtain the raw fluorescence measured by the fluorometer.

Fluorometers were calibrated with Red Adjustable Solid Secondary Standards (RASSS). The RASSS is a fluorescent plastic embedded in a black enclosure with four perpendicular adjustable windows, which allow the passage of excitation and emission light. The RASSS window was manually adjusted by a top screw, modifying its fluorescence proportionally to the window opening. We followed the manufacturer's suggestions of selecting a ratio between the %Std and %Blk values between 5 and 30 to obtain the best linear range.

2.3.3 Cross calibration of fluorometers and culture dilution series experiments

We evaluated the effect of using different RASSS window openings during calibration on the fluorescence reported and raw values between fluorometers (Supp. fig. 1). To test the RASSS opening effect, we ran a set of experiments with culture dilution series and with 3 Aquafluor units calibrated with a single RASSS (serial number 0815) as a

reference standard and a StdVal=100. Three RASSS window openings were defined for the test (Open, Intermediate and Closed). A series of three dilutions (1/10, 1/100 and 1/1000) of cultures of the cyanobacterium *Cyanobium* spp. and the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* were used for the test. For each set of fluorescence measurement (three for each dilution, total = 9 readings per strain), each fluorometer was calibrated as described above with a standard and blank. One of the fluorometers calibrated with an intermediate RASSS opening was used as a reference from which to standardize each set of culture-dilution readings. To test the effect of the RASSS opening, the ratio $\frac{1}{\%Std - \%Blk}$ was used as an opening indicator.

To test the comparability of measurements between fluorometers, we performed a series of experiments with seven Aquafluor units (named as: DINAMA, Colonia, San José, Montevideo, Canelones, Maldonado and Rocha). We first compared the performance of the seven instruments, calibrated with the same RASSS (serial 0815), and second, with the 7 individually assigned RASSSs (Supp. fig. 1). For these tests we used the cyanobacteria *P. agardhii* and *Cyanobium* spp., and the chlorophyte *C. reinhardtii*. Chl *a* and C-PC fluorescence of culture dilution series (1, 1/5, 1/10, 1/50 and 1/100) were measured with each fluorometer calibrated with the same RASSS. For the multiple RASSS calibration test, seven RASSS (Table 2.3, Supp. fig. 1) were manually adjusted to closely match the reference fluorometer and RASSS (DINAMA, RASSS serial 0815). Pigment fluorescence was measured on the three culture strains using 3 serial dilutions (1, 1/10, and 1/50) in triplicate. Post calibration values were determined following Eq. (2) and (3):

$$\text{PostCal}_i = \text{median} \left(\frac{F_{i,j}^*}{F_{\text{DINAMA},j}^*} \right) \quad (2)$$

$$F^{**} = \frac{F_i^*}{\text{PostCal}_i} \quad (3)$$

Where $F_{j,i}^*$ is the F^* of dilution j measured with the fluorometer i , $F_{\text{DINAMA},j}^*$ is the F^* of dilution j measured with the DINAMA's fluorometer; PostCal_i is the post calibration value for the fluorometer i and F^{**} is the post-calibrated corrected fluorescence. Each PostCal_i parameter was determined from 27 measurements (3 cultures * 3 dilutions * 3 replicates). PostCal_i estimated from the single and multiple RASSS calibrations were compared using a linear regression. For both tests, culture subsamples were taken to quantify the Chl *a* concentration by spectrophotometry following ISO 10260:1992.

2.3.4 A new model to predict total phytoplankton and cyanobacterial Chl *a*

We developed an algorithm to predict the total phytoplankton Chl *a* and the cyanobacterial Chl *a* concentrations based on *in vivo* fluorescence of Chl *a* and C-PC. We obtained the algorithms by fitting multiple linear regressions between fluorescence data generated from experiments with single and with mixed cultures and the Chl *a* concentration measured on extracts. We used factorial combinations to simulate different cases of algal and cyanobacterial relative contribution. We ran the experiments by combining one cyanobacteria (*M. aeruginosa*) and one algae (either *S. obliquus* or *P. tricornutum*) (simple mixed), and two cyanobacteria plus two algae (complex mixed, *M. aeruginosa*, *P. agardhii*, *S. obliquus* and *P. tricornutum*) cultures (Tables 2.4 and 2.5).

We first quantified the Chl *a* concentration of the four cultures mentioned above by direct extraction of 0.2 ml pipetted into 1.8 ml of acetone 90%:DMSO, 3:2 v:v, following the fluorometry technique described by Andersen (2005) and reading the extracts in a fluorometer. Multiple linear regressions to predict total and cyanobacterial Chl *a*, as a function of *in vivo* fluorescence, were fitted according to:

$$[\text{Chl } a] = A * F_{\text{C-PC}}^{**} + B * F_{\text{Chl } a}^{**} \quad (4)$$

Where the response variable [Chl *a*] is the measured Chl *a* concentration (total or cyanobacterial), $F_{\text{C-PC}}^{**}$ is the cross-calibrated fluorescence of the C-PC channel, $F_{\text{Chl } a}^{**}$ is the cross-calibrated fluorescence of the Chl *a* channel, and A, B are the regression coefficients. Distribution of the response variables (predicted total and cyanobacteria Chl *a* concentration) were tested for normality and homoscedasticity (Shapiro-Wilk and Breusch–Pagan tests, respectively) (Breusch and Pagan 1979). Models with and without intercept were compared and selected by analyzing their variance and applying the Akaike Information Criteria (AIC). Prediction intervals were determined using the fluorescence corrected by a post-calibration factor (**) and fitting the 5 and 95% quantile linear regressions (Cade and Noon 2003), according to: $[\text{Chl } a] (\mu\text{g L}^{-1}) = A F_{\text{C-PC}}^{**} + B F_{\text{Chl } a}^{**} + C$ (Table 2.6, Fig. 2.3), using 389 measurements (all strain dilution quantified Chl *a* are listed in Table 2.2, except for *P. tricornutum* and *Cyanobium* spp.).

2.3.5 Effects of CDOM and turbidity on total and cyanobacterial chlorophyll a predictions

To evaluate the interference of CDOM and turbidity on fluorescence signals we performed a series of experiments using culture dilution series (two cyanobacteria and one green algal strains) with different CDOM and turbidity conditions. *C. raciborskii* and *S. capricornutum* were used to test individual impacts of CDOM and turbidity. *Cyanobium* spp. was used to examine the interaction between CDOM and turbidity, for allowing to test the cyanobacterial Chl *a* model and a lower range of Chl *a* concentrations (due to it being a picocyanobacteria, the dilutions have have more spatial homogeneity and less variation). All treatment solutions (control, CDOM, turbidity and CDOM+turbidity) were prepared with 10% BG-11 diluted culture media to prevent osmotic shock in cells.

Single interference experiments consisted of series of *C. raciborskii* and *R. subcapitata* culture dilutions, two CDOM and two turbidity levels and one control. Each series was composed of triplicates of six culture diluted to have the following [Chl *a*]: 0, 5, 10, 20, 30 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *C. raciborskii*; and 0, 2.5, 5, 10, 15 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *R. subcapitata*.

Interaction experiments consisted of series of *Cyanobium* spp. culture dilutions in each of control, CDOM, turbidity, and CDOM+turbidity treatments. Each series was composed of triplicates of six culture dilutions, aimed to have the following chlorophyll *a* concentrations: 0, 1, 2, 5, 10 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Three milliliters subsamples of each dilution were taken to measure the *in vivo* fluorescence, and the remaining volumes were filtered through glass fiber filters to measure [Chl *a*]. Chl *a* was extracted according to the ISO 10260 method and measured in a fluorometer (Trilogy, Turner Designs, extracted Chl *a* module p/n 7200-040) calibrated with a Chl *a* standard (Sigma) dissolved in 90% ethanol in the concentration range 3 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. All treatments were left for 40 minutes in the dark at room temperature before the *in vivo* fluorescence measurements.

We used commercial black tea (Lipton Yellow Label) solutions as a CDOM analog, since it is a complex mix of oxidized plant compounds with similar absorption and fluorescence spectrum (Seetohul et al. 2006; Dong et al. 2014) as natural freshwater

CDOM (McKnight et al. 2001; Helms et al. 2008; Fellman et al. 2010; Nelson and Siegel 2013). We first prepared a working solution by putting a commercial tea bag in 450 mL of pre-heated distilled water at 75 °C let it cool at room temperature for 20 minutes. The solution was then filtered through a fiberglass filter (MGF Munktell), and absorbance measured at 440 nm on a spectrophotometer (Evolution 60, Thermo) (the absorbance at 750 nm was subtracted) with an optical path of 1 cm, to be used as a CDOM proxy. Two concentrations were prepared by first diluting the working solution with distilled water to reach ~ 0.500 AU_{440nm}, and then further diluting this 1/10 to obtain the second level (Table 2.7). For the turbidity levels we used commercial kaolinite powder (Droguería Paysandú, Uruguay), a major silicate mineral component of suspended clay sediments in natural waters, commonly used as a turbidity source to test fluorometer performance (Chang et al. 2011; Zamyadi et al. 2012). Initial working solution was prepared by adding 0.275 g of kaolinite to 1 L of a 10% solution of BG-11 (~ 500 NTU) in distilled water. The second level was a 1/10 dilution of the working solution in BG-11 10% (Table 2.7). Turbidity was quantified as TNU with a Horiba® U-50 multiparameter probe.

To evaluate the effect of optical interactions in natural samples, CDOM and turbidity of river filtered water were analyzed and compared with the previous experimental results. River water was filtered through a glass fiber filter (MGF, Munktell), and total and cyanobacterial Chl *a* were calculated by applying eq. 4 to the fluorescence signals (C-PC and Chl *a*). Absorbances of the filtered water at 440 nm and/or the fluorescence measured with a fluorometer (Trilogy, Turner Designs, CDOM module p/n 7200-069) were transformed to absorption coefficients (in m^{-1}) to be used as a CDOM proxy. CDOM fluorescence readings were transformed to 440 nm absorbance by applying a linear regression between CDOM fluorescence and absorbance. Water samples from Santa Lucía river was selected to evaluate the turbidity effect on the predicted total and cyanobacterial Chl *a*. Filtered water fluorescence was subtracted, and only data with < 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Chl *a* was used.

2.3.6 Application of the new in vivo fluorescence model in natural phytoplankton samples

To test the new algorithms we measured the fluorescence of natural phytoplankton samples from the Río de la Plata estuary in a joint monitoring program (Ministry of

environment, DINAMA-FREPLATA, Universidad de la República and San José, Colonia, Montevideo, Canelones, Maldonado and Rocha municipalities) during summer 2014, 2015 and 2016 (November to March, each year), totaling 188 fluorescence readings associated to 84 analytically quantified Chl *a* data. Water temperature was also recorded. Thirty-five sampling sites along the fluvial-marine gradient of La Plata river--Atlantic coast (Fig. 2.6) were classified in four regions according to the salinity average in fluvial (salinity ≤ 0.5 ppt), estuarine (mean salinity < 15 ppt) and marine (mean salinity > 15 ppt) regions. From these results we excluded the Chl *a* $> 57 \mu\text{g L}^{-1}$ (outside the prediction limit), and two subsets of data corresponding to estuarine (bad calibration on C-PC channel) and marine (high Chl *a* with very low fluorescence due to a heterogeneously dispersed bloom) sections. The remaining dataset consisted of 106 fluorescence readings, 63 quantified Chl *a* and 27 sites. Since temperature can affect the resulting *in vivo* pigment fluorescence, data were corrected by water temperature with the coefficients from Kasinak et al. (2015) for C-PC and from Lorenzen (1966) for *in vivo* Chl *a*. The prediction capacity of our model for natural samples was tested by comparing modeled to measured Chl *a* concentration with simple linear regressions fitted to each salinity region.

2.3.7 Statistical analysis

All statistics and data analyses were performed with R software (R Core Team 2015), with the packages *doBy*, *nls* and *quantreg* for group-wise analysis, non-linear least squares curve fitting and quantile regressions, respectively. Total and cyanobacterial Chl *a* prediction models were subjected to a residual analysis to determine the fulfillment of linear regressions assumptions (Dunn and Smyth 1996).

2.4 Results

2.4.1 RASSS opening and calibration

The Chl *a* raw fluorescence showed strong linearity with cultures dilution for all fluorometers and was not modified by the RASSS window openings in the range tested. The C-PC raw fluorescence, in contrast, deviated from linearity and it was affected by RASSS opening, restricting the validity of the calibration to a narrow RASSS opening margin. Despite being collinear, the culture fluorescence measurements differed widely between the fluorometers calibrated with the reference RASSS at a single window opening, indicated by the low correlation between fluorescence vs. dilution series ($R^2 =$

0.44 and 0.35 for Chl *a* and C-PC channels, respectively) (Figs. 2.1A and 2.1C). F^* showed a very good fit with dilution ($R^2 = 0.995$ for Chl *a* and $R^2 = 0.987$ for C-PC when excluding the points corresponding to the Maldonado probe calibrated with a RASSS with intermediate opening. Unlike fluorescence reported by default (F) by the fluorometers, F^* is intercomparable between fluorometers and RASSS openings. There were no significant differences between fluorometers for C-PC F^* within for %Std/%Blk between 2.5 and 15 (df=3, $F=1.289$, $p=0.29$). However, Chl *a* F^* was significantly different for each fluorometer with no interaction effect between instruments (ANOVA, RASSS: df=3, $F=1.289$, $p=0.29$, Fluorometer: df=3, $F=20.681$, $p < 0.001$, interaction: df=4, $F=0.657$, $p=0.623$).

2.4.2 Comparison of independently calibrated fluorometer measurements

Significant differences ($p < 0.05$) were found in the F^* fluorescence for both Chl *a* and C-PC measured with the seven fluorometers, either calibrated with the reference RASSS cell (ANOVA of Chl *a*-weighted F^*_{C-PC} , df=7, $F=14.362$, and $F^*_{Chl\ a}$, df=7, $F=6.867$, $p < 0.05$ for both tests), or with the different RASSSs (ANOVA, Chl *a*-weighted F^*_{C-PC} , df=6, $F=5.858$, $n=105$, and $F^*_{Chl\ a}$, df=6, $F=10.792$, $n=105$, $p < 0.05$ for both tests). The data dispersion was not a consequence of any particular fluorometer or calibration method (post-hoc Tukey's HSD test, $p > 0.05$) (data not shown). The use of F^{**} with the fluorometer-specific $PostCal_i$ values (Table 2.3) improved the fit of the regression (R^2) between fluorescence and Chl *a* concentration, for both channels and for calibration performed with the reference (serial 0185) or the individual RASSS (Fig. 2.2).

The use of $PostCal_i$ -corrected values significantly improved the regression fit between F^{**} and Chl *a* concentration in both channels (Fig. 2.2), decreasing the variability between instruments. There was a significant correlation of the $PostCal_i$ values between the two calibration methods, individual RASSS $PostCal = 1.031$ (single RASSS $PostCal$) - 0.018 ($R^2 = 0.935$) for C-PC, and individual RASSS $PostCal = 1.041$ (single RASSS $PostCal$) - 0.082 ($R^2 = 0.882$) for Chl *a*.

2.4.3 New model to predict total and cyanobacterial chlorophyll a concentration based on in vivo fluorescence signals

We obtained a set of multiple linear models that could accurately predict the total and cyanobacterial Chl *a* concentration regardless of species and pigment composition. The

models were developed with simple and mixed cultures, with defined prediction intervals. The addition of an intercept showed no statistical support (t-test, $p=0.945$; $\Delta AIC < 2$) (Table 2.8), and thus, the best linear models did not include the intercept (Table 2.8, Fig. 2.3), neither for predicting total Chl *a* nor for cyanobacteria Chl *a*, lowering the degrees of freedom and simplifying the models. The response variable [Chl *a*] was homoscedastic (Breusch-Pagan test, $p > 0.05$) after a [Chl *a*] cut-off below $56.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Although [Chl *a*] data did not follow a normal distribution even after testing the upper cut-off limits (Shapiro-Wilk test, $p>0.05$), the normality of the response variable is not an assumption for the linear model regression (Poole and O'Farrell 1971), and the results were statistically robust with minor deviation from normal distribution. The model was linear up to [Chl *a*] of $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 2.3), and the residuals showed normal distribution (Shapiro-Wilk normality test, $W = 0.981$, $p\text{-value} = 0.060$).

For the cyanobacterial [Chl *a*] model, data did not fulfill the assumptions neither for normality or homogeneity of variance (Shapiro-Wilk test, and Breusch-Pagan test, respectively, $p<0.05$) at any Chl *a* threshold value (tested in the full range of concentrations in increments of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of Chl *a*). The residuals did not have a normal distribution (Shapiro-Wilk test). However, applying the principle of parsimony, we applied the same cut-off defined for the total Chl *a* model ($56.5 \mu\text{g L}^{-1}$). A similar model for eukaryotic Chl *a* was fitted, but it was identical to the difference between total Chl *a* and cyanobacterial Chl *a*, making the model redundant.

2.4.4 Effects of CDOM and turbidity on fluorescence

CDOM and turbidity interfered with the fluorescence signals incrementing the concentration of predicted Chl *a* in both models (total and cyanobacteria) (Fig. 2.4). CDOM affects the measurements by adding a background fluorescence signal. The magnitude of the signal was directly proportional to the concentration of CDOM or turbidity (Table 2.9, Fig. 2.4). CDOM decreased the slope of predicted vs. measured total Chl *a* by 30% and cyanobacterial Chl *a* by 21% per absorbance unit (AU) at 440 nm, while turbidity showed no significant effect on the slope in both models (Table 2.9). Chl *a* background generated by CDOM solutions had a linear relation with absorbance at 440 nm below $0.1 \text{ AU}_{440\text{nm}}$.

There was a significant interaction between CDOM and turbidity (Fig. 2.4) that affected the predicted total and cyanobacterial Chl *a*. This effect was mostly due to the non-linear response of fluorescence to CDOM over 0.1 AU_{440nm}.

2.4.5 Comparison with natural samples

Natural CDOM and turbidity interfered in the fluorescence generating a “background” signal, resulting in an increment of the modeled Chl *a* concentration (Fig. 2.5). Natural CDOM, ranging from almost 0 to 20 m⁻¹, was within the absorption coefficients of the tested tea solutions (up to 115 m⁻¹, 0.5 AU_{440nm}). The regression between the background predicted Chl *a* (total and cyanobacteria) and the absorption coefficient at 440 nm showed similar linear slopes when comparing natural CDOM and tea solutions up to 20 m⁻¹ tested in the previous section (Fig. 2.5, Table 2.10). For turbidity, the background predicted Chl *a*/NTU slope was similar between kaolinite experiments and filter river water and both were very low compared to CDOM effect (Fig. 2.5, Table 2.10).

2.4.6 Test of the new model on field measurements

The prediction capacity of the new chlorophyll *a* models was tested with natural phytoplankton samples taken from 35 sampling sites along a fluvial-marine coastal gradient. Low Chl *a* concentrations (<10 µg L⁻¹) were determined in most of the sites. The regression fit of modeled Chl *a* versus extracted Chl *a* concentration varied depending on the origin of the fluorescence data. Field data showed a higher root mean square error (RMSE) than the training dataset (mixed culture experiments) and laboratory datasets (including all cultures measured), along with a higher slope and intercept (Table 2.11). The fluvial, estuarine and marine region data varied in their slope but showed similar intercepts and RMSE. The marine section data showed a very low R² (0.36), and in the other end the fluvial section showed a very strong linearity (R²=0.95) (Table 2.11). There was a significant linear fit between the modeled Chl *a* and analytical Chl *a* concentration (Fig. 2.6).

2.5 Discussion

Monitoring of freshwater cyanobacteria requires fast, simple, low cost and reliable methods. Furthermore, the comparability of data between instruments is necessary to implement large geographic monitoring programs. We developed new quantitative models to predict Chl *a* (total phytoplankton and cyanobacteria) allowing to use simple,

low cost fluorometers. Our models allow the simultaneous use of multiple fluorometers, which can significantly facilitate freshwater monitoring over large regions. Our models are not restricted to be used with the handheld fluorometer used in this study.

2.5.1 Calibration and secondary standards:

We found that using F^* , instead of the default reported fluorescence (F), the comparability of measurements between instruments significantly improved, being the first step toward a data full intercomparison. The alignment of the RASSS with the probe's optics led to slight differences between instruments, despite the differences in the standard values (StdVal) and therefore the F^* correction was needed to remove this effect. However, another type of standard solution could improve calibration and simplify data intercomparison. For instance, b-rhodamin, a stable fluorescent compound, could be a better standard than RASSS, avoiding the transformation steps F^* and F^{**} , simplifying the model data transformation. A simplified procedure could fit the ISO 17025 (International Standard Organization 2005) quality control requirements for new method validation.

2.5.2 Measurements withy cross-calibrated fluorometers

The post-calibration correction to obtain F^{**} significantly improved the comparability of the data of the 7 tested instruments, with any calibration procedure. The simultaneous use of multiple fluorometers is essential to include *in vivo* fluorescence techniques in water monitoring programs at large scale. Few published quantitative fluorescence methods work with multiple intercalibrated instruments (Guinet et al. 2013; Xing et al. 2014), and most of them are restricted to single fluorometer units or to the comparison of different models/brands (i. e. Gregor and Marsálek 2004; Zamyadi et al. 2016). A simple calibration step introduced in our procedure (post-calibration for each RASSS and probe) was enough to make the data intercomparable between different instruments. Even if the instruments used in our study were manufactured by the same company, minor differences in their optics affected the fluorescence results, and thus the post-calibration corrections should be added to the algorithms.

2.5.3 Chlorophyll a concentration prediction models

We developed two novel simple algorithms to predict total and cyanobacterial Chl *a* concentration based on *in vivo* fluorescence to be used with multiple handheld

fluorometers. We developed algorithms fitting two models based on data from single and mixed cultures (algae and cyanobacteria) to mimic the realistic partitioning of Chl *a* concentrations of natural phytoplankton. Our algorithms have the strength of being easy to implement and modified by the user. Further, the algorithms are adaptable to two-channel low-cost fluorometers, including self-assembled ones. Other models that differentiate between cyanobacterial and eukaryotic Chl *a* based on fluorescence have been previously proposed but using tabletop spectrofluorometer (Lee et al., 1995), or costly probes like the Algaetorch or the Fluoroprobe (Beutler et al. 2003). In this work, we extend the application of the method developed by Lee et al. (1995), modifying several steps in the methodological approach. Main improvements in our method in comparison to Lee et al (1995) are: 1- the use of multiple fluorometers, a crucial aspect for the implementation of monitoring methods; 2- the use of more parsimonious algorithms (allowing total and cyanobacterial Chl *a* estimation); 3- the modeling of major optical interferences, an aspect poorly addressed in the literature (usually only one effect studied, CDOM or turbidity); and 4- the relevant range of Chl *a* concentrations (0 - 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) where the model has a good prediction capacity, becoming useful for early cyanobacteria warnings.

WHO guides for cyanobacteria monitoring in recreational water are based on total phytoplankton chlorophyll *a* and cyanobacterial cell abundance and biovolume (Chorus & Bartram 1999). Our model can complement this approach because it predicts total chl *a* as well as cyanobacterial chl *a* concentrations. Some fluorometers are configured to detect and quantify phytoplankton groups and cyanobacterial biomass, as the series of high performance bbe Moldaenke fluorometers (i.e.: AOA, Fluoroprobe and Algaetorch) (Beutler et al. 2002, 2003). However, high cost and the dependence on the manufacturer for calibration (Pires and Deltares 2010), limit the routine use of this kind of instrument in developing countries and in large scale monitoring programs. Our low-cost alternative models are the first developed to be used with simultaneously multiple fluorometers and ready to be implemented in monitoring programs. A cross-calibration between several fluorometers of the same model has been reported only for marine Chl *a* fluorescence profiles with a one channel instrument (Guinet et al. 2013; Xing et al. 2014). Our model is innovative since it is applicable to freshwater and estuarine waters and it was developed with a two-channel instrument.

In vivo pigment fluorescence has to be transformed into a phytoplankton and/or cyanobacteria biomass indicator for monitoring purposes. Total cyanobacteria cell abundance and biovolume and phytoplankton chlorophyll *a* are among the most used quantitative bioindicators (Chorus and Bartram 1999). To develop our models, we selected Chl *a* as the bioindicator because is the universal photosynthetic pigment in phytoplankton; the best indicator tied to pigment fluorescence; widely implemented in monitoring programs; and finally, because our models discriminate between total and cyanobacterial Chl *a*. By applying our models is possible to easily determine changes in the proportion of cyanobacteria in the total phytoplankton, which can be an early warning of a future bloom. Other biomass indicators show limitations that also favors the use of Chl *a*. For instance, the use of extracted C-PC, as a cyanobacterial biomass indicator, have contradictory results in fluorometry (Kong et al. 2014; Kasinak et al. 2015; Macário et al. 2015), and does not give information about the proportion of cyanobacteria in the total phytoplankton biomass. Biovolume is the most accurate indicator of phytoplankton biomass, although is highly variable between main phylogenetic groups (Reynolds 1984), and does not always correlate well with pigment *in vivo* fluorescence (Álvarez et al. 2017). For instance, chl *a*/biovolume ratios (both extracted and *in vivo*) are highly variable between phylogenetic algal clades, like chlorophytes and red line groups (diatoms and dinoflagellates) (Catherine et al. 2012; Deblois et al. 2013). Besides, cyanobacteria cell volume span more than 2 orders of magnitude, while organism volume (cells, colonies and filaments) spans 11 orders of magnitude (Beardall et al. 2009; Edwards et al. 2012), which significantly affects pigment cellular package and *in vivo* fluorescence response. In consequence, cyanobacteria cell abundance poorly correlates with biovolume, pigment concentration or with toxin concentration (Chorus and Bartram 1999; Kong et al. 2014; Macário et al. 2015). Although chl *a* concentration can vary with organism volume, the selection of this bioindicator, to transform our *in vivo* fluorescence signals, is a good compromise to generate a reliable quantitative indicator of cyanobacteria and algae.

2.5.4 Optical interferences

CDOM contributed significantly to generate background fluorescence only in the Chl *a* channel, suggesting that the detection of cyanobacteria is less affected by CDOM than that of eukaryotic algae. We found a small interference effect for cyanobacterial Chl *a* ($< 2.5 \mu\text{g L}^{-1}$), given the lower CDOM fluorescence in the C-PC channel (Fellman et al.

2010). We suggest two alternative corrections to remove the CDOM interference in the fluorescence signals: 1- to directly subtract the fluorescence measured in the filtered water from the pigment fluorescence data, or 2- to calculate the final Chl *a* concentration by applying an algorithm based on a CDOM concentration proxy (absorbance 440 nm or UV fluorescence). Some studies have corrected the CDOM interference on pigment fluorescence in freshwaters by the two options mentioned above, directly subtracting filtered water $F_{\text{Chl } a}$ (Carlson and Shapiro 1981; Keller et al. 1990), and indirectly adding a CDOM-proportional parameter to the Chl *a* prediction algorithm (Ferreira et al. 2012). Since both of these options can increase complexity and costs of field work, the Forel-Uie scale of a water color could be applied to visually estimate the CDOM (Novoa et al. 2014), as a simple and affordable procedure. Most of the published methods do not include any correction to the fluorescence generated by natural CDOM. In our dataset the background Chl *a* added by the CDOM effect was up to $11 \mu\text{g L}^{-1}$, which is in the same order of magnitude of the modeled Chl *a* concentration for some natural ecosystems (i.e.: Elbe river: $\sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$, and Pawcatuck river: $6.87 \mu\text{g L}^{-1}$, Beutler et al. 2000 and Keller et al., 1990, respectively) but lower to the values found in Minnesota high-CDOM forest lakes (Carlson and Shapiro 1981). Background Chl *a* detected in our study falls within WHO guides for cyanobacterial risk exposition in recreational waters (chlorophyll *a*: 1, 10 and $50 \mu\text{g L}^{-1}$, low, moderate and high risk, respectively) (Chorus and Bartram 1999). In consequence, the CDOM effect can be important in the final predicted Chl *a* concentration, and those models without algorithms to remove the CDOM effect can result in false signals of high risk of exposition to cyanobacteria. This interference is also particularly relevant for monitoring phytoplankton in floodplain rivers since the rainfall regime could substantially change the CDOM content in short time (Teixeira et al. 2011).

Our results showed a linear response between fluorescence and tested CDOM concentrations $< 0.1 \text{ AU}_{440\text{nm}}$ or an absorption coefficient at 440 nm of 20 m^{-1} . The non linearity of this trend above $0.1 \text{ AU}_{440\text{nm}}$ could respond to the exponential relation of absorbance to transmittance, and thus, to the excitation (and emission) light intensity. At $0.5 \text{ AU}_{440\text{nm}}$, 44% of the 440 nm excitation light is absorbed in 0.5 cm (half of the cuvette width), which roughly corresponded to the $50.8 \pm 10.1\%$ reduction of the *C. raciborskii* (cyanobacteria) and *S. capricornutum* (chlorophyte) *in vivo* Chl *a* fluorescence in the high CDOM ($\sim 0.5 \text{ AU}_{440\text{nm}}$) treatment (Table 2.9). Conversely, the

low interference found in the *in vivo* C-PC channel responded to the low CDOM absorption and fluorescence at ~600 nm, explaining the lack of slope change and small background addition in the modeled cyanobacterial Chl *a*.

Our experimental results demonstrated that turbidity had a higher effect on predicted cyanobacteria Chl *a* and a similar effect on total Chl *a* than CDOM. Kaolinite solution probably affected the C-PC fluorescence by scattering the excitation light to the detector, since the excitation and the emission wavelengths of C-PC slightly overlap. Thus, part of the scattered excitation light could be redirected to the emission measurement slit, resulting in a background fluorescence signal. Fluorescence probes had different responses to turbidity depending on their specific optical configuration (Zamyadi et al. 2016). Some probes showed a positive trend in background fluorescence with increasing turbidity (Yoshida et al. 2011; Chang et al. 2011), while others showed an opposite trend per Chl *a* slope (Beutler et al. 2002; Brient et al. 2008; Zamyadi et al. 2012), independently of the type of sediment (kaolinite, bentonite or sand). The fluorometers used in our study had the former type of effect, consisting in an increase of basal fluorescence proportional to the turbidity concentration in both channels (although of small magnitude). Optical geometry configuration differences between instruments can explain a variable response to turbidity.

In our study the magnitude of the kaolinite effect on fluorescence mimics well the natural effect of fluvial turbidity. Sand resuspension, due to wind action, is a common factor for high turbidity in floodplain rivers, including the coastal waters of the Río de la Plata (Marcelo Acha et al. 2008), although sand has a small effect on pigment fluorescence (Brient et al. 2008). Other types of NAP (non algal particles) may also affect instrumental fluorescence measures (Gilerson et al. 2007). Further studies are needed to isolate the effects of different sediment types of fluvial-estuarine environments on pigment fluorescence.

Turbidity and CDOM effects mainly contribute independently to background Chl *a* measurements. There was a significant interaction between the effects of CDOM and turbidity on the predicted/measured Chl *a* slopes and the intercept (basal predicted Chl *a*), but the magnitude of such interaction was very low and it could be attributed to the non linear CDOM effect. Instruments provided with an optical geometry insensitive to

scattering (turbidity), or with a turbidity sensor, and an additional CDOM fluorescence channel can significantly improve the measurement reliability in field samples without relying on additional instruments or sample manipulation (filtering, turbidimeter, etc.).

2.5.5 Prediction of field phytoplankton and cyanobacteria chl a

The model was tested in a wide range of environments without operational constraints, reinforcing its simplicity and readiness to be implemented in monitoring programs. The overall result of the field samples test was satisfactory (by R^2 and RMSE values). Although optical interferences due to CDOM and turbidity were not addressed in field samples, we can infer that the fitted intercept indicated a background Chl *a* due to a CDOM effect. Samples from the fluvial region showed a slope higher than the theoretical 1:1, probably due to the phytoplankton composition, while samples from the marine region showed a very low goodness of fit. More data covering the range between 10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Chl *a*, isolating the CDOM and turbidity effects are needed to gain understanding of the model performance on the field.

2.6 Final remarks

In summary, we present a new, simple quantitative model that contributes to bridge the gap between the use of pigment *in vivo* fluorescence for research purposes and its implementation in low-cost monitoring programs. Seven instruments were successfully cross-calibrated with a solid standard and using different culture dilutions. For data inter-comparison, individual fluorometer coefficients should be used for post-calibration corrections. A set of multiple linear models based on the Chl *a* and C-PC *in vivo* fluorescence can accurately quantify and discriminate total and cyanobacteria Chl *a* concentration. Interference from CDOM and turbidity can be addressed by the addition of appropriate algorithms. Our models show great potential for low-cost monitoring of water bodies.

2.7 References

- Ahn, C.-Y., S.-H. Joung, S.-K. Yoon, and H.-M. Oh. 2007. Alternative alert system for cyanobacterial bloom, using phycocyanin as a level determinant. *J. Microbiol.* **45**: 98–104.
- Álvarez, E., E. Nogueira, and Á. López-Urrutia. 2017. In-vivo single-cell fluorescence and the size-scaling of phytoplankton chlorophyll content. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.03317-16. doi:10.1128/AEM.03317-16
- Andersen, R. A. 2005. *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press.
- Beardall, J., D. Allen, J. Bragg, and others. 2009. Allometry and stoichiometry of unicellular, colonial and

- multicellular phytoplankton. *New Phytol.* **181**: 295–309. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02660.x
- Beutler, M., K. H. Wiltshire, M. Arp, J. Kruse, C. Reineke, C. Moldaenke, and U.-P. Hansen. 2003. A reduced model of the fluorescence from the cyanobacterial photosynthetic apparatus designed for the in situ detection of cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1604**: 33–46. doi:10.1016/S0005-2728(03)00022-7
- Beutler, M., K. H. Wiltshire, C. Lüring, and C. Moldaenke. 2000. Fluorometric depth-profiling of chlorophyll corrected for yellow substances. Poster Sess. Present. ASLO 2000, Copenhagen, Denmark. June 5-9.
- Beutler, M., K. H. Wiltshire, B. Meyer, C. Moldaenke, C. Lüring, M. Meyerhöfer, U.-P. Hansen, and H. Dau. 2002. A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynth. Res.* **72**: 39–53. doi:10.1023/A:1016026607048
- Breusch, T. S., and A. R. Pagan. 1979. A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. *Econometrica* **47**: 1287–1294. doi:10.2307/1911963
- Brient, L., M. Lengronne, E. Bertrand, and others. 2008. A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies. *J. Environ. Monit.* **10**: 248–255. doi:10.1039/B714238B
- Cade, B. S., and B. R. Noon. 2003. A Gentle Introduction to Quantile Regression for Ecologists. *Front. Ecol. Environ.* **9295**. doi:10.1890/1540-9295(2003)001
- Carlson, R. E., and J. Shapiro. 1981. Dissolved humic substances: A major source of error in fluorometric analyses involving lake waters. *Limnology Oceanogr.* **26**: 785–790. doi:10.4319/lo.1981.26.4.0785
- Catherine, A., N. Escoffier, A. Belhocine, A. B. Nasri, S. Hamlaoui, C. Yéprémian, C. Bernard, and M. Troussellier. 2012. On the use of the FluoroProbe®, a phytoplankton quantification method based on fluorescence excitation spectra for large-scale surveys of lakes and reservoirs. *Water Res.* **46**: 1771–84. doi:10.1016/j.watres.2011.12.056
- Chang, D.-W., P. Hobson, M. Burch, and T.-F. Lin. 2011. The limitation of measurement in cyanobacteria using in vivo fluoroscopy. Seventh Int. Conf. Intell. Sensors, Sens. Networks Inf. Process. 184–188. doi:10.1109/ISSNIP.2011.6146614
- Chorus, I. 2012. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries, I. Chorus [ed.]. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt).
- Chorus, I., and J. Bartram. 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management., E & FN Spon.
- Deblois, C. P., A. Marchand, and P. Juneau. 2013. Comparison of Photoacclimation in Twelve Freshwater Photoautotrophs (Chlorophyte, Bacillaryophyte, Cryptophyte and Cyanophyte) Isolated from a Natural Community. *PLoS One* **8**. doi:10.1371/journal.pone.0057139
- Dong, Y., X. Liu, L. Mei, C. Feng, C. Yan, and S. He. 2014. LED-induced fluorescence system for tea classification and quality assessment. *J. Food Eng.* **137**: 95–100. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.03.027
- Dunn, P. K., and G. K. Smyth. 1996. Randomized Quantile Residuals. *J. Comput. Graph. Stat.* **5**: 236. doi:10.2307/1390802
- Edwards, K. F., M. K. Thomas, C. A. Klausmeier, and E. Litchman. 2012. Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **57**: 554–566. doi:10.4319/lo.2012.57.2.0554
- Fellman, J. B., E. Hood, and R. G. M. Spencer. 2010. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnol. Oceanogr.* **55**: 2452–2462. doi:10.4319/lo.2010.55.6.2452
- Ferreira, R. D., C. C. F. Barbosa, and E. M. L. de M. Novo. 2012. Assessment of *in vivo* fluorescence method for chlorophyll *a* estimation in optically complex waters (Curuai floodplain, Pará - Brazil). *Acta Limnol. Bras.* **24**: 373–386. doi:10.1590/S2179-975X2013005000011
- Ghadouani, A., and R. E. H. Smith. 2005. Phytoplankton Distribution in Lake Erie as Assessed by a New in situ Spectrofluorometric Technique. *J. Great Lakes Res.* **31**: 154–167. doi:10.1016/S0380-1330(05)70311-7
- Gilerson, A., J. Zhou, S. Hlaing, I. Ioannou, J. Schalles, B. Gross, F. Moshary, and S. Ahmed. 2007.

- Fluorescence component in the reflectance spectra from coastal waters. Dependence on water composition. *Opt. Express* **15**: 15702–15721. doi:10.1364/oe.15.015702
- Gregor, J., and B. Marsálek. 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Res.* **38**: 517–22. doi:10.1016/j.watres.2003.10.033
- Guinet, C., X. Xing, E. Walker, and others. 2013. Calibration procedures and first dataset of Southern Ocean chlorophyll a profiles collected by elephant seals equipped with a newly developed CTD-fluorescence tags. *Earth Syst. Sci. Data* **5**: 15–29. doi:10.5194/essd-5-15-2013
- Helms, J. R., A. Stubbins, J. D. Ritchie, and E. C. Minor. 2008. Absorption spectral slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* **53**: 955–969. doi:10.4319/lo.2010.55.6.2452
- Hoef-Emden, K. 2008. Molecular phylogeny of phycocyanin-containing cryptophytes: Evolution of biliproteins and geographical distribution. *J. Phycol.* **44**: 985–993. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00530.x
- Ibelings, B. W., J. M. Stroom, M. Lüring, and W. E. A. Kardinaal. 2012. Netherlands: Risks of toxic cyanobacterial blooms in recreational waters and guidelines, p. 82–96. *In* Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries.
- International Standard Organization. 2005. ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. *Int. Stand.* **2005**: 1–36. doi:10.1109/IEEESTD.2015.7106438
- Izidorczyk, K., C. Carpentier, J. Mrówczyński, A. Wagenvoort, T. Jurczak, and M. Tarczyńska. 2009. Establishment of an Alert Level Framework for cyanobacteria in drinking water resources by using the Algae Online Analyser for monitoring cyanobacterial chlorophyll a. *Water Res.* **43**: 989–96. doi:10.1016/j.watres.2008.11.048
- Kasinak, J.-M. E., B. M. Holt, M. F. Chislock, and A. E. Wilson. 2015. Benchtop fluorometry of phycocyanin as a rapid approach for estimating cyanobacterial biovolume. *Water Res.* **13**: 455–463. doi:10.1039/c0em00163e
- Keller, A. A., L. L. Beatty, L. E. Weber, and C. A. Heil. 1990. Soluble Fluorescence: Effects on Chlorophyll Determination at Different Salinities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47**: 1700–1709. doi:10.1139/f90-195
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, University Press, Cambridge.
- Kong, Y., I. Lou, Y. Zhang, C. U. Lou, and K. M. Mok. 2014. Using an online phycocyanin fluorescence probe for rapid monitoring of cyanobacteria in Macau freshwater reservoir. *Hydrobiologia* **741**: 33–49. doi:10.1007/s10750-013-1759-3
- Koreivienė, J., O. Anne, J. Kasperovičienė, and V. Burškytė. 2014. Cyanotoxin management and human health risk mitigation in recreational waters. *Environ. Monit. Assess.* **186**: 4443–59. doi:10.1007/s10661-014-3710-0
- Lee, T. yun, M. Tsuzuki, T. Takeuchi, K. Yokoyama, and I. Karube. 1995. Quantitative determination of cyanobacteria in mixed phytoplankton assemblages by an in vivo fluorimetric method. *Anal. Chim. Acta* **302**: 81–87. doi:10.1016/0003-2670(94)00425-L
- Lorenzen, C. J. 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* **13**: 223–227. doi:10.1016/0011-7471(66)91102-8
- Macário, I. P. E., B. B. Castro, M. I. S. Nunes, S. C. Antunes, C. Pizarro, C. Coelho, F. Gonçalves, and D. R. de Figueiredo. 2015. New insights towards the establishment of phycocyanin concentration thresholds considering species-specific variability of bloom-forming cyanobacteria. *Hydrobiologia* **757**: 155–165. doi:10.1007/s10750-015-2248-7
- Marcelo Acha, E., H. Mianzan, R. Guerrero, J. Carreto, D. Giberto, N. Montoya, and M. Carignan. 2008. An overview of physical and ecological processes in the Rio de la Plata Estuary. *Cont. Shelf Res.* **28**: 1579–1588. doi:10.1016/j.csr.2007.01.031
- McKnight, D. M., E. W. Boyer, P. K. Westerhoff, and others. 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* **46**: 38–48. doi:10.4319/lo.2001.46.1.0038
- Millie, D. F., O. M. E. Schofield, G. J. Kirkpatrick, G. Johnsen, and T. J. Evens. 2002. Using absorbance and fluorescence spectra to discriminate microalgae. *Eur. J. Phycol.* **37**: 313–322.

doi:10.1017/S0967026202003700

- Nelson, N. B., and D. a Siegel. 2013. The global distribution and dynamics of chromophoric dissolved organic matter. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **5**: 447–76. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100751
- Novoa, S., M. R. Wernand, and H. J. van der Woerd. 2014. The modern Forel-Ule scale: A “do-it-yourself” colour comparator for water monitoring. *J. Eur. Opt. Soc.* **9**: 14025. doi:10.2971/jeos.2014.14025
- Paerl, H. W., and T. G. Otten. 2013. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb. Ecol.* **65**: 995–1010. doi:10.1007/s00248-012-0159-y
- Pires, M. D., and Deltares. 2010. Evaluation of fluorometers for the in situ monitoring of chlorophyll and/or cyanobacteria. Report prepared for DELTARES. Delft, Netherlands.
- Poole, M. A., and P. N. O’Farrell. 1971. The Assumptions of the Linear Regression Model. *Trans. Inst. Br. Geogr.* **52**: 145–158. doi:10.2307/621706
- R Core Team. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Reynolds, C. S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*, University Press, Cambridge.
- Seetohul, L. N., M. Islam, W. T. O’Hare, and Z. Ali. 2006. Discrimination of teas based on total luminescence spectroscopy and pattern recognition. *J. Sci. Food Agric.* **86**: 2092–2098. doi:10.1002/jsfa.2578
- Seppälä, J., P. Ylöstalo, S. Kaitala, S. Hällfors, M. Raateoja, and P. Maunula. 2007. Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **73**: 489–500. doi:10.1016/j.eess.2007.02.015
- Teixeira, M. C., J. C. R. de Azevedo, and T. A. Pagioro. 2011. Spatial and seasonal distribution of chromophoric dissolved organic matter in the Upper Paraná River floodplain environments (Brazil). *Acta Limnol. Bras.* **23**: 333–343. doi:10.1590/S2179-975X2012005000011
- Van Der Weij-De Wit, C. D., A. B. Doust, I. H. M. Van Stokkum, J. P. Dekker, K. E. Wilk, P. M. G. Curmi, G. D. Scholes, and R. Van Grondelle. 2006. How energy funnels from the phycoerythrin antenna complex to photosystem I and photosystem II in cryptophyte rhodomonas CS24 cells. *J. Phys. Chem. B* **110**: 25066–25073. doi:10.1021/jp061546w
- Xing, X., H. Claustre, S. Blain, and others. 2014. Quenching correction for in vivo chlorophyll fluorescence acquired by autonomous platforms: A case study with instrumented elephant seals in the Kerguelen region (Southern Ocean). *Limnol. Oceanogr.* **10**: 483–495. doi:10.4319/lom.2012.10.483
- Ye, L., Q. Cai, M. Zhang, and L. Tan. 2014. Real-time observation, early warning and forecasting phytoplankton blooms by integrating in situ automated online sondes and hybrid evolutionary algorithms. *Ecol. Inform.* **22**: 44–51. doi:10.1016/j.ecoinf.2014.04.001
- Yoshida, M., T. Horiuchi, and Y. Nagasawa. 2011. In situ multi-excitation chlorophyll fluorometer for phytoplankton measurements: Technologies and applications beyond conventional fluorometers. *Proceedings of the OCEANS 2011*. MTS/IEEE. 1–4.
- Zamyadi, A., F. Choo, G. Newcombe, R. Stuetz, and R. K. Henderson. 2016. A review of monitoring technologies for real-time management of cyanobacteria: Recent advances and future direction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **85**: 83–96. doi:10.1016/j.trac.2016.06.023
- Zamyadi, A., N. McQuaid, S. Dorner, D. F. Bird, M. Burch, P. Baker, P. Hobson, and M. Prévost. 2012. Cyanobacterial detection using in vivo fluorescence probes: Managing interferences for improved decision-making. *J. Am. Water Works Assoc.* **104**: 466–480. doi:10.5942/jawwa.2012.104.0114

2.8 Tables and Figures

Table 2.1: List of abbreviations used in this study.

Abbreviation	Units	Meaning
F_{C-PC}	R.F.U.	<i>In vivo</i> phycocyanin fluorescence, channel A, as reported by Aquafluor (Turner) fluorometers
$F_{Chl a}$	R.F.U.	<i>In vivo</i> chlorophyll <i>a</i> fluorescence, channel B, as reported by Aquafluor (Turner) fluorometers
F^*	R.F.U. (%)	Fluorescence (F_{C-PC} or $F_{Chl a}$) corrected for $F^* = \frac{(\%Std - \%Blk)}{StdVal}$ (as % of saturation intensity)
F^{**}	R.F.U.	F^* corrected by a post-calibration factor for each fluorometer (as % of saturation intensity)
$\%Std$	%	Calibration value stored by the fluorometer as a percentage of saturation intensity
$\%Blk$	%	Blank value stored by the fluorometer as a percentage of saturation intensity
$StdVal$	-	Assigned value to the calibration range in fluorometers
-	R.F.U.	Relative Fluorescence Units
-	AU _{440nm}	Absorbance units at 440nm
-	NTU	Natural Turbidity Units
$Chl a$		Chlorophyll <i>a</i>
$[Chl a]$	$\mu g L^{-1}$	Chlorophyll <i>a</i> concentration calculated by analytical method, extraction in ethanol 90% following spectrophotometry or fluorometry methods
$[Chl a_{cyano}]$	$\mu g L^{-1}$	Cyanobacterial fraction of chlorophyll <i>a</i> concentration
$[Chl a]_{fluor}$, $[Chl a_{cyano}]_{fluor}$	$\mu g L^{-1}$	Predicted total or cyanobacterial chlorophyll <i>a</i> concentration according to: $[Chl a]_{fluor} (\mu g L^{-1}) = A F^{**}_{C-PC} + B F^{**}_{Chl a}$
C-PC	-	Phycocyanin
PSI	-	Photosystem I
PSII	-	Photosystem II
RASSS	-	Red Adjustable Solid Secondary Standard

Table 2.2: Strains used in this study. UdelaR: Universidad de la República, Uruguay.

Strain	Origin	Classification	Cellular organization
<i>Cyanobium</i> spp. MVCC22*†	Facultad de Ciencias, UdelaR	Cyanobacteria (Synechococcales)	Unicellular
<i>Microcystis aeruginosa</i> CPCC 299†	Canadian phycological culture collection (CPCC)	Cyanobacteria (Chroococcales)	Unicellular/ Colonial
<i>Planktothrix agardhii</i> MVCC11*†	Facultad de Ciencias, UdelaR	Cyanobacteria (Oscillatoriales)	Filamentous
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> MVCC35*	Facultad de Ciencias, UdelaR	Cyanobacteria (Nostocales)	Filamentous
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> B2246*	UTEX (University of Texas)	Chlorophyta	Unicellular
<i>Selenastrum capricornutum</i> *‡	Intendencia de Montevideo	Chlorophyta	Unicellular/ Small colonies
<i>Scenedesmus obliquus</i> CPCC5†	Canadian phycological culture collection (CPCC)	Chlorophyta	Unicellular/ Small colonies
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CPCC162†	Canadian phycological culture collection (CPCC)	Bacillariophyta	Unicellular

* Cultured in Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

† Cultured in Laboratoire d'Analyses Environnementales, Université de Sherbrooke, Canada

‡ Unspecified strain

Table 2.3: Calibration parameters for each instrument calibrated with the reference standard (# 0815) (above) and with the individual solid standard of each instrument (below) and the post-calibration factors, showing mean \pm standard deviation, with median between brackets.

Fluorometer (Standard#)	%Std (C-PC)	%Blk (C-PC)	%Std (Chl <i>a</i>)	%Blk (Chl <i>a</i>)	n	Relative post-calibration factors (C-PC)	Relative post-calibration factors (Chl <i>a</i>)
DINAMA (0815)*	6.102	0.265	31.076	0.151	15	-	-
Colonia (0815)	12.402	0.178	19.38	0.132	15	0.93 \pm 0.20 (0.92)	0.84 \pm 0.05 (0.82)
San José (0815)	13.104	0.208	25.738	0.133	15	0.82 \pm 0.11 (0.84)	0.98 \pm 0.08 (0.98)
Montevideo (0815)	5.724	0.284	21.13	0.131	15	0.92 \pm 0.126 (0.97)	0.87 \pm 0.05 (0.85)
Canelones (0815)	2.611	0.146	24.155	0.144	15	0.81 \pm 0.15 (0.82)	0.94 \pm 0.11 (0.92)
Maldonado (0815)	2.604	0.223	31.894	0.158	15	0.78 \pm 0.16 (0.78)	0.91 \pm 0.07 (0.89)
Rocha (0815)	3.814	0.154	26.124	0.128	15	0.80 \pm 0.13 (0.83)	0.96 \pm 0.08 (0.97)
DINAMA (1411-1)*	4.313	0.264	29.28	0.085	27	1.00 \pm 0.04 (1.00)	1.00 \pm 0.02 (1.000)
Colonia (1411-2)	6.808	0.161	13.875	0.085	27	1.02 \pm 0.21 (0.97)	0.85 \pm 0.09 (0.82)
San José (1411-3)	10.91	0.192	20.712	0.078	27	0.90 \pm 0.07 (0.90)	0.97 \pm 0.06 (0.97)
Montevideo (1411-4)	5.491	0.267	22.891	0.077	27	1.04 \pm 0.23 (1.00)	0.93 \pm 0.20 (0.88)
Canelones (1411-5)	2.278	0.135	25.923	0.084	27	0.83 \pm 0.05 (0.82)	0.95 \pm 0.08 (0.93)
Maldonado (1411-6)	2.546	0.201	29.285	0.104	27	0.79 \pm 0.04 (0.78)	0.96 \pm 0.17 (0.90)
Rocha (1411-7)	3.376	0.145	24.474	0.077	27	0.89 \pm 0.06 (0.87)	1.04 \pm 0.13 (1.01)
DINAMA (0815)	3.989	0.245	23.819	0.069	27	1.03 \pm 0.05 (1.02)	1.20 \pm 0.38 (1.05)

* Reference set

Table 2.4: Chlorophyll *a* concentration of each strain used in single- and mixed species experiments. Left: *M. aeruginosa* CPCC299 x *S. obliquus* CPCC5. Right: *M. aeruginosa* CPCC299 x *P. tricornutum* CPCC162.

<i>M. aeruginosa</i> CPCC299 ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	<i>S. obliquus</i> CPCC5 ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	Mix ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	<i>M. aeruginosa</i> CPCC299 ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	<i>P. tricornutum</i> CPCC162 ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	Mix ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)
0	0	0	0	0	0
5.2	0	5.2	4.5	0	4.5
10.5	0	10.5	9.1	0	9.1
26.2	0	26.2	22.6	0	22.6
52.4	0	52.4	45.3	0	45.3
0	8.1	8.1	0	4.8	4.8
5.2	8.1	13.4	4.5	4.8	9.3
10.5	8.1	18.6	9.1	4.8	13.8
26.2	8.1	34.3	22.6	4.8	27.4
0	16.2	16.2	0	9.6	9.6
5.2	16.2	21.5	4.5	9.6	14.1
10.5	16.2	26.7	9.1	9.6	18.6
26.2	16.2	42.4	22.6	9.6	32.2
0	40.6	40.6	0	24	24
5.2	40.6	45.8	4.5	24	28.5
10.5	40.6	51.1	9.1	24	33
26.2	40.6	66.8	22.6	24	46.6
0	81.2	81.2	0	48	48

Table 2.5: Chlorophyll *a* concentration of strain used in multiple- and mixed species experiments.

<i>M. aeruginosa</i> CPCC299 + <i>P. agardhii</i> MVCC11 (1:1) ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	<i>S. obliquus</i> CPCC5 + <i>P. tricornutum</i> CPCC162 (1:1) ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	Mix ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)
0	0	0
9	0	9
18.1	0	18.1
45.2	0	45.2
90.4	0	90.4
0	11.6	11.6
9	11.6	20.6
18.1	11.6	29.7
45.2	11.6	56.8
0	23.2	23.2
9	23.2	32.2
18.1	23.2	41.3
45.2	23.2	68.4
0	58	58
9	58	67.1
18.1	58	76.1
45.2	58	103.2
0	116	116
<i>M. aeruginosa</i> CPCC299	101.7	101.7
<i>P. agardhii</i> MVCC11	98.6	98.6
<i>S. obliquus</i> CPCC5	134.1	134.1
<i>P. tricornutum</i> CPCC162	115.6	115.6

Table 2.6: Prediction intervals for total and specific chlorophyll *a* prediction models based on *in vivo* fluorescence. Prediction intervals were estimated as 5% and 95% quantile linear multiple regressions with the form : $[\text{Chl } a] (\mu\text{g L}^{-1}) = A F^{**}_{\text{C-PC}} + B F^{**}_{\text{Chl } a}$ based on chlorophyll *a* concentrations < 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=350) excluding *Cyanobium* spp. MVCC22.

	Prediction limit models	Intercept ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	$F^{**}_{\text{C-PC}}$ slope (R.F.U./ $\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	$F^{**}_{\text{Chl } a}$ slope (R.F.U./ $\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)
[Chl <i>a</i>] _{fluor}	95%	0.375	69.097	14.687
	5%	-0.876	29.698	9.079
[Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor}	95%	3.186	70.535	-2.732
	5%	-3.000	31.357	-1.790

Table 2.7: Optical properties of the different water matrices and strain used.

Test	Treatment	Strain used	Abs 440 nm (AU)	Turbidity (NTU)
CDOM effect	Control	<i>R. subcapitata</i>	-0.009	0
		<i>C. raciborskii MVCC35</i>	-0.002	0
	Low CDOM	<i>R. subcapitata</i>	0.056	0
		<i>C. raciborskii MVCC35</i>	0.035	0
	High CDOM	<i>R. subcapitata</i>	0.383	0
		<i>C. raciborskii MVCC35</i>	0.392	0
Turbidity effect	Control	<i>R. subcapitata</i>	-0.004	0
		<i>C. raciborskii MVCC35</i>	-0.005	0
	Low Turbidity	<i>R. subcapitata</i>	-0.009	63.7
		<i>C. raciborskii MVCC35</i>	-0.001	66.5
	High Turbidity	<i>R. subcapitata</i>	-0.003	509
		<i>C. raciborskii MVCC35</i>	0.008	517
Interaction effect	Control		-0.009	0
	CDOM		0.219	0
	Turbidity	<i>Cyanobium</i> spp. MVCC22	0.002	265
	CDOMxTurbidity		0.236	270

Table 2.8: Multiple regression models of total and cyanobacterial chlorophyll *a* concentration as a function of *in vivo* fluorescence. Only concentrations of chlorophyll *a* lower than 56.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ were selected. For modeled total chlorophyll *a* a comparison of functions with and without intercept were done (AIC criterion). Models were not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$).

Model	R ²	AIC	Parameter	Value (\pm SE)	t value	Pr(> t)
Linear model			C ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	-0.02 \pm 0.57	-0.027	0.945
total [Chl <i>a</i>] ($\mu\text{g L}^{-1}$)=	0.945	714.991	A (R.F.U./ $\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	59.9 \pm 1.6	38.209	<1x10 ⁻⁷
A F** _{C-PC} + B F** _{Chl <i>a</i>} + C			B (R.F.U./ $\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	7.97 \pm 0.25	31.917	<1x10 ⁻⁷
Linear model without intercept			A (R.F.U./ $\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	59.8 \pm 1.2	51.37	<1x10 ⁻⁷
[Chl <i>a</i>] ($\mu\text{g L}^{-1}$)=	0.985	713.140	B (R.F.U./ $\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	7.96 \pm 0.21	38.06	<1x10 ⁻⁷
A F** _{C-PC} + B F** _{Chl <i>a</i>}						
Linear model without intercept			A (R.F.U./ $\mu\text{g Chl } a_{\text{cyano}} \text{ L}^{-1}$)	62.4 \pm 1.2	50.35	<1x10 ⁻⁷
[Chl <i>a</i> _{cyano}] ($\mu\text{g L}^{-1}$)=	0.985	-	B (R.F.U./ $\mu\text{g Chl } a_{\text{cyano}} \text{ L}^{-1}$)	-2.57 \pm 0.22	-11.55	<1x10 ⁻⁷
A F** _{C-PC} + B F** _{Chl <i>a</i>}						

Table 2.9: Effect of turbidity and CDOM on modeled chlorophyll *a* [Chl *a*]_{fluor} reported as percentage.. The parameters of multiple regression models: [Chl *a*]_{fluor} = A*[Chl *a*] + B* Matrix effect (CDOM Turbidity) + C*Matrix effect * [Chl *a*], are shown.

Experiment	Parameter	Estimate	t value	Pr(> t)
CDOM effect on [Chl <i>a</i>] _{fluor} R ² =0.992	Basal [Chl <i>a</i>] _{fluor} (μg L ⁻¹)	0.85 ± 0.23	3.799	2.45x10 ⁻⁴
	[Chl <i>a</i>] _{fluor} / [Chl <i>a</i>] (%)	94.4 ± 1.2	80.671	<1x10 ⁻⁷
	CDOM basal [Chl <i>a</i>] _{fluor} (μg L ⁻¹ A.U. _{440nm} ⁻¹)	44.4 ± 1.0	44.485	<1x10 ⁻⁷
	CDOM effect on [Chl <i>a</i>] _{fluor} / [Chl <i>a</i>] (% change per AU _{440nm})	-29.9 ± 5.1	-5.826	<1x10 ⁻⁷
CDOM effect on [Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} R ² =0.993	Basal [Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} (μg L ⁻¹)	1.13 ± 0.19	5.869	<1x10 ⁻⁷
	[Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} / [Chl <i>a</i> _{cyano}] (%)	104.4 ± 1.1	96.475	<1x10 ⁻⁷
	CDOM basal [Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} (μg L ⁻¹ A.U. _{440nm} ⁻¹)	11.38 ± 0.86	13.289	<1x10 ⁻⁷
	CDOM effect on [Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} / [Chl <i>a</i> _{cyano}] (% change per AU _{440nm})	-21.1 ± 4.7	-4.45	2.13x10 ⁻⁵
Turbidity effect on [Chl <i>a</i>] _{fluor} R ² =0.981	Basal [Chl <i>a</i>] _{fluor} (μg L ⁻¹)	1.11 ± 0.26	4.275	4.24x10 ⁻⁵
	[Chl <i>a</i>] _{fluor} / [Chl <i>a</i>] (%)	71.0 ± 1.3	54.799	<1x10 ⁻⁷
	Turbidity basal [Chl <i>a</i>] _{fluor} (μg L ⁻¹ NTU ⁻¹)	0.012 ± 0.001	13.811	<1x10 ⁻⁷
	Turbidity effect on [Chl <i>a</i>] _{fluor} / [Chl <i>a</i>] (% change per NTU)	-0.005 ± 0.004	-1.275	0.205
Turbidity effect on [Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} R ² =0.989	Basal [Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} (μg L ⁻¹)	1.03 ± 0.18	5.875	<1x10 ⁻⁷
	[Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} / [Chl <i>a</i> _{cyano}] (%)	74.21 ± 0.97	76.235	<1x10 ⁻⁷
	Turbidity basal [Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} (μg L ⁻¹ NTU ⁻¹)	0.007 ± 0.001	11.798	<1x10 ⁻⁷
	Turbidity effect on [Chl <i>a</i> _{cyano}] _{fluor} / [Chl <i>a</i> _{cyano}] (% change per NTU)	-0.004 ± 0.003	-1.153	0.251

Table 2.10: Modeled total $[\text{Chl } a]_{\text{fluor}}$ and cyanobacterial $[\text{Chl } a_{\text{cyano}}]_{\text{fluor}}$ chl a per optical interference factor (tea, river water. Parameters of simple linear regression models are shown. CDOM is measured in absorption coefficient (m^{-1}) at 440 nm.

Model	Matrix	CDOM ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1} \text{ m}$)	t value	Pr(> t)	R ²
$[\text{Chl } a]_{\text{fluor}}$	Tea	0.222 ± 0.019	12	<0.05	0.88
	River water	0.355 ± 0.007	49	<0.05	0.93
$[\text{Chl } a_{\text{cyano}}]_{\text{fluor}}$	Tea	0.003 ± 0.005	0.61	0.55	0.018
	River water	0.019 ± 0.003	5.8	<0.05	0.15
		Turbidity ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1} \text{ NTU}^{-1}$)	t value	Pr(> t)	R ²
$[\text{Chl } a]_{\text{fluor}}$	Kaolinite	0.0100 ± 0.0002	45	<0.05	0.99
	River water	0.016 ± 0.002	10	<0.05	0.71
$[\text{Chl } a_{\text{cyano}}]_{\text{fluor}}$	Kaolinite	0.0048 ± 0.0002	32	<0.05	0.97
	River water	0.008 ± 0.002	4.9	<0.05	0.37

Table 2.11: Regression parameters (\pm standard errors) and RMSE (root mean square error) of predicted chlorophyll a from *in vivo* fluorescence versus extracted chlorophyll a from the different datasets tested from culture and field measurements, sections of the Río de la Plata estuarine gradient.

Data set	n	R ²	RMSE		Parameter value (\pm SE)	t value	Pr(> t)
			n	($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)			
Training data set	134	0.95	5.8	intercept ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	0.67 ± 0.47	1.4	0.15
				slope	0.806 ± 0.016	50	<0.05
All cultures data	270	0.85	6.3	intercept ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	0.97 ± 0.55	1.8	0.08
				slope	0.822 ± 0.021	38	<0.05
All field data	106	0.71	14	intercept ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	10.36 ± 0.8	13	<0.05
				slope	1.415 ± 0.089	16	<0.05
Fluvial section	54	0.95	15	intercept ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	9.01 ± 0.54	17	<0.05
				slope	2.014 ± 0.063	32	<0.05
Estuarine section	14	0.73	13	intercept ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	13.7 ± 1.6	8.7	<0.05
				slope	0.68 ± 0.12	5.7	<0.05
Marine section	38	0.36	14	intercept ($\mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$)	12.2 ± 1.5	8.4	<0.05
				slope	0.91 ± 0.2	4.5	<0.05

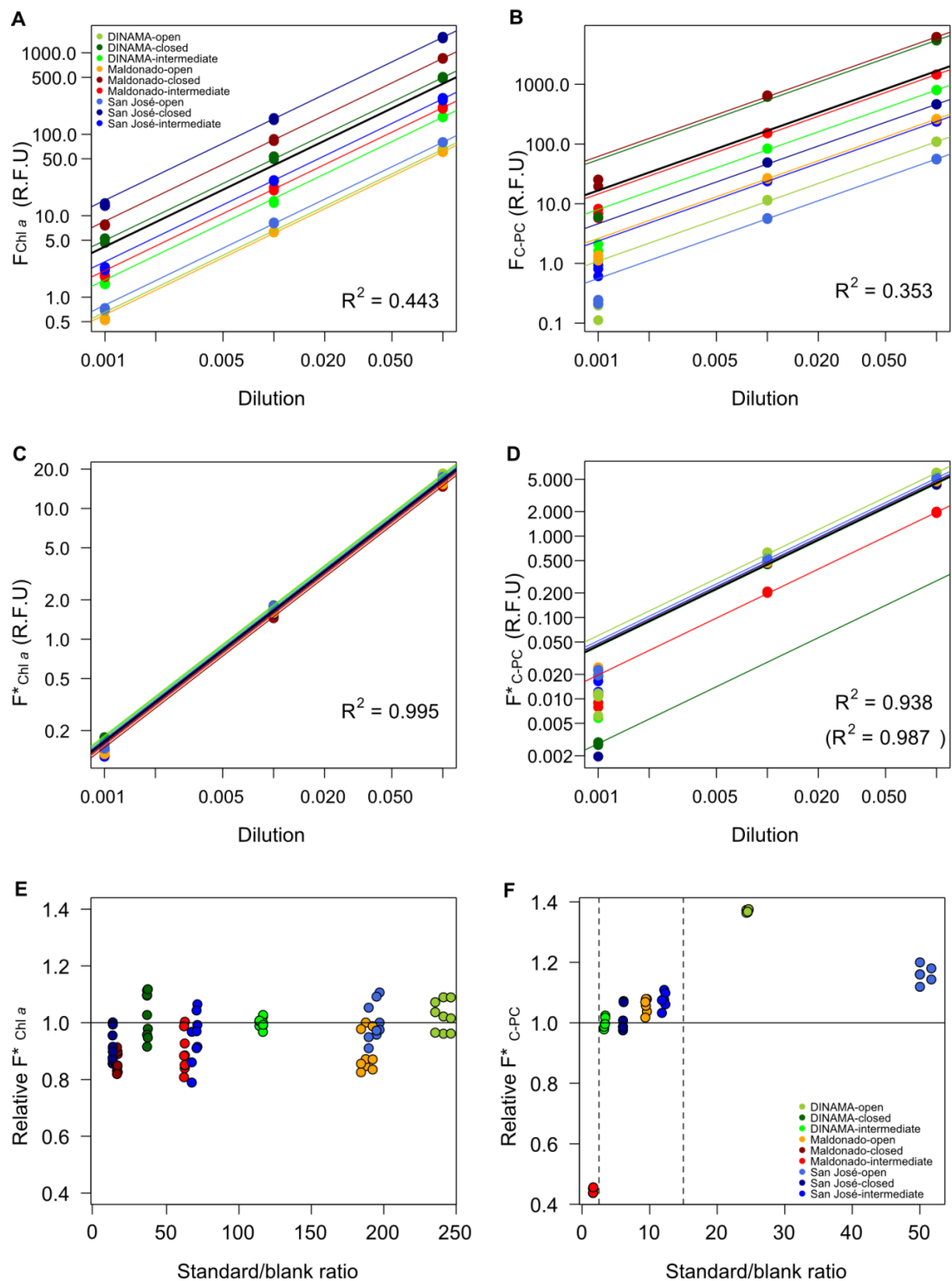


Figure 2.1: Effect of calibration correction on fluorescence values. Comparison of culture dilution *in vivo* fluorescence before and after transformation (F^*), for each fluorometer and RASSS opening combination. Dilution (A-D) indicates the dilution factor of the original stock culture. A, B: Measured fluorescence values (F). C, D: Raw fluorescence (F^*). A, C: *C. reinhardtii* B2246 chlorophyll *a* fluorescence. B, D: *Cyanobium* spp. phycocyanin fluorescence Primary colors (green, red and blue) indicate the instrument unit, while intensity of the colors showed the opening of the opening of the standard (open, intermediate, closed). For the phycocyanin raw fluorescence, the R^2 is shown in parenthesis (excluding Maldonado

probe with intermediate opening). E, F: Optimum ranges of solid standard opening. Dilution-corrected F^* (relative to DINAMA instrument calibrated with an intermediate window opening) for each combination of fluorometer and solid standard opening, vs. the %Std / %Blk, ratio. E: Phycocyanin fluorescence of MVCC22 strain and F: Chlorophyll *a* fluorescence of B2246. Black lines in panels A, B, C, D represent the linear regression line. Dotted lines in F represent the “safe range” of RASSS window opening for C-PC channel.

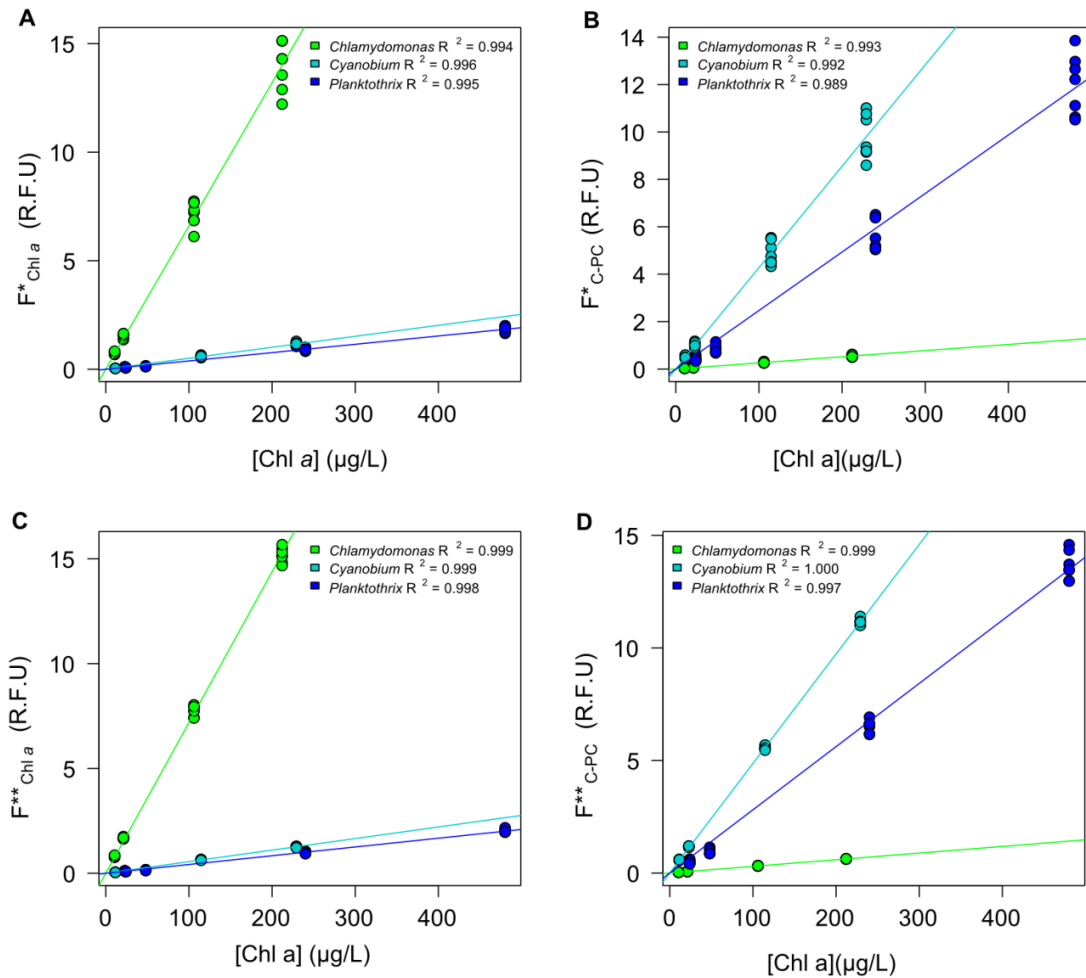


Figure 2.2: Effect of the post calibration correction by individual fluorometer factors. Raw fluorescence (F) measured with seven instruments calibrated with the reference standard (#0815) versus chlorophyll *a* concentration quantified by analytical methods. A, B: raw F^* fluorescence; C, D: F^{**} . Cyan: *Cyanobium* spp. MVCC22; blue: *P. agardii* MVCC11; green: *C. reinhardtii* B2246. A and C show the Chl *a* channel while B and D show the phycocyanin channels.

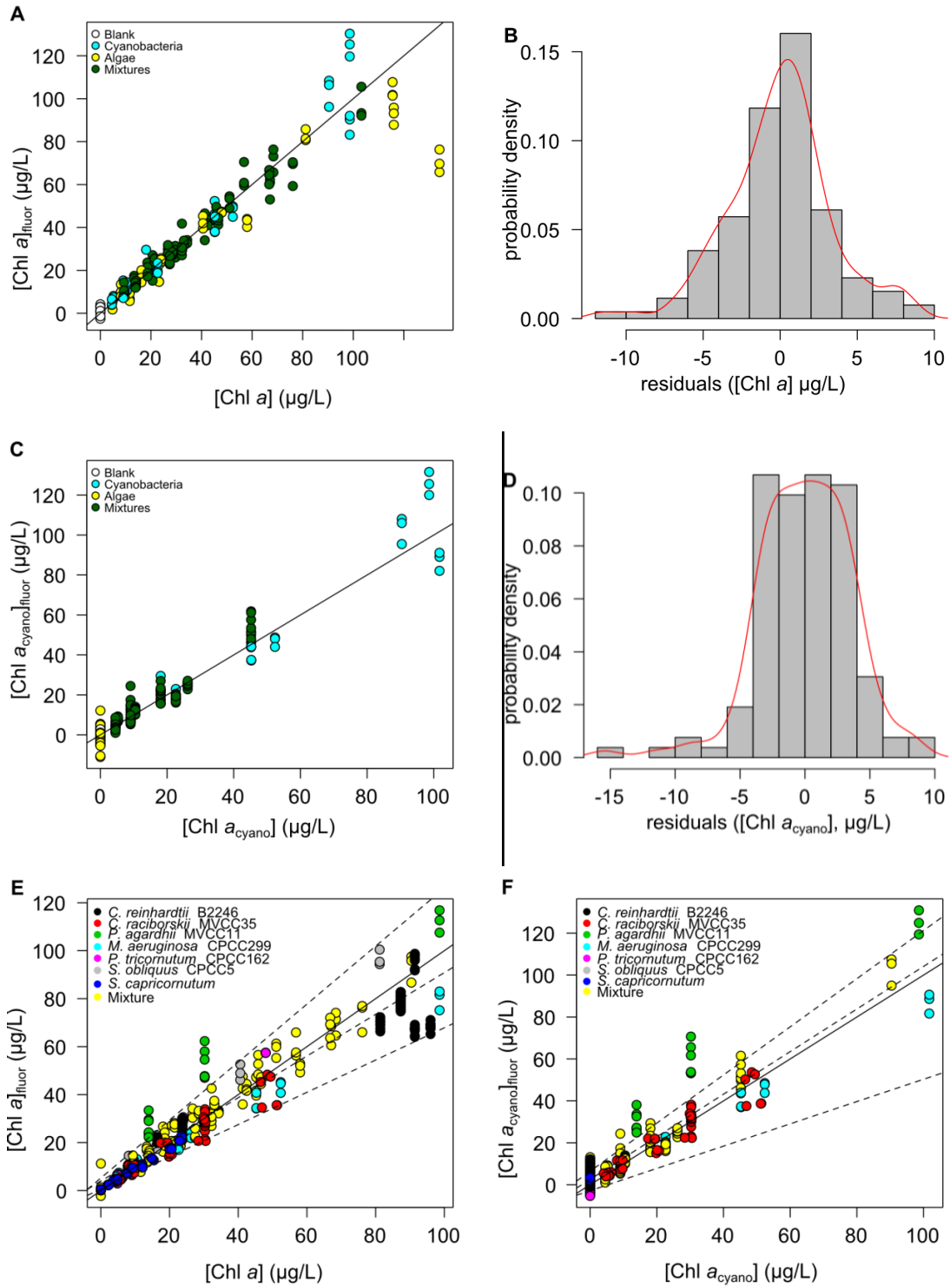


Figure 2.3: Modeled versus measured chlorophyll *a* concentrations, using the multiple regression model of *in vivo* fluorescence: $[\text{Chl } a] (\mu\text{g L}^{-1}) = A F_{\text{C-PC}}^{**} + B F_{\text{Chl } a}^{**}$. The different colors represent the composition of the sample. A) Total chlorophyll *a* prediction model; B) normal residual distribution (Shapiro-Wilk test, $W = 0.981$, $p\text{-value} = 0.06$); C) predicted versus measured cyanobacterial chlorophyll *a* concentration; D) Not normal residual distribution (Shapiro-Wilk test, $W = 0.960$, $p\text{-value} < 0.01$) and E-F) performance of the models with all culture data and with prediction intervals, for total (E) and cyanobacterial (F) chlorophyll *a* concentrations.

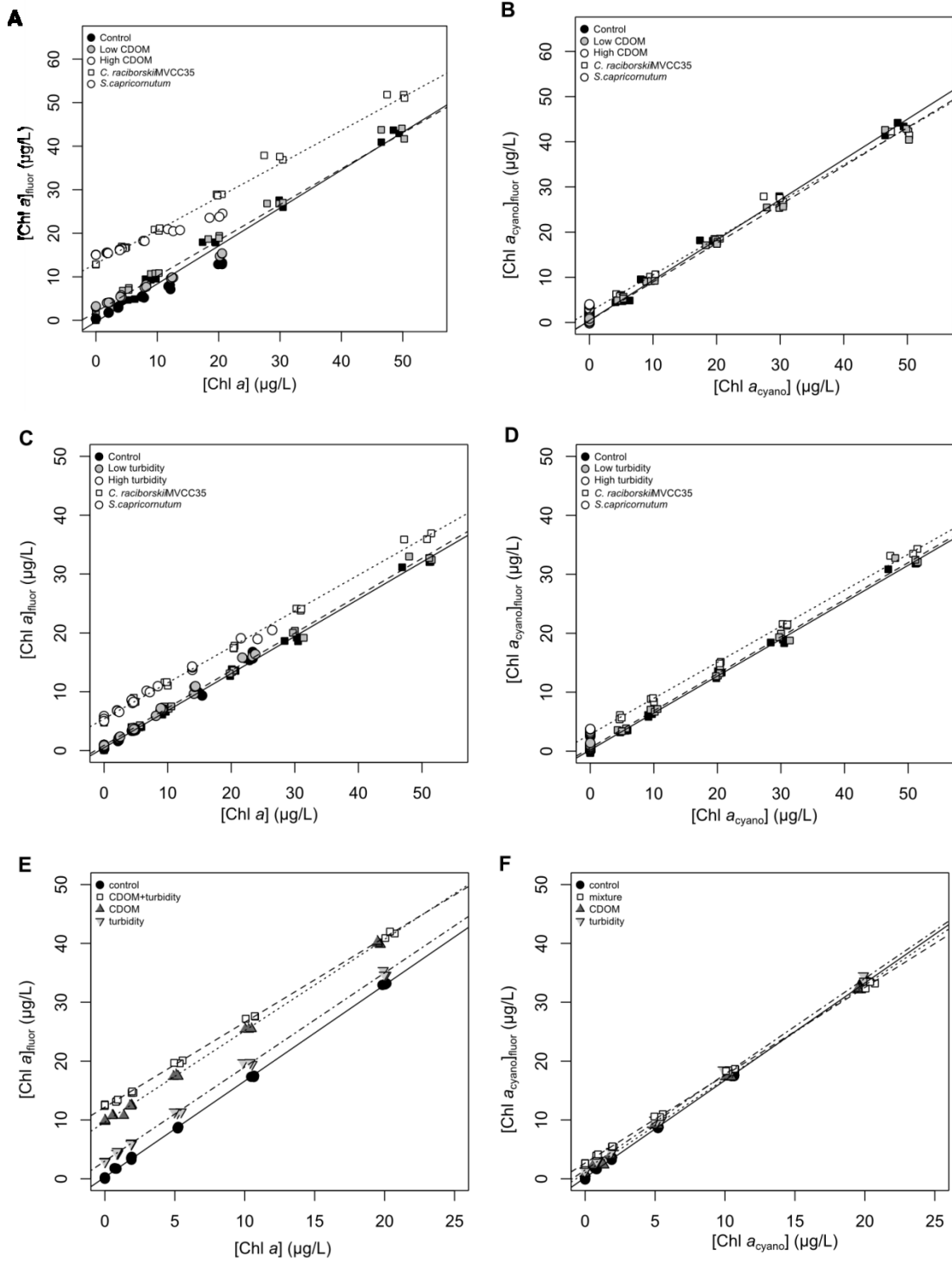


Figure 2.4: Effect of CDOM and turbidity on the modeled [Chl *a*]_{fluor}. Effects on total (A, C and E) and cyanobacterial (B, D and F) Chl *a*. A-D: Individual effects of CDOM or turbidity on Chl *a* (squares: *C. raciborskii* and circles: *S. capricornutum*). E, F: Effects of the CDOM + turbidity interaction on the Chl *a* (*Cyanobium* spp.); triangles: CDOM, inverted triangles: Turbidity and squares: CDOM+turbidity (interaction) treatments.

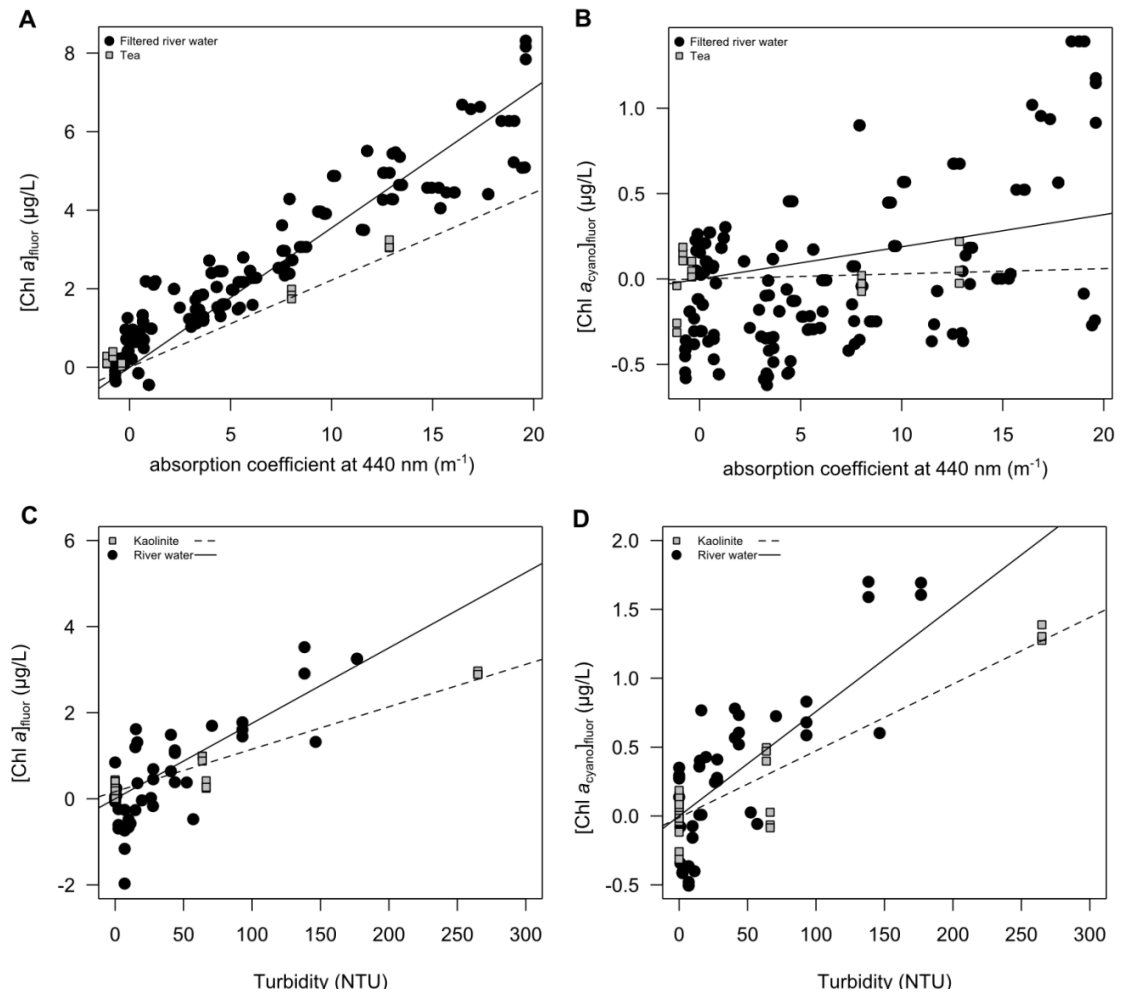


Figure 2.5: Natural CDOM and turbidity background chl *a*. Total (A) and cyanobacterial (B) modeled chl *a* from tea solutions (gray squares) and filtered river water (black dots). Turbidity total (C) and cyanobacterial (D) background chl *a* from kaolinite suspensions (gray squares) and river (black dots) and estuarine samples (white dots).

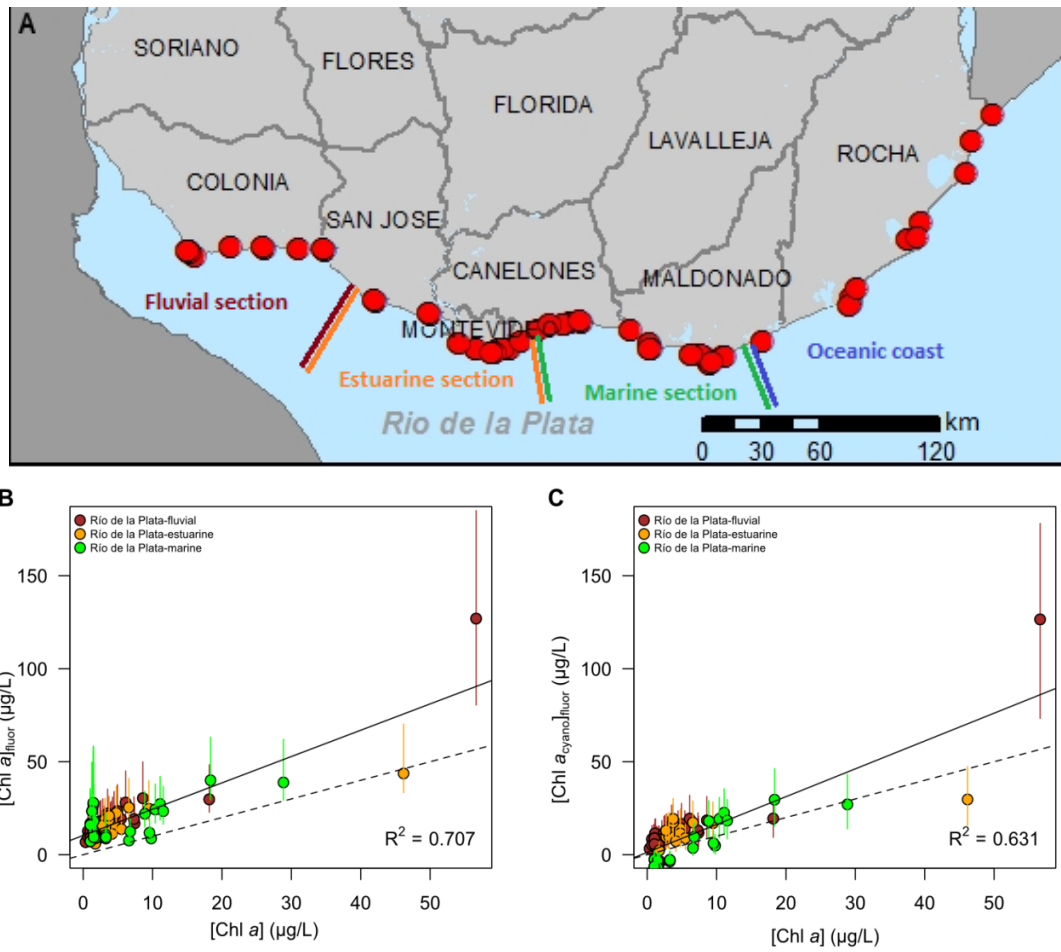


Figure 2.6: Performance of the Chl *a* prediction models with field samples. A) Map of the 51 Rio de la Plata routinely sampled beaches classified in regions according to salinity and transparency. B) Total and C) cyanobacterial modeled Chl *a* versus extracted chlorophyll *a* per region (brown: fluvial, yellow: estuarine and green: marine).

CAPÍTULO 3. DARK STEP CORRECTS PHYTOPLANKTON PHOTOREGULATION EFFECT ON *IN VIVO* CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE

Bruno Cremella¹, Yannick Huot², Sylvia Bonilla¹

1: Phytoplankton Ecology and Physiology Group, Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

2: Laboratory of environmental analysis, Université de Sherbrooke, Quebec, Canada

e-mail: brunocremella@gmail.com

Keywords: blooms, monitoring, acclimation, photosynthesis, cyanobacteria.

3.1 Abstract

Pigment *in vivo* fluorescence is increasingly used as a real time and reliable tool for predicting phytoplankton biomass and algal bloom events in water bodies. However, there are biological interferences that could deplete the outcome fluorescence, especially in field measurements. The cellular photosynthetic regulatory (qE) effect to light irradiance is one of the most important and overlooked biological interferences. Most *in situ* probes do not address qE effects, underestimating the predicted phytoplankton biomass. We tested the effect of acclimation and regulation on *in vivo* pigment fluorescence using fast repetition rate (FRRF) fluorometry on five phytoplankton species (3 cyanobacteria and 2 eukaryotes), as well as the fluorescence recovery after a dark incubation time. We found that the differences in species response indicated their divergent eco-physiology although changes between cyanobacteria were smaller than in microalgae. Our results clearly showed that exposing the samples to 3 minutes in darkness, previous to the fluorescence measurement, is enough to correct the qE effects, one of the most common errors found in field work using fluorometry techniques.

3.2 Introduction

Pigment *in vivo* fluorescence is a biotechnological tool for detection and quantification of microalgae and cyanobacteria with growing applications in water monitoring programs. Fluorescence in living photosynthetic cells is driven by the light absorption by the peripheral antennae pigments, the transfer of the excitation energy to the photosystem II (PSII) core, and the emission of light at 685 nm by the PSII-bound chlorophyll *a* (Chl *a*) molecules (Huot & Babin 2010). Most eukaryotic algae have antennae complex comprising chlorophylls and carotenoids (excitation at 400-500nm) while cyanobacteria have antennae complexes called phycobilisomes (PBS), with excitation at 500–650 nm and independent fluorescence emission (Millie et al. 2002). The set of accessory pigments varies significantly between phytoplankton groups, resulting in different fluorescence fingerprints (MacIntyre et al. 2010). Based on the *in vivo* pigment fingerprints it is possible to calculate the contribution of phytoplankton groups to total Chl *a* concentration, assuming that the fluorescence of a given quantity of pigments (fluorescence yield) is constant. However, the fluorescence yield is naturally variable and affected by acclimation responses to nutritional stress and daily irradiance (daily scale) (Parkhill et al. 2001; Johnsen & Sakshaug 2007) and regulatory responses to changes in the light intensity (minute to hour scale) (Campbell et al. 1998; Nikolaou et al. 2015).

The different timescales of environmental perturbations of cellular homeostasis trigger regulation or acclimation responses (Giordano 2013). In photosynthetic organisms light-induced responses are called photoacclimation (to changes in the daily light regime) and photoregulation (to rapid changes of irradiance). Photoacclimation conducts modifications of the antennae pigments content. High irradiance, over many hours to several days, can result in an increase of the proportion of photoprotective carotenoids and a decrease of photosynthetic accessory pigments relative to Chl *a*, leading to changes in the apparent (including excitation by accessory pigments) *in vivo* fluorescence yield (Stomp et al. 2008; Deblois et al. 2013). These changes naturally occur among all photosynthetic organisms, but the magnitude of change is highly variable and related to their eco-physiological adaptations. Photoregulation is a series of processes triggered by changes in the light irradiance lasting minutes to hours and resulting in changes of the fluorescence yield (Campbell et al. 1998; Ihnken et al. 2010).

This occurs mostly by two processes: 1) the state transitions, a selective transfer of excitation energy to PSII or to PSI (photosystem I) (Mullineaux & Emlyn-Jones 2005; Wlodarczyk et al. 2016), and 2) the energy-dependent non-photochemical quenching (qE), a set of activated PSII photoprotection mechanisms when irradiance in excess results in excitation energy dissipation (Goss & Lepetit 2015). Although state transitions and qE can strongly alter the Chl *a* fluorescence yield (MacIntyre et al. 2010), PBS fluorescence show very little variation (Beutler et al. 2003; Simis et al. 2012), making cyanobacterial fluorescence changes less prominent. The evaluation of the qE effects is possible with instruments designed to measure variable fluorescence, such as PAM (pulse amplitude modulated fluorescence) or FRRF (fast repetition rate fluorescence) (Huot & Babin 2010). Most fluorometers used for water monitoring do not address the qE photosynthetic regulatory effects, resulting in an underestimation of the predicted phytoplankton biomass.

qE can diminish up to 50% of the *in situ* fluorescence measured in natural phytoplankton (Serra et al. 2009). This limitation can be solved by modeling the qE effect on *in situ* deployed probes (Sackmann et al. 2008; Xing et al. 2014), or by quantifying the variable fluorescence in the field (Simis et al. 2012). To link the fluorescence signal with the biomass of the organisms present in a sample, the qE effects have to be removed. Few minutes in the dark allows the cells to reach a common, dark-photoregulated state removing the qE effects and then fluorescence will reflect the actual phytoplankton pigment content in the sample (Serodio et al. 1997). Usually, qE could be relaxed by incubating the sample between 1 to 10 minutes in darkness (Ruban et al. 2004; Bailey et al. 2005; Grouneva et al. 2008). Although not generally addressed in routine monitoring protocols, the implementation of a “dark regulation step” before the measurement of the *in vivo* fluorescence could increase the reliability of field measurements. Since phytoplankton species widely differ in size and pigment composition, more studies comparing species with different fluorescence characteristics are needed to determine the time for the dark regulation step. The objective of this work was to determine the light irradiance exposure effects on the chl *a* *in vivo* fluorescence, and to determine the ability to recover after adding a dark period. Our approach consisted in analyzing the fluorescence response of a set of strains representing common freshwater phytoplankton groups.

3.3 Materials and methods

Five strains of cyanobacteria (*Cyanobium* MVCC22, *Planktothrix agardhii* MVCC11, and *Microcystis aeruginosa* CPCC299,) and microalgae (*Scenedesmus obliquus* CPCC5, chorophyte, and *Navicula pelliculosa* CPCC552, diatom) were grown in modified full BG-11 medium, at the Laboratoire d'Analyses Environnementales, Université de Sherbrooke, Canada. The three cyanobacteria differed in their size and organization level; *Cyanobium* sp. is a picocyanobacteria ($\sim 1 \mu\text{m}$ diameter), *M. aeruginosa* had cells ~ 5 to $6 \mu\text{m}$ diameter and can form large colonies ($> 1\text{mm}$) and *P. agardhii* is a filamentous species ($\sim 100 \mu\text{m}$ long). *M. aeruginosa* and *P. agardhii* are common bloom forming species in eutrophic freshwaters around the world (Reynolds 1984). For the diatom, the culture medium was supplemented with silicate (Andersen 2005). Before the experiments, stock cultures were grown at $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $80 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ provided by white fluorescent tubes (Silhouette F14T5/841/ALTO, Phillips) and with a 12:12h light:dark photoperiod. We evaluated the effect of long (days) and short (minutes) time exposure to varying irradiance on the *in vivo* fluorescence signals. To achieve this goal we performed a series of experiments with the five strains previously acclimated to a gradient of 5 irradiance intensities.

We analyzed the variable fluorescence evolution response with a programmed light curve composed of increasing light irradiance with a fast repetition rate fluorometer (FRRF). We used this equipment to track the *in vivo* fluorescence changes in real time ($1 \mu\text{s}$ resolution) and to perform a programmable light-fluorescence curve. The basal-state fluorescence, F_0 , was used to evaluate the fluorescence response. F_0 is a good proxy of pigment concentration (Serodio et al. 1997) and similar to the fluorescence measured with the handheld portable instruments (Turner Aquafluor) used in Chapter 2. These handheld fluorometers work with low excitation irradiance that cannot saturate the PSII, and therefore the fluorescence represents the quantity of the actual pigments in the cell.

For the acclimation, the five strains were grown semi-continuously in 50 ml flasks, at five increasing irradiance from 8.91 to $266.51 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ obtained by combinations of neutral density filters (Lee Filters ®) assembled in the culturing device. The light was provided by white fluorescent tubes illuminating from the bottom of the flasks. The photoperiod was 12:12 (dark:light) with a variable intensity through the day

to simulate the sinusoidal daily cycle (average daily irradiance = daily maximum irradiance * 0.64). Five acclimation irradiance levels were defined (max., mean, for each level): 13.92, 8.91; 49.79, 31.86; 115.23, 73.75; 198.81, 127.24; and 416.42, 266.51 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Cultures were grown in a controlled temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) chamber. The acclimation time was defined as 7 days or when a stable growth rate was achieved, whichever happened first. The growth rate was measured as Eq. 1:

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

Where t , represents the time; i , the day; $[\text{Chl } a]$, the chlorophyll a concentration and μ , the growth rate. After acclimation, each experimental unit flask was sampled on three different moments, at 120, 160 and 200 minutes after lights turned on (three temporal subreplicates on different days). The samples were kept for 20 minutes in the dark to reach the dark-regulated state. Then, subsamples were taken for the light curve experiments and for Chl a quantification following the direct extraction method (Andersen 2005).

Acclimated culture subsamples were exposed to a light curve of 10 actinic (photosynthesis-inducing) lights of incremental irradiance, lasting in total ~ 40 minutes (Fig. 3.1). Each of the 10 steps included 12 induction cycles, composed of 1 μs alternating saturating flashes (Fig. 3.1). The first and the last steps have irradiance 0 (darkness). From each induction cycle F_0 was calculated. The last step of the light curve consisted in a 3 minutes longdark step tested as a recovery treatment. Then, F_0 from the last and the first dark step incubation were compared to evaluate the fluorescence recovery capacity in 3 minutes, which was reported as a percentage of recovery ($100 * F_{0\text{initial}} / F_{0\text{final}}$).

Three milliliters dark-acclimated subsamples were analyzed in a fast fluorometer model FL3500 (PSI, Czech Republic), with blue and red excitation wavelengths (455 and 627 nm for eukaryotes and cyanobacteria, respectively) and a far red filter for measuring fluorescence. The FL3500 has a resolution of 1 μs and 1 μs ultrahigh irradiance ($>10000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) saturating flashes, conditions requested to adjust a FRRF protocol (Kolber et al. 1998). The FL3500 was set with a fluorescence protocol of 10 actinic light steps of varying irradiance provided by the sum of 3 balanced LEDs (455 nm, 532 nm, and 627 nm). The light curve was composed of the following sequentially

increasing irradiance, 0 (dark), 4.5, 8.9, 31.9, 73.8, 127.2, 266.5, 393.7, 800.0 and a final 0 $\mu\text{mol quantum m}^{-2}\text{s}^{-1}$ step. Each actinic light step lasted for 3 minutes, and every 15s an induction cycle was performed. Each of these induction cycles consisted of 90 alternating 1 μs saturating pulses (180 μs total duration) of 19054 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for the red excitation, and 23104 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for the blue excitation. A simplified protocol, consisting on one step of actinic light, was applied to a BG-11 culture medium solution for blank subtraction and to a rhodamine-b solution for normalization (21.6 mg L^{-1} for red excitation and 1 mg L^{-1} for blue excitation).

F_0 was calculated from each induction cycle fitting a model based on Eq. 7 of Kolber et al. (1998) by non linear least squares (Fig. 3.1f) and then averaging the F_0 of the last three induction of each light step. F_0 was normalized by the Chl *a* concentration ($F_0/\text{Chl } a$).

All statistics and data analyses were performed in the R software (R Core Team 2015), with the packages *doBy* and *nls* for group-wise analysis and non-linear least squares curve fitting, respectively.

3.4 Results

F_0 varied widely between species and irradiances. *S. obliquus* (green algae) fluorescence increased positively with exposure irradiance but decreased with acclimation irradiance, while the diatom *N. pelliculosa* showed an opposite trend (Fig. 3.2). Within cyanobacteria, changes in fluorescence response to the actinic light steps were smaller than those of algae (Fig. 3.2). Cyanobacteria strains showed a similar fluorescence response pattern, except for *P. agardhii*, although *Cyanobium* spp. had almost twice the F_0 than the corresponding treatment of *M. aeruginosa*. These two cyanobacteria had a similar acclimation response and showed a $\sim 50\%$ decrease in F_0 between the lowest and the highest irradiance (Fig. 3.2). For the whole range of acclimation irradiance, *Cyanobium* F_0 was nearly twice higher than the one of *M. aeruginosa*, while the other cyanobacterium, *P. agardhii*, showed different response pattern and values (U-shaped increase in F_0 at higher irradiance).

Cyanobacterial F_0 was more variable than eukaryotes F_0 (by a factor of ~ 4.5 , and ~ 2.5 for cyanobacteria and eukaryotes, respectively). *P. agardhii* did not grow at acclimation

midday irradiance ($115.23 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The maximum F_0 was found in the lowest irradiance, except for *P. agardhii* which showed the highest F_0 in both extreme acclimation irradiances (Fig. 3.2). The full recovery treatment (3 minutes of darkness), was effective to revert the culture physiological conditions to the initial dark-regulated state. The recovery trace (30-210 seconds) dynamics varied between strains, with eukaryotes showing a rebound higher than 100% and a posterior tendency to 100% (Fig. 3.3). Three treatments showed recoveries lower than 90% of the initial dark-regulated state (*Cyanobium* spp. at the lowest and *N. pelliculosa* at the last two highest irradiances) (Fig. 3.4).

3.5 Discussion

Our experiments showed clear differences in the nature and magnitude of the F_0 response between organisms, reflecting their ecophysiological diversity. The ~ 2.5 times difference in the F_0 between dark-acclimated cyanobacteria and eukaryotes also evidence their evolutionary differences in pigment composition and photosynthetic structure (Falkowski et al. 2004; Goss & Lepetit 2015). The 3 minutes darkness exposure was enough to restore the F_0 to basal values in most cases. An exception was found for high irradiance acclimated *N. pelliculosa* cultures, probably related to the diatom stronger qE mechanisms in comparison with other algal groups (Ruban et al. 2004).

Among the studied cyanobacteria, the picoplanktonic *Cyanobium* sp. had the highest F_0 and the largest *M. aeruginosa* had the lowest, highlighting that morphological and ecophysiological differences affect physiological responses. The high *Cyanobium* spp. growth rate (Cremella et al. unpublished data) and its higher phycobilin per Chl *a* ratio, in comparison with other cyanobacteria, are in line with its higher F_0 . Furthermore, based on the F_0 curve results, Chl *a* prediction models need algorithms with particular parameters to successfully estimate picocyanobacteria biomass, different from the algorithms used in our model (Cremella et al, Chap. 2). We suggest that the higher F_0 found in *Cyanobium* spp., in comparison with the other two larger counterparts, are in line with the higher amounts of phycobilins present in picocyanobacteria. This small sized-cyanobacteria dominates oligotrophic lakes and usually does not develop blooms (Pick 1991; Stockner et al. 2000; Callieri 2007), while eutrophic ecosystems usually have large sized bloom forming cyanobacteria (nano and microplankton). In Uruguayan

eutrophic freshwaters, most frequent bloom forming cyanobacteria are large filamentous and colonial species, such as *P. aghardii* and *M. aeruginosa* (Bonilla 2009; Vidal & Britos 2012). The major difference in the F_0 between picocyanobacteria and the larger species determined in our study, could be extended to other common large sized species (i.e.: of the genera *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis*, *Sphaerocavum*). The contrasting responses between the diatom *N. pelliculosa* (low F_0 , high qE) and the chlorophyte *S. obliquus* (high F_0 , low qE), are aligned with the differences in their light tolerances (low light intensity with high variability and high constant light intensity, for diatoms and chlorophytes, respectively) (Litchman 2000; Schwaderer et al. 2011; Serodio J; Lavaud 2011; Lavaud & Goss 2014).

We found that after the light curve fluorescence response, F_0 could be restored to basal fluorescence values with 3 minutes in darkness, except for the high light acclimated diatoms. This is in agreement with qE relaxation times (1 to 3 min) reported elsewhere for cyanobacteria, green algae (1 to 3 min) and diatoms (3 to 10 minutes) (Ruban et al. 2004; Bailey et al. 2005; Grouneva et al. 2008).

In a longer temporal scale (>30 min to 24 hours) cells exposed to high irradiance can experience photo damage, resulting in a decrease in the fluorescence signal per Chl *a* (Falkowski et al. 1994; Vonshak et al. 1996). This change is more permanent than the qE and it cannot be solved by a dark exposition of the sample before the *in vivo* fluorescence measurement. In cyanobacteria, the strong autofluorescence of PBS greatly diminish the magnitude of changes in the F_0 (Simis et al. 2012), making the *in situ* measurements in the field less affected by irradiance. Although it is not possible to remove the more permanent effects of photo damage, the 3 minutes dark step will significantly improve the quality of the information and the accuracy of the chl *a* estimation. Based on our results we suggest the addition of a simple step for fluorescence monitoring protocols in the field. By applying the 3 dark-minutes-step before the fluorescence measurement in the field, the modeled chlorophyll *a* can be significantly increased (up to 50%), correcting one of the most common errors found in field fluorometric techniques.

3.6 References

Andersen, R. A. 2005. Algal Culturing Techniques, Elsevier Academic Press.

- Bailey, S., N. H. Mann, C. Robinson, & D. J. Scanlan. 2005. The occurrence of rapidly reversible non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in cyanobacteria. *FEBS Lett.* **579**: 275–280. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.091
- Beutler, M., K. H. Wiltshire, M. Arp, J. Kruse, C. Reineke, C. Moldaenke, & U.-P. Hansen. 2003. A reduced model of the fluorescence from the cyanobacterial photosynthetic apparatus designed for the in situ detection of cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1604**: 33–46. doi:10.1016/S0005-2728(03)00022-7
- Bonilla, S. 2009. Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión, S. Bonilla [ed.]. PHI-LAC 17, UNESCO.
- Callieri, C. 2007. Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshw. Rev.* **1**: 1–28. doi:10.1608/FRJ-1.1.1
- Campbell, D. A., V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustafsson, & G. Oquist. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 667–683.
- Deblois, C. P., A. Marchand, & P. Juneau. 2013. Comparison of Photoacclimation in Twelve Freshwater Photoautotrophs (Chlorophyte, Bacillariophyte, Cryptophyte and Cyanophyte) Isolated from a Natural Community. *PLoS One* **8**. doi:10.1371/journal.pone.0057139
- Falkowski, P. G., R. Greene, & Z. Kolber. 1994. Light utilization and photoinhibition of photosynthesis in marine phytoplankton, p. 407–432. *In* N.R. Baker and J.R. Bowyer [eds.], *Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field*. Oxford: Bios Scientific. Oxford, United Kingdom.
- Falkowski, P. G., M. E. Katz, A. H. Knoll, A. Quigg, J. A. Raven, O. Schofield, & F. J. R. Taylor. 2004. The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. *Science* **305**: 354–360. doi:10.1126/science.1095964
- Giordano, M. 2013. Homeostasis: an underestimated focal point of ecology and evolution. *Plant Sci.* **211**: 92–101. doi:10.1016/j.plantsci.2013.07.008
- Goss, R., & B. Lepetit. 2015. Biodiversity of NPQ. *J. Plant Physiol.* **172**: 13–32. doi:10.1016/j.jplph.2014.03.004
- Grouneva, I., T. Jakob, C. Wilhelm, & R. Goss. 2008. A new multicomponent NPQ mechanism in the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1217–1225. doi:10.1093/pcp/pcn097
- Huot, Y., & M. Babin. 2010. Overview of fluorescence protocols: theory, basic concepts, and practice, p. 31–74. *In* D.J. Suggett, O. Prášil, and M.A. Borowitzka [eds.], *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands.
- Ihnken, S., A. Eggert, & J. Beardall. 2010. Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae. *Aquat. Bot.* **93**: 185–194. doi:10.1016/j.aquabot.2010.07.002
- Johnsen, G., & E. Sakshaug. 2007. Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulseamplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry. *J. Phycol.* **43**: 1236–1251. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00422.x
- Kolber, Z. S., O. Prášil, & P. G. Falkowski. 1998. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: Defining methodology and experimental protocols. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1367**: 88–106. doi:10.1016/S0005-2728(98)00135-2
- Lavaud, J., & R. Goss. 2014. The Peculiar Features of Non-Photochemical Fluorescence Quenching in Diatoms and Brown Algae, p. 421–443. *In* Springer Netherlands.
- Litchman, E. 2000. Growth rates of phytoplankton under fluctuating light. *Freshw. Biol.* **44**: 223–235. doi:10.1046/j.1365-2427.2000.00559.x
- MacIntyre, H. L., E. Lawrenz, & T. L. Richardson. 2010. Taxonomic discrimination of phytoplankton by spectral fluorescence, p. 129–169. *In* *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*.
- Millie, D. F., O. M. E. Schofield, G. J. Kirkpatrick, G. Johnsen, & T. J. Evens. 2002. Using absorbance and fluorescence spectra to discriminate microalgae. *Eur. J. Phycol.* **37**: 313–322. doi:10.1017/S0967026202003700

- Mullineaux, C. W., & D. Emlyn-Jones. 2005. State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *J. Exp. Bot.* **56**: 389–93. doi:10.1093/jxb/eri064
- Nikolaou, A., A. Bernardi, A. Meneghesso, F. Bezzo, T. Morosinotto, & B. Chachuat. 2015. A model of chlorophyll fluorescence in microalgae integrating photoproduction, photoinhibition and photoregulation. *J. Biotechnol.* **194**: 91–99. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.12.001
- Parkhill, J.-P., G. Maillet, & J. J. Cullen. 2001. Fluorescence based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *J. Phycol.* **37**: 517–529. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.037004517.x
- Pick, F. R. 1991. The abundance and composition of freshwater picocyanobacteria in relation to light penetration. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1457–1462. doi:10.4319/lo.1991.36.7.1457
- R Core Team. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Reynolds, C. S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*, University Press, Cambridge.
- Ruban, A., J. Lavaud, B. Rousseau, G. Guglielmi, P. Horton, & A. L. Etienne. 2004. The super-excess energy dissipation in diatom algae: Comparative analysis with higher plants. *Photosynth. Res.* **82**: 165–175. doi:10.1007/s11120-004-1456-1
- Sackmann, B. S., M. J. Perry, & C. C. Eriksen. 2008. Seaglider observations of variability in daytime fluorescence quenching of chlorophyll-a in Northeastern Pacific coastal waters. *Biogeosciences Discuss.* **5**: 2839–2865. doi:10.5194/bgd-5-2839-2008
- Schwaderer, A. S., K. Yoshiyama, P. de Tezanos Pinto, N. G. Swenson, C. A. Klausmeier, & E. Litchman. 2011. Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **56**: 589–598. doi:10.4319/lo.2011.56.2.0589
- Serodio, J., J. M. Silva, & F. Catarino. 1997. Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae using in vivo chlorophyll a fluorescence. *J. Phycol.* **33**: 542–553. doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00542.x
- Serodio J; Lavaud, J. 2011. A model for describing the light response of the nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* **108**: 61–76. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11120-011-9654-0
- Serra, T., C. Borrego, X. Quintana, L. Calderer, R. López, & J. Colomer. 2009. Quantification of the effect of nonphotochemical quenching on the determination of in vivo Chl a from phytoplankton along the water column of a freshwater reservoir. *Photochem. Photobiol.* **85**: 321–331. doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00441.x
- Simis, S. G. H., Y. Huot, M. Babin, J. Seppälä, & L. Metsamaa. 2012. Optimization of variable fluorescence measurements of phytoplankton communities with cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **112**: 13–30. doi:10.1007/s11120-012-9729-6
- Stockner, J., C. Callieri, & G. Cronberg. 2000. Picoplankton and other non-bloom forming cyanobacteria in lakes, p. 195–231. *In* B.A. Whitton and M. Potts [eds.], *Ecology of Cyanobacteria: their Diversity in Time and Space*. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands.
- Stomp, M., M. a van Dijk, H. M. J. van Overzee, et al. 2008. The timescale of phenotypic plasticity and its impact on competition in fluctuating environments. *Am. Nat.* **172**: 169–85. doi:10.1086/591680
- Vidal, L., & A. Britos. 2012. Uruguay: Occurrence, Toxicity and Regulation of Cyanobacteria, p. 130–136. *In* *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*.
- Vonshak, A., L. Chanawongse, B. Bunnag, & M. Tanticharoen. 1996. Light acclimation and photoinhibition in three *Spirulina platensis* (cyanobacteria) isolates. *J. Appl. Phycol.* **8**: 35–40. doi:10.1007/BF02186220
- Wlodarczyk, L. M., E. Dinc, R. Croce, & J. P. Dekker. 2016. Excitation energy transfer in *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in the PSI core or the PSII core under conditions mimicking state transitions. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1857**: 625–633. doi:10.1016/j.bbabi.2016.03.002
- Xing, X., H. Claustre, S. Blain, et al. 2014. Quenching correction for in vivo chlorophyll fluorescence acquired by autonomous platforms: A case study with instrumented elephant seals in the Kerguelen

3.7 Figures and tables

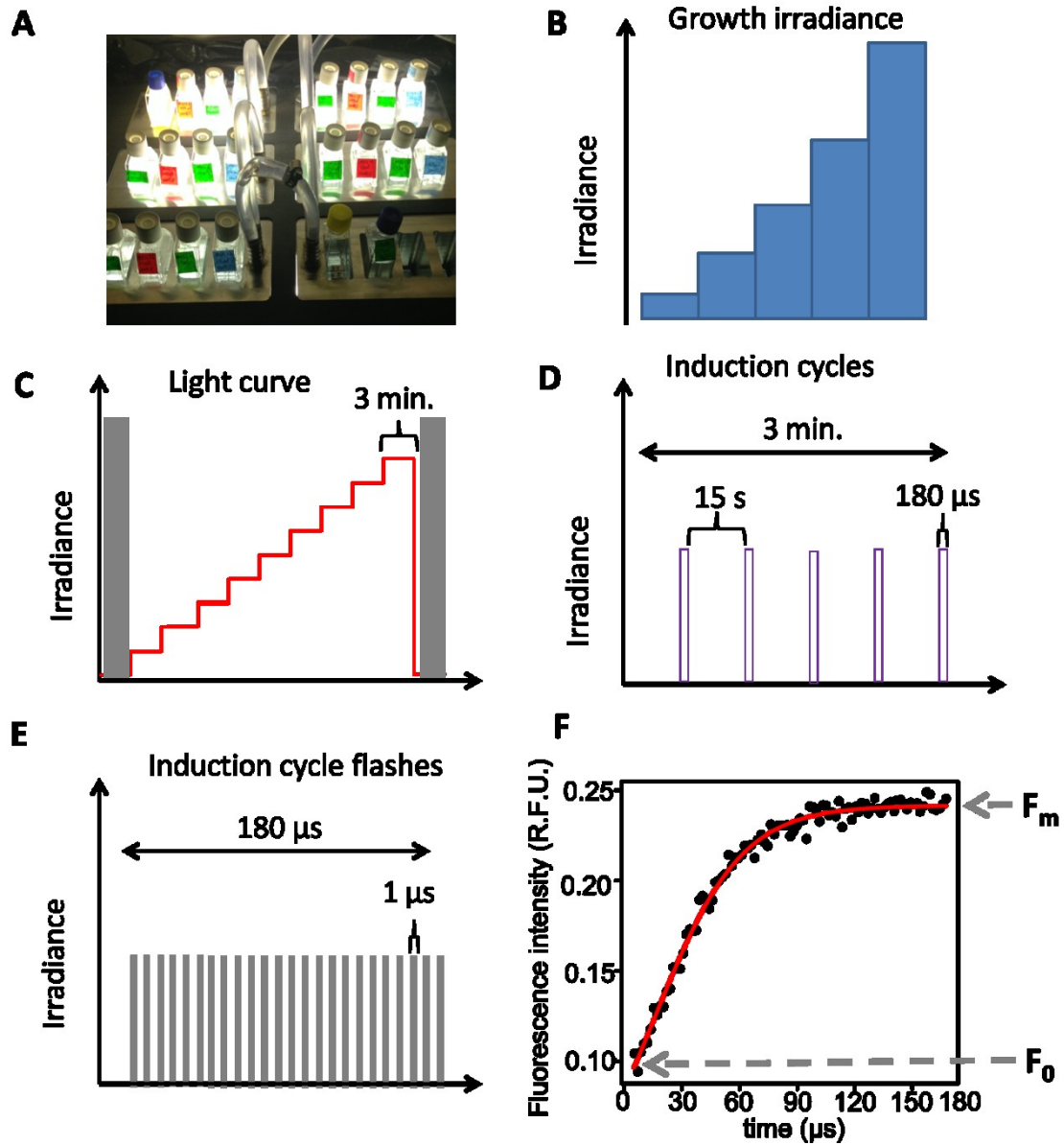


Figure 3.1: Experimental design. A) Growth device showing the 50 ml culture flasks. B) Scheme of the 5 growth irradiances applied to each strain. C) Light curves of 10 irradiance steps (3 minutes each) applied to each of the acclimated cultures; dark steps are indicated in grey. D) Temporal pattern of the induction cycles (every 15 seconds, 12 cycles). E) Each induction cycle was composed of 90 flashes of 1 μ s (180 μ s total). F) Induction fluorescence data example (from *N. pelliculosa* experiments) and the curve fit (Eq. 7 of Kolber et al., 1998) showing the estimated response parameters F_0 and F_m .

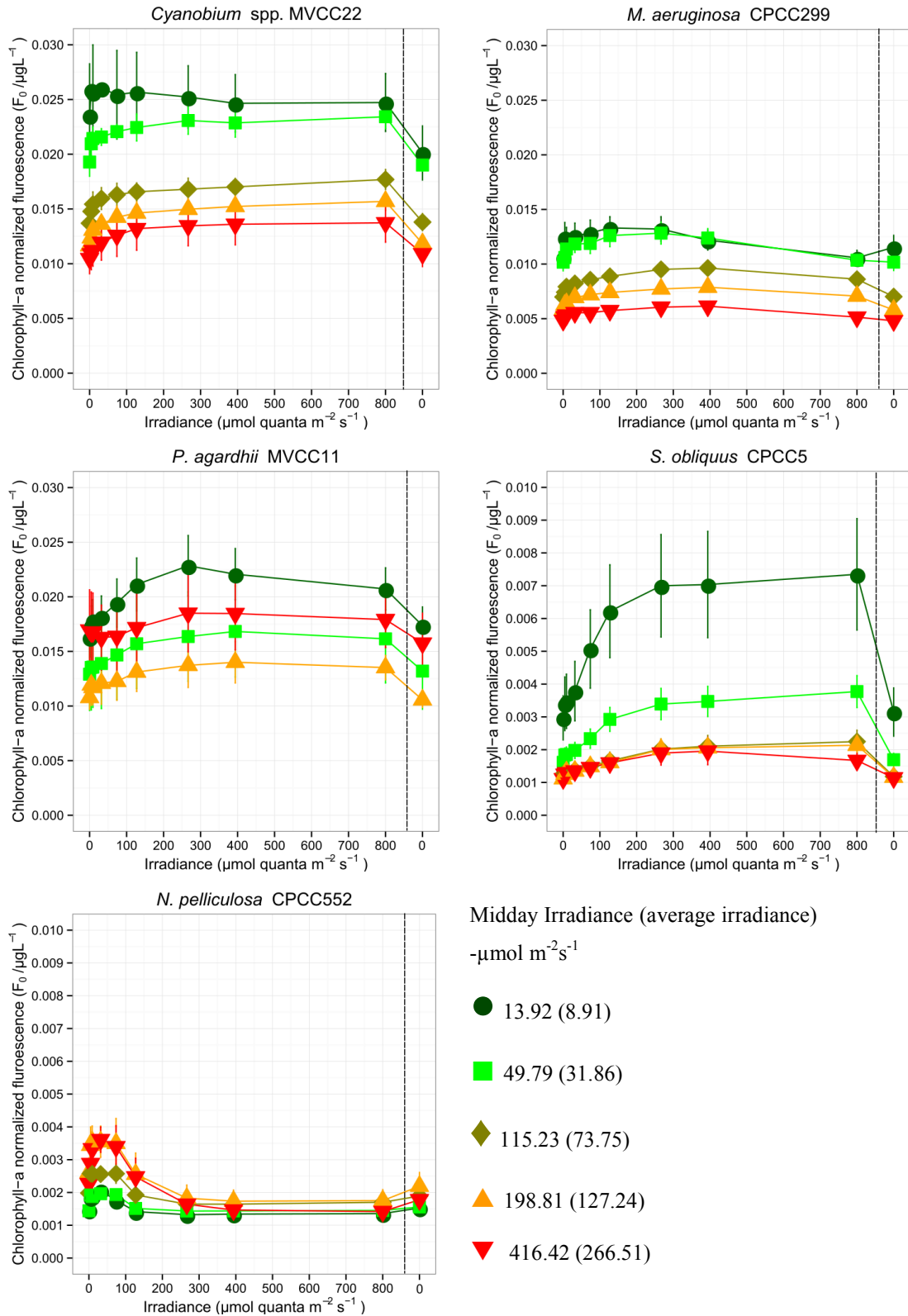


Figure 3.2: Effect of light exposure and acclimation on *in vivo* fluorescence of three cyanobacteria (MVCC22, CPCC299 and MVCC11) and two algae (CPCC5 and CPCC552) cultures. *In vivo* fluorescence (F_0) was normalized by chlorophyll *a* concentration. Data are average ($n=3$) with standard deviation (vertical lines). The five different irradiances (from 13.92 to 416.42 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) are

indicated by colors (average and deviation in brackets). Excitation wavelength are 627 nm (phycocyanin, for cyanobacteria) and 455 nm (chlorophyll *a* for algae).

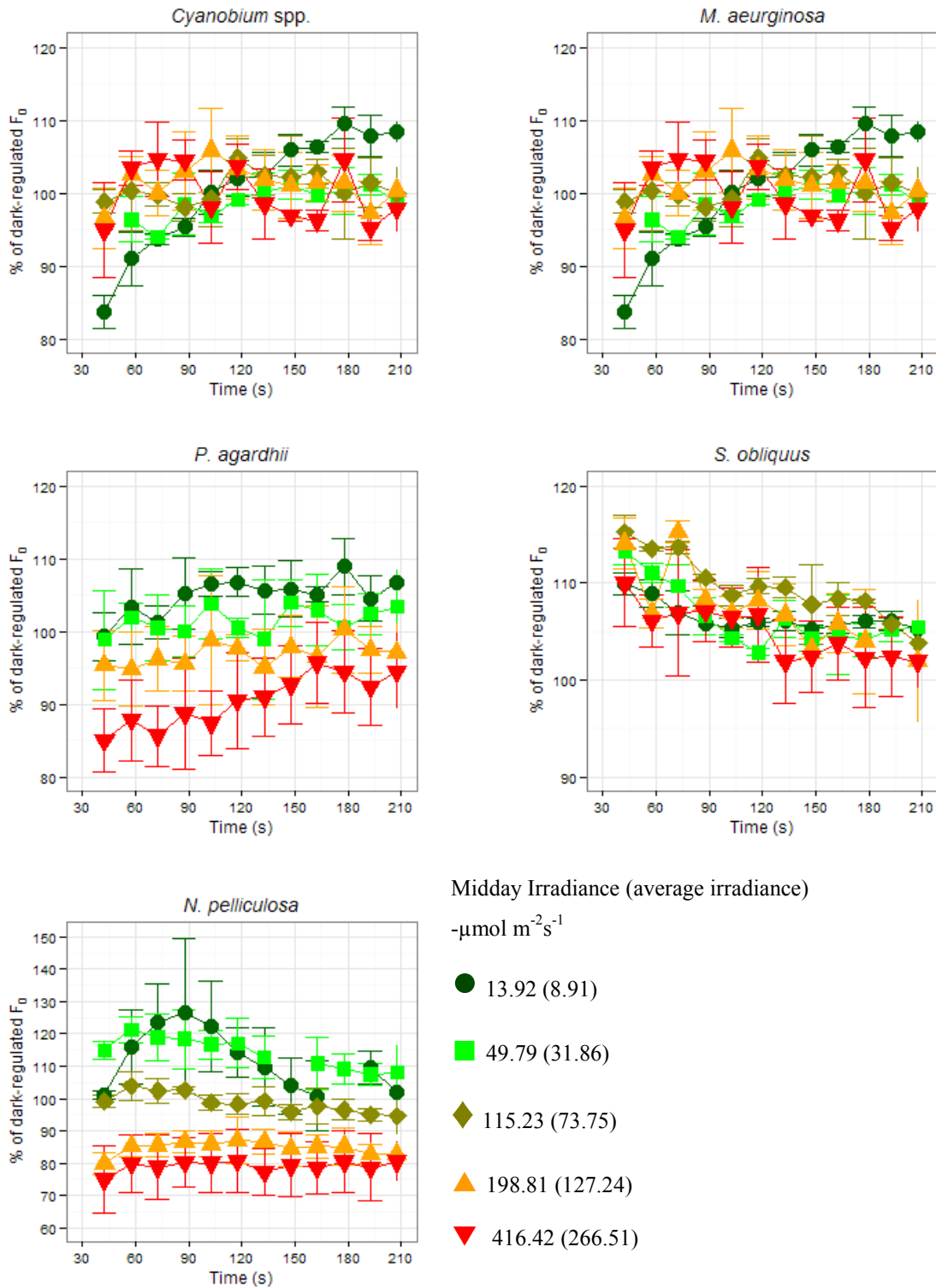


Figure 3.3: Recovery time to dark regulated states of algae and cyanobacteria in percentage of $F_0/\text{chl } a$ (%) in the dark. Colors represent the different acclimation irradiances. For cyanobacteria, phycocyanin excitation (627 nm) was used, for algae chlorophyll *a* excitation (455 nm) was used.

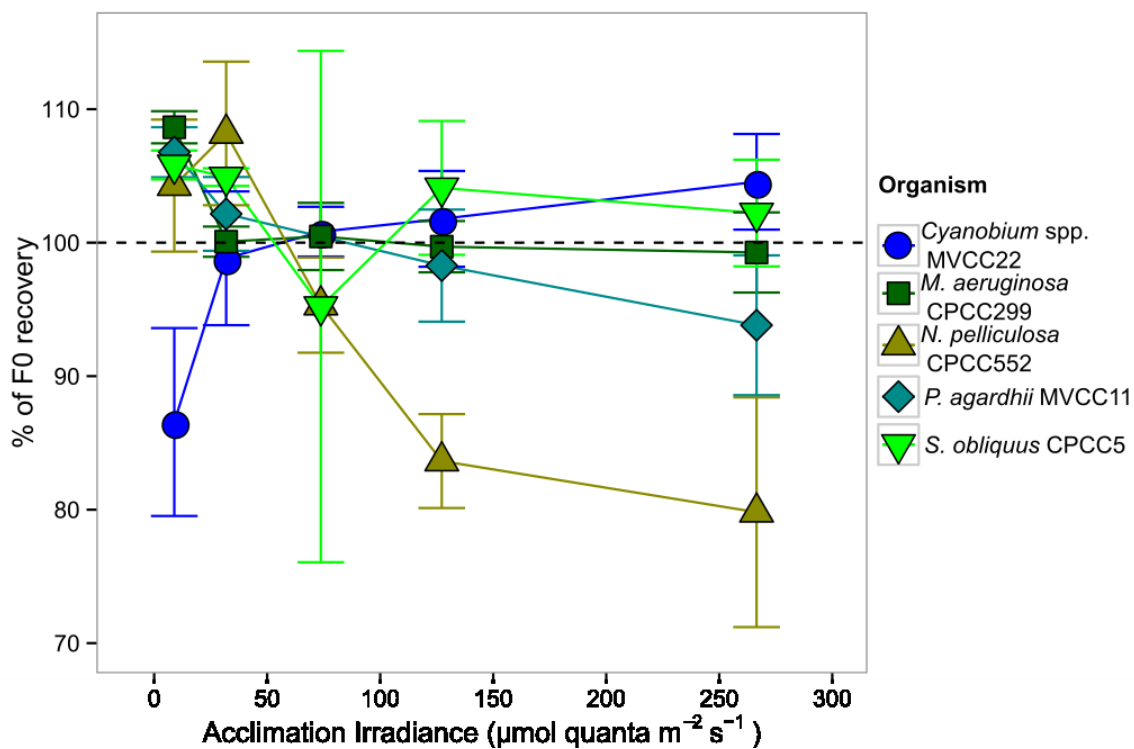


Figure 3.4: Recovery to dark regulated states in percentage of F0/chl *a* (%), after three minutes of dark exposure, in a gradient of acclimation irradiances. Colors represent the different strains. For cyanobacteria, phycocyanin excitation (627 nm) was used, for algae chlorophyll *a* excitation (455 nm) was used. Dotted line indicates 100% basal fluorescence recovery.

CAPÍTULO 4. IMPLEMENTACIÓN Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

4.1 Introducción

Uno de los principales desafíos de las nuevas técnicas biotecnológicas es su implementación final para su utilización por los destinatarios. Muchas veces este es un aspecto que no se tiene en cuenta a la hora de desarrollar una nueva metodología biotecnológica, lo que luego dificulta su uso, en especial en países emergentes (Cominelli et al. 2009). A diferencia de la transferencia de conocimiento, la transferencia tecnológica es un acercamiento más adecuado ya que conlleva el aprendizaje colectivo entre los expertos y los usuarios, lo que puede resultar en una gestión más sustentable de los ecosistemas (Roux et al. 2006). Por ejemplo, para la implementación de nuevas tecnologías de monitoreo de la calidad de agua, la directiva marco del agua de la Unión Europea (DMA_UE) sugiere que las instituciones responsables vinculen la investigación con la implementación mediante el asesoramiento complementario en la validación de los métodos, la demostración de sus usos potenciales y a través de programas de entrenamiento hechos a medida (Dworak et al. 2005). El método de detección y cuantificación de fitoplancton mediante fluorescencia de pigmentos *in vivo*, desarrollado en esta tesis (cap. 2), es una nueva herramienta tecnológica para el país. Sin embargo, hasta el presente no existen antecedentes en el país de experiencias de transferencia tecnológica en este tipo de biotecnologías. Por lo tanto, se buscó el trabajo interactivo con los técnicos destinatarios del método desde el comienzo. En este capítulo se abordan los siguientes objetivos de la tesis: generar un protocolo adecuado para ser utilizado en programas de monitoreo, y generar una matriz electrónica e interactiva para la aplicación sencilla del modelo (Obj. 6); y realizar la transferencia tecnológica brindando talleres de capacitación para el uso del modelo dirigidos a técnicos de entidades públicas (Obj. 7).

4.2 Materiales y métodos

Se llevaron adelante diversas actividades para efectivizar la transferencia tecnológica a entes responsables del monitoreo de calidad de agua. Las actividades consistieron en brindar talleres de capacitación dirigidos a técnicos, generar un protocolo adecuado para

ser utilizado en los programas de monitoreo, y generar una matriz electrónica interactiva para la aplicación sencilla de los modelos de predicción de clorofila *a* total y cianobacterias.

Se dictaron tres talleres de capacitación técnica dirigidos a personal de las intendencias departamentales y de la DINAMA (Tabla 4.1, Fig. 4.1). En los mismos se brindaron las bases conceptuales de la fluorescencia de pigmentos *in vivo*, así como el uso, mantenimiento y calibración de los equipos (Tabla 4.1). Se utilizó la metodología de muestreo ya existente en la DINAMA como insumo para elaborar el primer protocolo de trabajo en campo. En el taller I se enseñaron las bases de la fluorescencia y se realizaron salidas de campo en donde los técnicos usaron los fluorómetros por primera vez. Los subsiguientes talleres (II y III) permitieron evaluar el uso del protocolo e incorporar modificaciones prácticas que simplificaron el uso de los equipos.

Se generó un protocolo en dos formatos: una versión corta para la consulta rápida de los técnicos, y una versión larga para ser ingresada a los protocolos de rutina de DINAMA. Los mismos se fueron actualizando de acuerdo a los avances en nuestro conocimiento de la fluorescencia *in vivo*, aclarando dudas frecuentes de los usuarios, y también con aportes de los técnicos, ajustando los protocolos a sus procedimientos de muestreo existentes.

A partir de los datos provenientes de las campañas de monitoreo (veranos 2014 al 2016) de las intendencias, se procedió a realizar una planilla electrónica indexada que facilitara la comparación y el análisis de los datos en software de hojas de cálculo (utilizable con Microsoft Excel, LibreOffice Calc, etc.). Los datos y la nomenclatura utilizada para identificar la información ingresada fue discutida con los técnicos. La información ingresada a la planilla incluía el sitio, la fecha de la medición en campo y una serie de datos concernientes a la calibración, el equipo utilizado y el resultado de fluorescencia obtenido. Dicha información debía ser ingresada por el técnico. Luego en la planilla se ingresó el modelo desarrollado en el capítulo 2 de forma que el usuario pudiera obtener automáticamente el resultado final de la concentración de la clorofila *a* total y la de cianobacterias predichas. La planilla se puso a prueba ingresando datos tomados en el campo por los diferentes equipos técnicos de las intendencias municipales. Dichos datos fueron verificados identificando en algunos casos errores en

las celdas de ingreso de los valores medidos en el campo (el más común fue el ingreso erróneo de los valores de calibración del estándar y del blanco), o datos que se alejaban notoriamente de la tendencia general. En la planilla esto se indica con el color de la celda (amarillo).

4.3 Resultados

4.3.1 Talleres y protocolos

En los talleres los técnicos incorporaron conocimientos básicos sobre la fluorescencia de pigmentos *in vivo*, lo que les permitió comprender más fácilmente aspectos operativos del uso de los equipos. A partir del intercambio con los técnicos en el primer taller, se incorporaron sugerencias y modificaciones en los protocolos de trabajo y en la operativa del uso de los equipos. En particular en el segundo taller (II) se evaluaron aspectos operativos de los procedimientos generales de monitoreo y del uso de los equipos en el campo, mediante un cuestionario con preguntas cuali y cuantitativas que respondieron los técnicos. Tomando en cuenta las diferencias en los procedimientos (Tabla 4.2) se generó un consenso para incorporar en el protocolo. Como producto final de esta etapa (talleres II y III) se desarrollaron dos protocolos de trabajo, uno corto para usar en el campo (Anexo II) y otro extendido para hacer las calibraciones de los equipos en el laboratorio. La colaboración científico-técnica permitió enriquecer significativamente la elaboración de dichos protocolos.

La versión corta del protocolo incluyó procedimientos y recomendaciones para la calibración del fluorómetro, y la medición de las muestras y mantenimiento de las cubetas (Anexo 1):

1- Procedimientos y recomendaciones para la calibración del fluorómetro:

Para realizar cada día de uso del equipo. Se explica sucintamente la sucesión de comandos de operación del fluorómetro, la naturaleza del blanco y del estándar, la verificación de la calibración (chequeando el cociente %STd / %Blk), y los valores que deben ser registrados (%Std, %Blk, y StdVal)

Tabla 4.1: Contenidos de los talleres de capacitación dirigidos a técnicos de la DINAMA y de las intendencias municipales, realizados en la Facultad de Ciencias. Cada taller tuvo una carga horaria entre 8 y 10 horas.

Taller	Contenido
1- Bases para el uso de fluorómetros de campo para la detección de fitoplancton <i>in situ</i>	Teórico: bases conceptuales de la fluorescencia de pigmentos, distribución de pigmentos en los grupos algales y cianobacterias. Práctico: calibración de fluorómetros, medición de fluorescencia de cultivos, utilización de los equipos en campo, observación al microscopio, y discusión de resultados.
2-Evaluación y análisis de resultados obtenidos con fluorómetros de campo en playas	Evaluación de los resultados obtenidos en la campaña de verano y ajuste de la metodología de uso de los equipos buscando minimizar diferencias de procedimiento. Se colectaron problemas y diferencias de muestreo entre los técnicos en una tabla, a partir de la cual se elaboró el primer protocolo de uso del equipo en campo.
3:- Taller formativo y puesta a punto del protocolo de uso del fluorómetro de campo	Calibración de los estándares con sus respectivas celdas y medición de 3 cultivos (2 cianobacterias y un alga). Transformación de los datos para que sean intercomparables entre los distintos equipos. Ejercicios prácticos. Medición de muestras naturales aplicando la calibración y las transformaciones de los datos. Análisis de los resultados. Espacio para consultar dudas del protocolo. Ejercicios. Entrega de estándares sólidos. Recomendaciones.

2- Procedimiento de medición:

Se describe la toma, acondicionamiento, y homogeneización de la muestra, así como la medición de la fluorescencia por triplicado. Como complemento se sugiere incorporar una descripción visual de la presencia de cianobacterias (0, ausencia de colonias; 1, colonias dispersas; y 2, espuma o floración desarrollada) como variable complementaria de monitoreo.

3- Mantenimiento de las cubetas:

Se describen los cuidados para la re-utilización de las cubetas (normalmente descartables), la prevención de rasguños, procedimiento de lavado y solventes no permitidos (orgánicos y detergentes).



Figura 4.1: Talleres de capacitación dirigidos a técnicos de la DINAMA y de las intendencias municipales, realizados en la Facultad de Ciencias durante el desarrollo de esta tesis. Fotografías: Malvina Masdeu.

Tabla 4.2: Evaluación de aspectos operativos del uso de los fluorómetros de mano por parte de los técnicos durante el Taller II. Entre paréntesis se indica el número de intendencias que aplicó cada una de las opciones en el procedimiento.

Procedimiento	Variantes (número de intendencias que la aplicaron)
Corrección por blanco de agua destilada	No (4) Si (1)
Numero de cubetas usadas durante el muestreo	Una (4) Dos (1)
Papel de secado de la cubeta	Papel tissue (3) P. higiénico (2)
Lavado de cubeta entre muestreos	Agua destilada (1) Agua de la muestra (2) Agua destilada + agua de la muestra (2)
Recipiente de toma de muestra	Balde (2) Frasco de boca ancha (4)
Tiempo de muestreo por sitio	5 minutos (4) 10 minutos (1)
Llenado de cubeta mediante	Pipeta (1) Jeringa (1) llenado directo (3)
Réplicas de muestreo o réplicas de medición	3 réplicas de muestreo (1) 3 réplicas de medición (1) 2 réplicas de medición (1) Sin réplicas (1)

El protocolo extenso cuenta con una estructura formal acorde al sistema de gestión de procedimientos interno de la DINAMA. La misma incluyó: los destinatarios y responsables, los objetivos del mismo, la descripción instrumental de los equipos y accesorios, el procedimiento de calibración diario, el procedimiento de toma de medidas (incluyendo muestreo y medición con el equipo), la especificación de datos a incluir en

los registros tras la medición, las precauciones y cuidados de los equipos, y un anexo describiendo el ajuste de los estándares sólidos.

4.3.2 Implementación de los modelos en planilla electrónica interactiva

Se elaboró una planilla electrónica para la comparación y el análisis de los datos (utilizable con Microsoft Excel, LibreOffice Calc, etc.) (Tabla 4.3). El técnico debe ingresar información en 12 columnas concernientes a la fecha, lugar, características del equipo y datos de calibración y las lecturas de fluorescencia de la muestra (Tabla 4.3).

Tabla 4.3: Información que los técnicos deben ingresar a la planilla interactiva relacionados a la medición de la fluorescencia.

Nombre de columna	Significado
Sitio, Fecha, etc.	Identificadores de muestra
Fecha Calibración	Fecha de intercalibración del fluorómetro
Equipo	Fluorómetro utilizado
celda	RASSS (estándar secundario sólido rojo ajustable) utilizado
blk.a	Valor registrado del blanco de calibración (%FS-Blk), canal de ficocianina
std.a	Valor registrado del estándar de calibración (%FS-Std), canal de ficocianina
stdval.a	Valor asignado al estándar (StdVal), canal de ficocianina
fluo.a	Fluorescencia de la ficocianina
blk.b	Valor registrado del blanco de calibración (%FS-Blk), canal de clorofila <i>a</i>
std.b	Valor registrado del estándar de calibración (%FS-Std), canal de clorofila <i>a</i>
stdval.b	Valor asignado al estándar (StdVal), canal de clorofila <i>a</i>
fluo.b	Fluorescencia de la clorofila

Para aplicar los modelos de predicción de la clorofila *a* desarrollado en esta tesis, en la planilla se agregaron varias columnas que incluyen los algoritmos de calibración y post-calibración de los datos (Tabla 4.4). A partir del ingreso de los datos (columnas 1 a 12 de la planilla), la aplicación de los modelos es automática y brindan los resultados de la predicción de la clorofila *a* total y la clorofila *a* de cianobacterias, el porcentaje de clorofila *a* de cianobacterias (estimado a partir de las dos anteriores), y los límites de predicción (5 y 95%) de los dos modelos. Los coeficientes de post-calibración de cada fluorómetro, y los modelos de predicción de clorofila *a* provienen de los resultados del capítulo 2 de esta tesis.

La planilla interactiva se cargó con datos de campo obtenidos por los técnicos de las intendencias (al 14 de setiembre de 2016, tenía 1227 registros, desde el 28 de enero de 2014 al 6 de abril de 2016). De este conjunto de datos, se seleccionaron aquellos que tenían asociada la información de la clorofila por extracción para estudiar el desempeño de los modelos (Cap. 2).

Tabla 4.4: Factores de corrección de los datos de fluorescencia, algoritmos y resultados obtenidos de los modelos de predicción de clorofila *a* de la planilla interactiva.

Nombre de columna	Significado	Algoritmo
fnorm.a	Fluorescencia "bruta" de la ficocianina	$\text{fluo.a} * (\text{std.a} - \text{blk.a}) / \text{stdval.a}$
fnorm.b	Fluorescencia "bruta" de la clorofila	$\text{fluo.b} * (\text{std.b} - \text{blk.b}) / \text{stdval.b}$
a.final	fnorm.a corregida por los coeficientes de post-calibración para cada fluorómetros	$\text{fnorm.a} * \text{PostCal}_{i,C-PC}$
b.final	fnorm.b de la clorofila corregida con los coeficientes de post-calibración para cada fluorómetro	$\text{fnorm.b} * \text{PostCal}_{i,Chl a}$
Modelo clorofila total ($\mu\text{g/L}$)	Clorofila <i>a</i> total estimada a través del modelo:	$50,0 * \text{a.final} + 11,4 * \text{b.final}$
Modelo clorofila cianos ($\mu\text{g/L}$)	Clorofila <i>a</i> de cianobacterias estimada a través del modelo:	$54,3 * \text{a.final} - 2,8 * \text{b.final}$
%ciano	Porcentaje de clorofila <i>a</i> correspondiente a cianobacterias	$100 * (\text{Clo } a \text{ cianos} / \text{Clo } a \text{ total})$
modelo clo-a 05	Límite de predicción inferior (5%) del modelo de clorofila <i>a</i> total	$29,7 * \text{a.final} + 9,1 * \text{b.final} - 0,9$
modelo clo-a 95	Límite de predicción superior (95%) del modelo de clorofila <i>a</i> total	$56,3 * \text{a.final} + 13,4 * \text{b.final} + 10,8$
modelo-ciano 05	Límite de predicción inferior (5%) del modelo de clorofila <i>a</i> de cianobacterias	$31,4 * \text{a.final} - 1,8 * \text{b.final} - 3,0$
modelo-ciano 95	Límite de predicción superior (95%) del modelo de clorofila <i>a</i> de cianobacterias	$70,5 * \text{a.final} - 2,7 * \text{b.final} + 3,2$

4.4 Discusión

Se realizó la transferencia tecnológica del uso de los fluorómetros y la aplicación de los modelos de cuantificación y predicción de la clorofila *a* total y de cianobacterias basado en la fluorescencia *in vivo*. Para ello se instrumentaron talleres de capacitación, la elaboración de un protocolo, y la implementación de los modelos en una planilla electrónica interactiva. Desde el inicio se buscó la interacción con los técnicos responsables del uso de los equipos lo que permitió optimizar los protocolos, ahorrar tiempo y ganar en claridad técnica en los aspectos operativos. La transferencia

tecnológica es un acercamiento más adecuado y moderno que la transferencia del conocimiento, logrando mejores resultados en la instrumentación de nuevos métodos (Roux et al. 2006). Por lo tanto, los pasos de implementación se seleccionaron en esta tesis siguiendo ese concepto. El proceso de transferencia tecnológica descrito en esta tesis siguió un esquema muy similar al de otras tecnologías para monitoreo de playas: una sesión de formación teórica de los técnicos, varias jornadas de formación práctica, la elaboración de un manual práctico, el ajuste de la metodología propuesta de acuerdo a los procedimientos de monitoreo existentes, la elaboración de una planilla interactiva en la que los técnicos ingresen los datos y obtengan directamente los resultados, y el análisis de resultados provenientes de su implementación (Griffith & Weisberg 2011).

Entre las limitaciones para implementar el uso de la fluorescencia en monitoreos, se encuentran aspectos técnicos y aspectos de normativa. Dentro de los aspectos técnicos se debe trabajar más en lograr la independización de los modelos de los fluorómetros (mediante calibración con compuestos fluorescentes de concentración conocida), y en la caracterización de la CDOM y turbidez *in situ* en los sitios de muestreo. Dentro de los aspectos de normativa se destaca la ausencia de un marco regulatorio en el país para la presencia y biomasa de cianobacterias. La implementación de tecnologías de este tipo pueden contribuir a superar las limitaciones económicas y de capital humano subyacentes en la gestión del medio ambiente tanto en Uruguay como en otros países emergentes.

4.5 Referencias

- Cominelli, E., M. Galbiati, C. Tonelli, & C. Bowler. 2009. Water: the invisible problem. *EMBO Rep.* **10**: 671–676. doi:10.1038/embor.2009.148
- Dworak, T., C. Gonzalez, C. Laaser, & E. Interwies. 2005. The need for new monitoring tools to implement the WFD. *Environ. Sci. Policy* **8**: 301–306. doi:10.1016/j.envsci.2005.03.007
- Griffith, J. F., & S. B. Weisberg. 2011. Challenges in Implementing New Technology for Beach Water Quality Monitoring: Lessons From a California Demonstration Project. *Mar. Technol. Soc. J.* **45**: 65–73.
- Roux, D. J., K. H. Rogers, H. C. Biggs, P. J. Ashton, & A. Sergeant. 2006. Bridging the science-management divide: Moving from unidirectional knowledge transfer to knowledge interfacing and sharing. *Ecol. Soc.* **11**: Art.4. doi:4

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Discusión general

Para cumplir con los requerimientos de las políticas ambientales es necesaria la implementación de nuevas tecnologías que brinden información precisa y en tiempo real, de la calidad del agua (Chorus 2012). El monitoreo de cianobacterias requiere de métodos rápidos, simples, de bajo costo y fiables. La fluorimetría es una herramienta que cada vez más utilizada para cuantificar fitoplancton *in situ*. A pesar de los numerosos trabajos que se llevan adelante, hasta el desarrollo de esta tesis no se habían descrito modelos para ser utilizados con múltiples fluorómetros de mano en forma simultánea (Zamyadi et al. 2016). El método desarrollado en esta tesis cumple con dichos requerimientos y está en sintonía con las recomendaciones de vanguardia en el uso de la biotecnología aplicada al medio ambiente (Dworak et al. 2005; Griffith & Weisberg 2011). La puesta a punto de ésta técnica llevada a cabo, integró las etapas de viabilidad de la calibración, intercalibración, desarrollo de modelos de predicción, evaluación de las interferencias, evaluación del desempeño en el campo, e implementación (Fig. 5.1).

Las interferencias ópticas más comunes en la fluorescencia, generadas por la MODC y la turbidez (Keller et al. 1990; Zamyadi et al. 2016), son corregidas en nuestro modelo por algoritmos desarrollados en base a la experimentación, aspectos que son generalmente poco considerados en los estudios de fluorimetría. Por lo tanto, la técnica de fluorimetría de pigmentos *in vivo* para determinar la clorofila *a* del fitoplancton y de la fracción correspondiente a las cianobacterias desarrollada en esta tesis es innovadora. Se desarrollaron los modelos de predicción de clorofila *a* en base a resultados con experimentos de mezclas complejas de cultivos simulando condiciones naturales, a diferencia de la mayoría de los métodos ya publicados. Además, se incluyó la intercalibración de múltiples equipos del mismo modelo, correcciones de las interferencias ópticas producidas por la matriz (Cap. 2), y del efecto fisiológico de la exposición a la luz (Cap. 3). Al abarcar estos aspectos, se logró avanzar significativamente hacia la implementación de la fluorimetría de pigmentos *in vivo* en

monitoreos ambientales. Este método tiene especial utilidad para establecer sistemas de alertas tempranas debido a la obtención de resultados en tiempo real, a y su bajo costo, como ya han sido sugeridos para otros fluorómetros (Izydorczyk et al. 2009). Además, se obtiene el dato de la clorofila *a* de cianobacterias (y su proporción en el total), lo que facilita identificar cambios de biomasa y tendencias en el tiempo. Los modelos de predicción, incluyendo las correcciones para las interferencias ópticas de la matriz acuosa y el paso de 3 minutos de oscuridad, son modificables o ajustables por los propios usuarios, lo que amplía el uso del modelo a otros fluorómetros con canales similares, requiriendo solamente una calibración con cultivos de cianobacterias y algas.

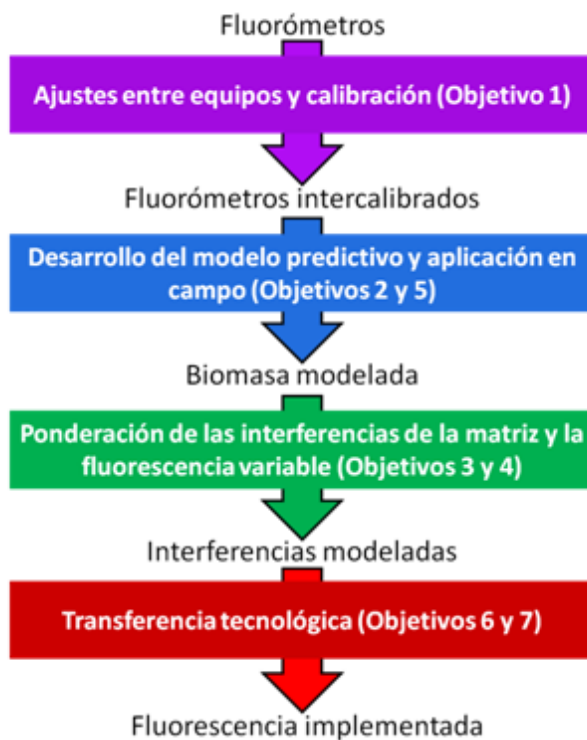


Figura 5.1: Aproximación integral de la puesta a punto y validación de la fluorescencia de pigmentos *in vivo*. Instancias metodológicas realizadas, la obtención de sucesivos estados intermedios y su relacionamiento con los objetivos planteados.

Si bien los principales aspectos técnicos de la puesta a punto de la metodología fueron abordados en los capítulos 2, 3 y 4, otros aspectos técnicos se discuten a continuación. Con respecto a la calibración con el estándar sólido (RASSS), durante el desarrollo de las investigaciones se encontró que no fue un buen estándar universal, y por lo tanto se debió realizar una serie de cálculos para corregir este punto. Si bien el equipo brinda valores calibrados por defecto, éstos debieron ser transformados a fluorescencia “bruta”, y luego estandarizados (correcciones post-calibración). La limitación de los RASSS,

que no funcionan como un estándar secundario universal, es atribuible a la variación en la alineación entre los LEDs de excitación y las ventanas del mismo. Por lo tanto, se debería utilizar en estudios futuros estándares basados en soluciones de compuestos fluorescentes estables (rodamina, fluoresceína, etc.). Esto haría que los RASSS pasen a cumplir solamente la función de seguimiento y control de calidad diaria de la calibración (Earp et al. 2011). En cuanto al efecto de la exposición a la luz previo a la medida en campo, se demostró que la aplicación de 3 minutos de oscuridad a la muestra es suficiente (Cap. 3) Esto fue tratado en los talleres con los técnicos y se deberá agregar a futuras ediciones del protocolo de trabajo (Cap. 4).

Para facilitar la implementación de esta metodología se realizó un proceso de transferencia tecnológica en base a talleres de capacitación y evaluación conjunta, desarrollo de protocolos, y elaboración de hojas de cálculo que incluían los modelos para su aplicación directa e inmediata (Cap. 4). El método desarrollado en esta tesis cubre los pasos de implementación demarcados por la guía de la DMA_UE: 1- asesoramiento complementario en la validación de los nuevos métodos; 2- estudios de su impacto socioeconómico y demostración de su potencial; 3- fomento del desarrollo de metodologías innovadoras de bajos costos, así como su validación; 4- oferta de programas de entrenamiento a medida; y 5- vinculación de la investigación con la implementación (Dworak et al. 2005).

Una implementación exitosa de nuevas tecnologías de monitoreo debe ir de la mano del establecimiento de normativas de gestión ambiental (Hering et al. 2010). El uso de bioindicadores cuantitativos permite establecer valores umbrales de peligrosidad de exposición a cianobacterias, para elaborar sistemas de alertas tempranas como los sugeridos por la OMS (Chorus & Bartram 1999). En esta tesis se utilizó la concentración de la clorofila *a* total y específica de cianobacterias estimada a partir de la fluorescencia *in vivo* como indicador, lo que ha sido utilizado por otros autores para generar umbrales de alerta (Izydorczyk et al. 2009; Kalaji et al. 2016). Otros trabajos han propuesto sistemas de alertas basados en otros bioindicadores alternativos como la observación visual (Oyama et al. 2015) y la ficocianina (Ahn et al. 2007; Koreivienė et al. 2014; Macário et al. 2015), que podrían ser utilizados como complemento a la aplicación de nuestro modelo. La concentración de clorofila *a* de cianobacterias, estimada mediante fluorescencia *in vivo*, ya está siendo implementada por el Consejo

Nacional del Agua en Holanda en conjunto con la clasificación visual (Ibelings et al. 2012). Estos primeros sistemas de alertas tempranas basados en la fluorescencia *in vivo* utilizan fluorómetros de altos costos y calibrados de fábrica (ejemplo: Fluoroprobe, bbe-Moldanke) (Ibelings et al. 2012), por lo que nuestro modelo marca una diferencia significativa. Por su aporte hacia una implementación más accesible de la fluorescencia *in vivo*, el método propuesto en esta tesis es innovador y puede favorecer la elaboración de sistemas de alertas de cianobacterias basados en la fluorescencia de pigmentos para Uruguay.

5.2 Conclusiones globales

En resumen, se presenta una aproximación novedosa que permitió integrar conocimientos de la fluorescencia de pigmentos *in vivo* con fines de investigación con la implementación en programas de monitoreo. Las conclusiones que se extraen de esta tesis se enumeran a continuación:

- 1- Se desarrolló un modelo de predicción de la concentración de clorofila *a* total y de cianobacterias a partir de las fluorescencias *in vivo* de la ficocianina y la clorofila *a*.
- 2- Se demostró que es posible transformar los valores reportados por los equipos para hacerlos intercomparables e independientes del estándar sólido.
- 3- Por primera vez se realizó una intercalibración entre varios fluorómetros de mano de bajos costos, utilizando múltiples estándares secundarios y aplicando cálculos de post-calibración.
- 4- Se logró corregir los efectos de interferencia óptica de la materia orgánica coloreada disuelta (CDOM) y de la turbidez, mediante coeficientes, y el efecto de los mecanismos de disipación de exceso de energía (qE), mediante un paso de 3 minutos de oscuridad previo a la medición de la fluorescencia.
- 5- Se innovó en las técnicas de monitoreo de la calidad de agua del país aplicando por primera vez la fluorescencia *in vivo* en el monitoreo de playas de toda la costa, obteniendo buenos indicadores de desempeño del modelo. Como parte de

esto se logró realizar la transferencia tecnológica a los destinatarios finales de la metodología, mediante talleres de capacitación, protocolos de uso de los equipos, y una matriz interactiva para la aplicación de los modelos de predicción.

5.3 Perspectivas

Esta tesis abarcó desde el aprendizaje de las bases teóricas de la fluorescencia *in vivo*, a la transferencia tecnológica a los técnicos y la implementación de un nuevo método biotecnológico, pasando por las etapas de calibración, evaluación de las interferencias y modelado, lo que requirió que diversas etapas con alcances diferentes se realizaran en paralelo. Esto constituye un primer paso que da lugar a nuevas investigaciones para mejorar el método y generar recursos complementarios, como se detalla a continuación.

El estándar que utilizamos en esta tesis es un plástico fluorescente y regulable manualmente, pero no se puede asociar a una concentración establecida por otros métodos. El uso de otro tipo de estándares basado en soluciones de compuestos fluorescentes y asociables a una concentración, p.ej. rodamina, permitiría independizar los modelos propuestos en esta tesis. De esta forma, se podría extender la intercalibración a equipos de diferentes fabricantes o con diferentes prestaciones, como por ejemplo fluorómetros sumergibles con servicio remoto *on-line* de adquisición de datos, que ampliarían la aplicabilidad del modelo. El desarrollo en el país de subsiguientes estudios en fluorescencia también permitiría la fabricación de fluorómetros de electrónica más sencilla, como el diseñado por Leeuw et al. (2013). Estos fluorómetros de fabricación local se podrían utilizar en monitoreos de participación ciudadana y educativa, por ejemplo en observatorios de escuelas rurales (E.F.I. Cruz de los Caminos 2013) o a través del Plan Ceibal (Duglio et al. 2014).

Otros aspectos que se pueden continuar a partir de los resultados obtenidos en esta tesis incluyen la implementación de las correcciones por CDOM y turbidez y de la exposición previa de la muestra a 3 minutos de oscuridad en los monitoreos de rutina. La aplicación de estos tres factores de corrección permitirá mejorar la fiabilidad del modelo en el campo. Estudios que se focalicen en la naturaleza de las interferencias ópticas de la matriz *in situ* y según las características propias de cada ambiente permitirán también mejorar la corrección de los resultados post-calibración, ya que en

esta tesis se modelaron sus efectos en el río Santa Lucía, que puede ser muy diferente a las playas del Río de la Plata (Cap. 2). Por ejemplo, un efecto de la matriz que no fue abarcado en este estudio fue el de las partículas no-algales (NAP), que pueden llegar a presentar un comportamiento similar a la CDOM (Kirk 1994; Babin et al. 2003) e interferir con las señales de fluorescencia *in vivo*.

La implementación de la fluorescencia *in vivo* en programas de monitoreos de calidad de agua abre la puerta a nuevas tecnologías que utilicen esta propiedad de los pigmentos fitoplanctónicos, ampliando las capacidades de monitoreo en Uruguay. Entre las tecnologías de uso creciente basadas en fluorescencia se destacan el sensoramiento remoto (satelital) de floraciones de cianobacterias (Simis et al. 2005; Stumpf et al. 2016), y las boyas fluorométricas con envío remoto de la información en alta frecuencia temporal (Izydorczyk et al. 2005; Ye et al. 2014; Kong et al. 2014). El uso de tecnologías móviles como teléfonos inteligentes (“smartphones”) con aplicaciones *in situ* para el uso de los modelos facilitaría la implementación al disminuir el equipamiento necesario, además de permitir el uso de imágenes y escalas de colores mediante fotografías en monitoreos participativos (Kotovirta et al. 2014) o a través de aplicaciones que usan la cámara del teléfono como sensor (Friedrichs et al. 2014). La experiencia de implementación de la fluorimetría de pigmentos *in vivo* podría extenderse a la integración de estas nuevas metodologías, ampliando significativamente las capacidades de monitoreo ambiental en Uruguay.

5.4 Referencias

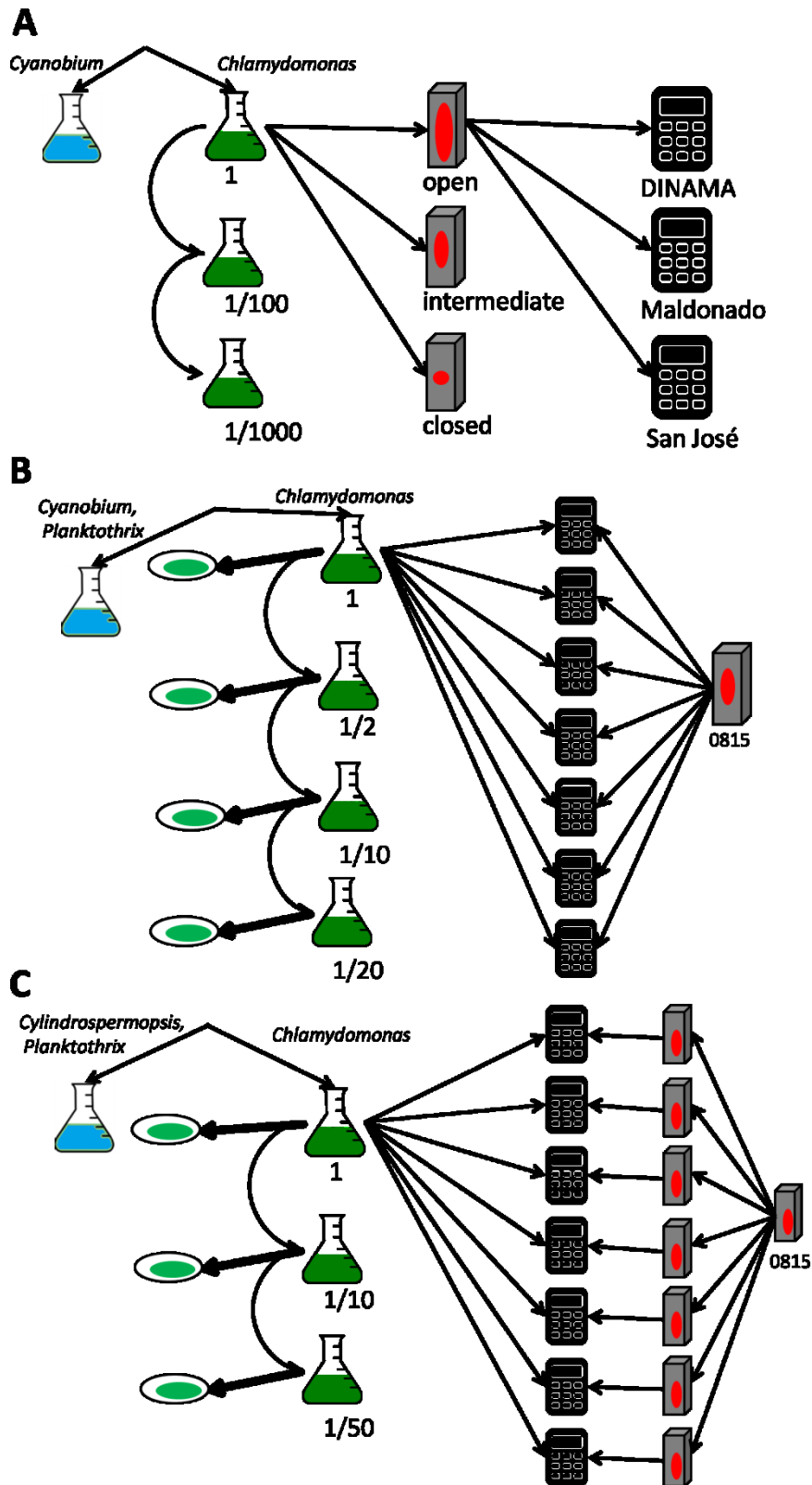
- Ahn, C.-Y., S.-H. Joung, S.-K. Yoon, & H.-M. Oh. 2007. Alternative alert system for cyanobacterial bloom, using phycocyanin as a level determinant. *J. Microbiol.* **45**: 98–104.
- Babin, M., D. Stramski, G. M. Ferrari, H. Claustre, A. Bricaud, G. Obolensky, & N. Hoepffner. 2003. Variations in the light absorption coefficients of phytoplankton, nonalgal particles, and dissolved organic matter in coastal waters around Europe. *J. Geophys. Res.* **108**: 3211. doi:10.1029/2001JC000882
- Chorus, I. 2012. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries, I. Chorus [ed.]. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt).
- Chorus, I., & J. Bartram. 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management., E & FN Spon.
- Duglio, I., S. Lara, S. Nolla, & R. Olivera. 2014. Una propuesta innovadora en la enseñanza de las ciencias utilizando sensores de Plan Ceibal. *tópos.* **6**: 17–23.
- Dworak, T., C. Gonzalez, C. Laaser, & E. Interwies. 2005. The need for new monitoring tools to implement the WFD. *Environ. Sci. Policy* **8**: 301–306. doi:10.1016/j.envsci.2005.03.007
- E.F.I. Cruz de los Caminos. 2013. Observatorios Socio-Ambientales: Una herramienta de educación ambiental en escuelas rurales.

- Earp, A., C. E. Hanson, P. J. Ralph, et al. 2011. Review of fluorescent standards for calibration of in situ fluorometers: Recommendations applied in coastal and ocean observing programs. *Opt. Express* **19**: 26768. doi:10.1364/OE.19.026768
- Friedrichs, A., J. A. J. Busch, R. Henkel, R. Heuermann, C. John, O. Zielinski, H. van der Woerd, & C. John. 2014. Measuring fluorescence by means of smart phones with the new Citclops-application. *Ocean Optics XXII*.
- Griffith, J. F., & S. B. Weisberg. 2011. Challenges in Implementing New Technology for Beach Water Quality Monitoring: Lessons From a California Demonstration Project. *Mar. Technol. Soc. J.* **45**: 65–73.
- Hering, D., A. Borja, J. Carstensen, & L. Carvalho. 2010. The European Water Framework Directive at the age of 10: a critical review of the achievements with recommendations for the future. *Sci. Total.*
- Ibelings, B. W., J. M. Stroom, M. Lüring, & W. E. A. Kardinaal. 2012. Netherlands: Risks of toxic cyanobacterial blooms in recreational waters and guidelines, p. 82–96. *In* Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries.
- Izydorczyk, K., C. Carpentier, J. Mrówczyński, A. Wagenvoort, T. Jurczak, & M. Tarczyńska. 2009. Establishment of an Alert Level Framework for cyanobacteria in drinking water resources by using the Algae Online Analyser for monitoring cyanobacterial chlorophyll a. *Water Res.* **43**: 989–96. doi:10.1016/j.watres.2008.11.048
- Izydorczyk, K., M. Tarczyńska, T. Jurczak, J. Mrowczynski, & M. Zalewski. 2005. Measurement of phycocyanin fluorescence as an online early warning system for cyanobacteria in reservoir intake water. *Environ. Toxicol.* **20**: 425–30. doi:10.1002/tox.20128
- Kalaji, H., O. Sytar, M. Brestic, I. Samborska, M. Cetner, & C. Carpentier. 2016. Risk Assessment of Urban Lake Water Quality Based on in-situ Cyanobacterial and Total Chlorophyll-a Monitoring. *Polish J. Environ. Stud.* **25**: 655–661. doi:10.15244/pjoes/60895
- Keller, A. A., L. L. Beatty, L. E. Weber, & C. A. Heil. 1990. Soluble Fluorescence: Effects on Chlorophyll Determination at Different Salinities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47**: 1700–1709. doi:10.1139/f90-195
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, University Press, Cambridge.
- Kong, Y., I. Lou, Y. Zhang, C. U. Lou, & K. M. Mok. 2014. Using an online phycocyanin fluorescence probe for rapid monitoring of cyanobacteria in Macau freshwater reservoir. *Hydrobiologia* **741**: 33–49. doi:10.1007/s10750-013-1759-3
- Koreivienė, J., O. Anne, J. Kasperovičienė, & V. Burškytė. 2014. Cyanotoxin management and human health risk mitigation in recreational waters. *Environ. Monit. Assess.* **186**: 4443–59. doi:10.1007/s10661-014-3710-0
- Kotovirta, V., T. Toivanen, M. Järvinen, M. Lindholm, & K. Kallio. 2014. Participatory surface algal bloom monitoring in Finland in 2011–2013. *Environ. Syst. Res.* **3**: 24. doi:10.1186/s40068-014-0024-8
- Leeuw, T., E. Boss, & D. Wright. 2013. In situ Measurements of Phytoplankton Fluorescence Using Low Cost Electronics. *Sensors* **13**: 7872–7883. doi:10.3390/s130607872
- Macário, I. P. E., B. B. Castro, M. I. S. Nunes, S. C. Antunes, C. Pizarro, C. Coelho, F. Gonçalves, & D. R. de Figueiredo. 2015. New insights towards the establishment of phycocyanin concentration thresholds considering species-specific variability of bloom-forming cyanobacteria. *Hydrobiologia* **757**: 155–165. doi:10.1007/s10750-015-2248-7
- Oyama, Y., T. Fukushima, B. Matsushita, H. Matsuzaki, K. Kamiya, & H. Kobinata. 2015. Monitoring levels of cyanobacterial blooms using the visual cyanobacteria index (VCI) and floating algae index (FAI). *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.* **38**: 335–348. doi:10.1016/j.jag.2015.02.002
- Simis, S. G. H., S. W. M. Peters, & H. J. Gons. 2005. Remote sensing of the cyanobacterial pigment phycocyanin in turbid inland water. **50**: 237–245.
- Stumpf, R. P., T. W. Davis, T. T. Wynne, et al. 2016. Challenges for mapping cyanotoxin patterns from remote sensing of cyanobacteria. *Harmful Algae* **54**: 160–173. doi:10.1016/j.hal.2016.01.005
- Ye, L., Q. Cai, M. Zhang, & L. Tan. 2014. Real-time observation, early warning and forecasting

phytoplankton blooms by integrating in situ automated online sondes and hybrid evolutionary algorithms. *Ecol. Inform.* **22**: 44–51. doi:10.1016/j.ecoinf.2014.04.001

Zamyadi, A., F. Choo, G. Newcombe, R. Stuetz, & R. K. Henderson. 2016. A review of monitoring technologies for real-time management of cyanobacteria: Recent advances and future direction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **85**: 83–96. doi:10.1016/j.trac.2016.06.023

ANEXO 1: DISEÑO EXPERIMENTAL DE LAS PRUEBAS DE CALIBRACIÓN



Supplementary Figure 1: Calibration experiments scheme. A) RASSS (gray boxes with red dots) opening test. Two cultures in three serial dilutions were measured with three fluorimeters each calibrated with the same RASSS and three window opening positions: closed, intermediate and open. Reported and raw fluorescence were compared to test the RASSS reliability as a standard. B) Fluorometer intercalibration with a single RASSS. Three cultures in four serial dilutions measured with seven fluorimeters calibrated with the same RASSS and a pre-established opening defined in A. C) Fluorometer cross-calibration with individually assigned RASSS for each instrument. Three cultures in three dilutions were measured with the seven fluorimeters. Individually assigned RASSS were adjusted to match the opening of the reference RASSS used in B. Results were compared across fluorimeters, and with the measurements obtained in B. Chlorophyll a concentration was measured (green circles), and results compared across fluorimeters (A and B).

ANEXO II: INSTRUCTIVO REDUCIDO PARA LA CALIBRACIÓN DIARIA, TOMA DE MUESTRA Y MEDICION CON EL FLUORÓMETRO MODELO AQUAFLUOR, MARCA TURNER

CALIBRACIÓN

Canal A= mide ficocianina → presente en todas las cianobacterias y Criptofitas

Canal B= mide clorofila a → todos los organismos del fitoplancton y plantas

La calibración del fluorómetro

es recomendable realizarla **cada día que se vaya a utilizar**. Para calibrar el fluorómetro se usa un estándar secundario que está hecho de un plástico especial. La calibración se debe realizar para los 2 canales (A y B, Ficocianina y Clorofila *a* respectivamente).

1- Presionar la tecla A/B para elegir el canal que se quiera calibrar. En la pantalla del equipo aparecerá indicado a la izquierda que canal es el que está seleccionado en ese momento.

A/B

2- Verificar el valor del estándar value para ese canal. Para ello presionar el botón “**STD VAL**”. Registrar el valor. Debe estar en 100 a menos que se haya indicado otro valor. Si no lo estuviera cambiarlo a 100 con las flechas “↑” y “↓”.

3- Presionar CAL, presionar ENTER.

CAL

ENTER

4- En la pantalla se visualizará “Insert Blank”. Colocar cubeta con blanco (agua destilada) y presionar ENTER. Mediante esta acción el fluorómetro mide el blanco que se le ha introducido.

ENTER

5- Una vez que se ha medido el blanco, en la pantalla se visualizará “Insert Cal Soln”. Retirar la cubeta con el agua destilada y colocar estándar sólido (cubeta negra), empújelo hacia abajo levemente con el dedo y presionar ENTER. Mediante esta acción el fluorómetro mide el estándar sólido que se le ha introducido.

ENTER

6- El display mostrará “Cal Complete”, y preguntará si aceptamos la calibración. Presionamos ENTER.

ENTER

7- Una vez terminada la calibración presionamos DIAG, luego de unos segundos la pantalla mostrará dos valores, uno superior que dice “%FS-Blk” y uno inferior que dice “%FS-STD”. Registrar ambos valores de cada canal cada vez que se calibre.

DIAG

8- Para fluorómetros cuyos estándares sólidos fueron intercalibrados (ej. fluorómetros de intendencias y DINAMA): dividir el %FS-STD sobre el % FS-Blk para ambos canales. Registrar este cociente en la planilla, y comprobar que: I) Este cociente no se reduzca a la mitad o se duplique con respecto al muestreo anterior. II) El cociente para el canal (B) sea mayor que el del canal (A). III) El %FS-STD sea mayor que %

FS-Blk. Si alguna de éstas condiciones no se cumpliera, repetir nuevamente el procedimiento de calibración, chequear que las pilas estén bien, que el agua destilada se encuentre en buenas condiciones y/o que la cubeta no esté rayada. Si el problema persiste comunicarlo a DINAMA.

8- Cambiar de canal con el botón A/B y repetir los pasos.

NOTA: si en algún momento en la pantalla se visualiza “Abort cal”, presionar NO (en este caso es con la flecha hacia abajo) “↓”.

A/B

PROCEDIMIENTO DE MEDIDA

Pasos para tomar las medidas:

1-Obtener la muestra de agua con un frasco blanco de boca ancha. Observar la muestra a simple vista. Registrar el estado del agua: “0” (ausencia de colonias), “1”: presencia de colonias (pocas o muchas) y “2”: floración desarrollada (espuma).

2-Si se observaran colonias, la muestra deberá agitarse enérgicamente con el frasco cerrado, con el fin de homogeneizar la muestra. Las medidas para cada canal deberán realizarse y registrarse 3 veces. Para esto se saca la cubeta del equipo y se la gira (tapándola con el dedo) entre cada medida.

3-Evitar la luz directa sobre la muestra. Colocar el equipo en posición horizontal, bien apoyado.

4-Colocar la muestra en la cubeta sin volcar en sus caras (con una pipeta p. ej). Secar con papel tissue. Colocar la cubeta en la celda del equipo. Tapar.

5-Seleccionar el canal A (botón A/B) y presionar READ. Registrar.

6-Seleccionar el canal B (botón A/B) y presionar READ. Registrar. 7-No dejar la cubeta demasiado tiempo quieta porque las cianobacterias flotan y algunas algas sedimentan.

Cuidados de la cubeta:

- No tomarla por las caras. De preferencia esquinas superiores.
- No lavarla con nada que pueda raspar. De preferencia lavar con abundante agua destilada y dejarlas invertidas que se sequen al aire.
- No lavar con solventes (alcohol, acetona, detergente).
- Si tiene manchas o polvo en las caras, secar con papel tissue.