



Instituto de investigaciones Biológicas Clemente Estable

Departamento de Microbiología

Montevideo, Uruguay

Tesis de Licenciatura en Bioquímica

2013

**Efecto de la disponibilidad de nitrógeno
sobre la expresión de genes involucrados
en la producción de saxitoxinas en
Cylindrospermopsis raciborskii.**

Paula Vico Castillo

Orientadora:

Dra. Claudia Piccini.

Departamento de Microbiología, IIBCE.

Co- orientador:

Dr. Luis Aubriot.

Sección Limnología, Fac. de Ciencias.

Índice general

Abreviaturas	3
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Cianobacterias y eutrofización de los cuerpos de agua dulce.	6
1.2 Cianobacterias: toxicidad.	7
1.3 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> : invasividad y crecimiento.	8
1.4 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> : toxicidad.	8
1.5 Saxitoxina en <i>C. raciborskii</i> : cluster génico, evolución y ruta biosintética.	10
1.6 Saxitoxina: algunos componentes de su ruta metabólica.	11
1.7 Regulación de la producción de cianotoxinas.	13
1.8 Antecedentes de <i>C. raciborskii</i> en Uruguay.	15
1.9 Justificación.	16
2. HIPÓTESIS:	17
Objetivo general:	17
Objetivos específicos:	17
3. METODOLOGÍA.	18
3.2 PCR en tiempo real: detalles de la técnica.	18
3.3 Estrategia de trabajo.	18
3.4 Diseño experimental.	19
3.5 Condiciones de cultivo.	20
3.6 Diseño de <i>primers</i> .	21
3.7 Secuenciación.	21
3.8 Puesta a punto y extracción de ARN de cultivos de <i>C.raciborskii</i> .	22
3.9 Ensayos de Retrotranscripción y PCR.	23
3.10 Determinación de la expresión relativa de <i>sxtI</i> y <i>sxtU</i> vs <i>16S</i> .	26
4. RESULTADOS.	29
4.1 Evaluación de los <i>primers</i> diseñados para <i>sxtU</i> por PCR en tiempo real.	29
4.2 Extracción de ARN de cultivos de <i>C.raciborskii</i> .	30
4.3 Detección del ADNc de los genes <i>sxtI</i> y <i>sxtU</i> por PCR en tiempo real en cada condición de	

disponibilidad de nitrógeno. _____	31
4.4 Determinación de la expresión relativa de <i>sxtI</i> y <i>sxtU</i> en las diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno. Detección de <i>nifH</i> en cada condición. _____	32
5. DISCUSIÓN. _____	37
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS _____	42
ANEXO 1 _____	43
ANEXO 2 _____	44
ANEXO 3 _____	44
Agradecimientos _____	47
Referencias bibliográficas _____	48

Abreviaturas

μl: Microlitros.

ADNc: ADN copia.

BG-11: *Blue- Green Medium. Freshwater* cianobacteria.

BSA: Seroalbúmina Bobina.

Buffer: solución química que mantiene constante el pH.

Cl₂Mg: Cloruro de Magnesio.

CYN: Cylindrospermopsina.

dcNEO: *Decabamoyl* NEO.

dNTPs: Desoxiribonucleótidos.

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

HGT:Horizontal gene transfer.

HPLC: *High performance liquid chromatography*.

Microarrays: chip de ADN en una superficie sólida a la cual se une fragmentos de ADN.

N: Nitrógeno.

NaCl: Cloruro de Sodio.

NEO: Neosaxitoxina.

ng: Nanogramos.

°C: Grados Celsius.

PCR en tiempo Real: qPCR.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PKS: Poliketido sintetasa.

Primers: oligonucleótidos iniciales.

PSP: Paralytic Shellfish Poisoning.

SXT: Saxitoxina.

Taq polimerasa: tipo de ADN polimerasa termoestable.

Resumen

Cylindrospermopsis raciborskii es una cianobacteria capaz de producir toxinas que ha captado el interés de investigadores por su creciente dispersión a nivel mundial. Recientemente se detectaron floraciones de *C. raciborskii* en lagos someros de Maldonado y Canelones destinados a potabilización y recreación. Los aislamientos de dichas floraciones mostraron poseer el *cluster* genético para la biosíntesis de saxitoxina (Paralytic Shellfish Poisoning, de carácter neurotóxico) y análogos, así como una gran capacidad de producción de la toxina. Diversos autores proponen que la síntesis de saxitoxinas se relaciona con la disponibilidad de nutrientes, sin embargo las razones que inducen la producción son aún desconocidas. Los antecedentes basados en ELISA muestran que la producción de saxitoxina es estimulada cuando *C. raciborskii* es sometida a un estado deficiente en nitrógeno. En este trabajo se evaluó el efecto de la transición de una cepa de *C. raciborskii* de un ambiente sin disponibilidad de nitrato a un ambiente con nitrato en la expresión de dos genes involucrados en la síntesis de saxitoxina (*sxtI* y *sxtU*) por qPCR. Los resultados mostraron que la expresión de ambos genes no varió debido a la disponibilidad de nitrato sino en relación al tiempo de incubación, lo cual está asociado al crecimiento de la población. Por tanto, la expresión de estos genes estaría vinculada a la fase de crecimiento y no a la presencia del nutriente. Al analizar la expresión de ambos genes por separado se vio que independientemente del tratamiento, *sxtI* (precursor directo de la toxina) aumentó significativamente a las 24h, mientras que *sxtU* (intermediario común de saxitoxina y análogos) registró su aumento significativo a las 144h. Los resultados de este trabajo sugieren por tanto que *C. raciborskii* tiene una respuesta rápida al cambio ambiental, produciendo un tipo de saxitoxina al inicio de la fase exponencial de crecimiento y sintetizando más tarde análogos de la misma. La variabilidad temporal de la expresión de la toxina durante la fase de crecimiento sugiere también la necesidad de una evaluación exhaustiva de los métodos empleados para detectar y evaluar la toxicidad de cianobacterias florecedoras.

1 Introducción

1.1 Cianobacterias y eutrofización de los cuerpos de agua dulce.

Las cianobacterias son procariontes fotosintéticos que habitan la Tierra desde aproximadamente 2700 millones de años. Tienen gran importancia desde el punto de vista evolutivo ya que son consideradas organismos clave para entender la historia y evolución de la vida en la Tierra (Tomitani et al., 2006; Whitton & Potts, 2000; Liu et al., 1997; Karl et al., 2002). Son un grupo diverso que incluye formas unicelulares, filamentosas y coloniales (Saker et al., 2009). Están ampliamente distribuidas en ambientes tanto acuáticos como terrestres, dominando los ambientes extremos como los océanos ultraoligotróficos, capas de suelo de zonas semiáridas y sistemas de agua dulce, donde con frecuencia también dominan y son sumamente competitivos frente a otros organismos del fitoplancton (Dokulil & Teubner, 2000; Kurmayer & Christiansen, 2008). Su gran plasticidad fisiológica les facilita adaptarse a condiciones extremas de temperatura, disponibilidad de luz, nutrientes y por lo tanto colonizan una gran diversidad de ambientes acuáticos (Whitton & Potts, 2000). Algunas cianobacterias poseen la capacidad de fijar nitrógeno (diazotrofia) por lo que cumplen un papel fundamental en el ciclo de este elemento (Wolk et al., 1994).

Como consecuencia de las actividades antropogénicas, los ecosistemas acuáticos sufren un incremento de la concentración de nutrientes, lo que provoca la dominancia progresiva de cianobacterias y la modificación del funcionamiento del ecosistema. Este fenómeno se conoce como eutrofización y es el enriquecimiento de nutrientes en un ecosistema acuático (Lampert & Sommers, 2007). Este proceso comienza cuando el agua recibe un aporte de nutrientes por encima de los niveles naturales del ambiente tanto de forma natural como artificial principalmente de nitrógeno y fósforo, lo que favorece el desarrollo de floraciones de cianobacterias (Pearl & Huisman, 2009; Scasso et al., 2001; Fabre et al., 2010).

Las floraciones de cianobacterias son eventos de crecimiento abrupto de la biomasa en los sistemas acuáticos de una o pocas especies en períodos de horas a días (Smayda, 1997). Las cianobacterias pueden además modificar los ambientes acuáticos al degradarse la materia orgánica producida durante las floraciones (Berg et al., 2008). La duración de este fenómeno es variable y pueden permanecer en el tiempo por varios meses (Reynolds, 1993; Bonilla et al., 2012). Esas grandes acumulaciones de biomasa de cianobacterias disminuyen significativamente la transparencia del agua y generan agotamiento del oxígeno al morir, sedimentar y ser descompuestas por la microbiota heterótrofa. Como consecuencia de este fenómeno se alteran los ciclos de los nutrientes y la trama trófica acuática. Las floraciones provocan que el olor y sabor del agua sea desagradable debido a los compuestos volátiles que sintetiza y por la

liberación de gas sulfhídrico debida a los procesos anóxicos. Esto deteriora la calidad del agua para la potabilización y la recreación.

1.2 Cianobacterias: toxicidad.

Las cianobacterias son consideradas un importante riesgo para la salud humana y animal ya que muchas de ellas producen cianotoxinas (Sivonen & Jones, 1999; Havens, 2007; Karjalainen et al., 2007) que causan diferentes afecciones a los organismos acuáticos (Paerl & Huisman, 2008). Dentro de estos metabolitos tóxicos se encuentran hepatotoxinas, neurotoxinas, endotoxinas y una serie de otros tóxicos aún no definidos (Carmichael & Falconer, 1993; Skulberg et al., 1993; Saker et al., 1999). Dichas toxinas se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades toxicológicas en: neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(S), saxitoxina y neosaxitoxina), toxinas promotoras de tumores (microcistinas y lipopolisacáridos), dermatotoxinas o toxinas irritantes (lyngbyatoxinas, apysiatoxinas y lipopolisacáridos) y hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas y cilindrospermopsina) (Carmichael, 2001, Gademann & Portman 2008). En cuanto a su estructura química, las cianotoxinas se dividen en tres grandes grupos: los péptidos cíclicos (microcistinas y nodularinas), alcaloides (neurotoxinas y cilindrospermopsina) y lipopolisacáridos (Msagati et al., 2006). Existen registros de intoxicación por cianotoxinas en personas que han sido documentados en Canadá, el Reino Unido y Australia (Kuiper-Goodman et al., 1999). En América del sur se registraron casos de intoxicación por microcistina por la utilización de agua contaminadas en Caruaru (Brasil en 1996), donde 50 personas murieron en un centro de diálisis.

En Uruguay el fenómeno de eutrofización que favorece la formación de floraciones de cianobacterias tóxicas en sistemas de agua dulce ha aumentado en los últimos tiempos como consecuencia de la creciente actividad agrícola-ganadera, industrial y la urbanización. En 1982 se tuvo el primer registro de floraciones de cianobacterias (principalmente en los meses de verano) (CARP, 1989; Bonilla et al., 1995; Bonilla, 1997; De León & Yunes, 2001; Méndez et al., 1997; Pérez et al., 1999) y desde entonces se ha comenzando a registrar organismos tóxicos (Scasso et al., 2001, Bonilla, 2009). Este fenómeno es preocupante ya que se ha vuelto frecuente en diversos sistemas acuáticos de Uruguay como ríos (Río Uruguay), estuarios (Río de la Plata), lagos y lagunas (Bonilla et al. 1995; Bonilla & Conde 2000; De León & Yunes 2001; Kruk et al., 2002; Kruk et al., 2003; Bonilla et al., 2006; Vidal & Kruk, 2008). El primer registro de floraciones de cianobacterias tóxicas en cuerpos de agua de nuestro país fue de *Microcystis aeruginosa*, especie que puede producir la toxina microcistina. En 1999 se iniciaron los análisis de toxicidad de floraciones empleando kits de anticuerpos monoclonales. Estos análisis permitieron demostrar que todas las muestras analizadas, provenientes del Río Uruguay, el Río Negro y la costa Río de la Plata-Océano Atlántico

eran tóxicas (De León & Yunes, 2001). Por otro lado, también presentaron toxinas las muestras de agua potabilizada proveniente de alguno de estos sistemas y en concentraciones superiores al límite establecido por la Organización Mundial de la Salud (1 µg de microcistina/L) (De León, 2002).

1.3 *Cylindrospermopsis raciborskii*: invasividad y crecimiento.

Cylindrospermopsis raciborskii (Orden Nostocales) es una de las cianobacterias de interés mundial capaces de producir neurotoxinas y hepatotoxinas. *C. raciborskii* fue reportada por primera vez en 1912 en Java, Indonesia (Woloszynka, 1912). Son filamentosas, poseen heterocitos y se han encontrado en muchos países tropicales y regiones subtropicales y parece estar propagándose alrededor el mundo (Padisak, 1997; Briand et al., 2002; Saker et al., 2003). La distribución de *C. raciborskii* se ha ampliado enormemente, incluyendo zonas templadas (Dokuilil & Mayer, 1996; Padisak, 1997; Saker et al., 2003; Hamilton et al., 2005; Manti et al., 2005; Stüken et al., 2006) donde esta especie es a veces capaz de establecer grandes poblaciones (Nixdorf et al., 2003) y hasta incluso dominar el fitoplancton (Briand et al., 2004b, Bonilla et al., 2012). Su gran plasticidad fenotípica o capacidad de aclimatación es lo que hace que se la considere como una especie invasora importante, capaz de tolerar, colonizar y adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales (temperatura, luz y nutrientes) (Briand et al., 2004b; Chonudomkul et al., 2004; Wu et al., 2012). A su vez, se sugiere que el éxito que ha tenido en la expansión puede estar también favorecido por el calentamiento global (Briand et al., 2004b).

C. raciborskii es además un organismo diazotrofo, es decir que puede fijar N atmosférico cuando las fuentes de nitrógeno inorgánico disuelto son extremadamente bajas. Presenta una estrategia flexible con respecto a este nutriente ya que cuando las concentraciones de N disuelto son suficientes se utiliza esta fuente, mientras que durante períodos de agotamiento puede activar la fijación del N gaseoso (Burford & Davis, 2011).

1.4 *Cylindrospermopsis raciborskii*: toxicidad.

Entre las cianotoxinas que produce esta especie se encuentran la cylindrospermopsina (CYN), que es una hepatotoxina (Ohtani et al., 1992; Li et al., 2001) y una variedad de saxitoxinas (SXT) que son neurotoxinas paralizantes (Kokocinski et al., 2009). La CYN inhibe el glutatión, la síntesis de proteínas y el citocromo P450 (Terao et al., 1994; Van Apeldoorn et al., 2007) causando síntomas patológicos en el hígado, los riñones, el bazo, el timo y el corazón (Terao et al., 1994; Falconer et al., 1999). Por otra parte,

estudios recientes han demostrado que CYN también sería genotóxica, mutagénica y poseería efectos cancerígenos (Humpage et al., 2000; Falconer & Humpage, 2001). Esta toxina fue descubierta por primera vez después de un envenenamiento en Palm Island (Queensland, Australia) en 1979, cuando 148 personas, principalmente niños, fueron hospitalizados con hepatoenteritis al ingerir agua contaminada con *C. raciborskii* de un depósito de agua potable (Kokocinski et al., 2009).

La SXT y análogos pueden causar el llamado síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de mariscos contaminados (PSP: *Paralytic Shellfish Poisoning*), el cual afecta a la salud humana y animal. Se estima que las toxinas PSP y compuestos análogos producidos por una variedad de organismos producen más de 2.000 casos de intoxicaciones en humanos en el mundo cada año, con una tasa de mortalidad de 15% (Kellman et al., 2008). Las PSP están entre las toxinas más poderosas, cuyo principal mecanismo de acción es el bloqueo selectivo de los canales de sodio en la membrana celular, evitando la transducción de señales neuronales (inhibe el impulso nervioso) causando parálisis del músculo esquelético. La SXT es una perhidropurina tricíclica (alcaloide) que puede ser sustituida en varias posiciones, constituyendo un núcleo que puede dar lugar a más de 30 análogos lo que aumenta la complejidad de su estudio (Figura 1) (Kellman et al., 2008). La SXT une a las membranas nerviosas con alta afinidad. Una sola molécula de toxina puede interactuar con un único canal de Na^+ (Catterall et al., 1979) y puede bloquear con igual éxito canales en reposo, activos o inactivos (Ceste & le Catterall, 2000) desde el lado extracelular de la membrana plasmática por oclusión de la entrada de Na^+ (Ceste & le Catterall, 2000; Pomati et al., 2004).

La SXT y sus compuestos análogos han sido reportados en dinoflagelados marinos (Shimizu, 1977; Catterall, 1980; Harada et al, 1982), en cianobacterias filamentosas (Alam et al., 1973; Humpage et al., 1994; Carmichael et al., 1997; Lagos et al., 1999; Pomati et al., 2000), y en ciertas bacterias heterótrofas (Gallacher & Smith, 1999). En ambientes de agua dulce, las toxinas PSP están casi exclusivamente asociadas a cianobacterias (Kaas & Henriksen, 2000; Pereira et al., 2000; Pomati et al., 2000). Es interesante destacar que aunque la biosíntesis de las saxitoxinas es compleja y aparentemente única, todos los organismos que la producen emplean aparentemente la misma ruta biosintética (Shimizu, 1993) la cual ha sido dilucidada recientemente.

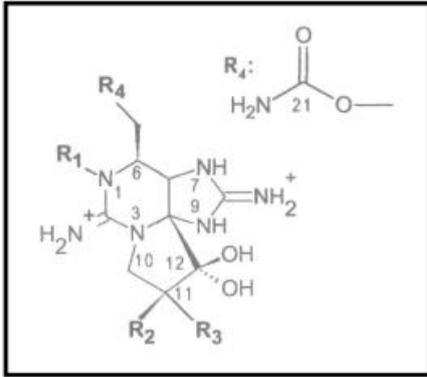


Figura 1: Estructura química de saxitoxina. R1, R2, R3 y R4, representan diferentes sustituyentes que dan origen a los derivados análogos que constituyen el grupo de toxinas que dan origen a las 26 formas moleculares (Mosher et al., 1964).

1.5 Saxitoxina en *C. raciborskii*: cluster génico, evolución y ruta biosintética.

El grupo de genes que componen el *cluster* que codifica la síntesis de saxitoxina presenta una estructura de mosaico y se sugiere que distintos genes se han incorporado a lo largo de la evolución en segmentos de tamaño variable (Kellmann, et al. 2008). Se ha identificado la secuencia completa de aproximadamente 35 kb para el grupo de genes putativos de la biosíntesis de SXT que codifica 26 proteínas implicadas en la biosíntesis, regulación y exportación de la toxina. Los análisis comparativos de secuencias asignan 30 funciones catalíticas a las 26 proteínas lo que la hace sumamente interesante y necesario su estudio (Kellmann et al., 2008). El *cluster* de SXT (con genes asignados como *sxtA* a *sxtZ*) fue identificado mediante el gen *sxtI* que codifica para la enzima O-carbamytransferasa y fue aislado inicialmente utilizando *primers* degenerados. El grupo de genes putativos responsables de la síntesis de saxitoxina se ha identificado en cinco especies de cianobacterias y se ha propuesto una ruta biosintética para SXT (Kellmann et al., 2008; Mihali et al., 2009; Moustafa et al., 2009; Stucken et al., 2010).

Otro aspecto interesante ya mencionado es que esta toxina no solo puede ser producida por cianobacterias, sino también por organismos lejanamente relacionados como son los dinoflagelados (eucariotas). La estructura, organización y similitud de secuencia parece reflejar la filogenia de los organismos productores de SXT, lo que indica que los grupos de genes podrían tener un origen antiguo en común o han sufrido eventos de transferencia horizontal de genes (HGT). Los eventos de HGT son una característica importante para la evolución de genomas procariontes. El hecho de que la mayoría de los genes SXT estén estrechamente relacionados con homólogos de otras cianobacterias, sugiere entonces que la biosíntesis de SXT pudo haber evolucionado a partir de una cianobacteria ancestral y que el resto de los genes los han adquirido sucesivamente de otras bacterias a través de HGT (Moustafa et al., 2009). La

organización estructural de genes involucrados en la síntesis de SXT ya investigados, así como la presencia de varias trasposasas relacionadas con la familia IS4 (secuencia de inserción) sugiere además que los pequeños *cassetts* de genes de SXT son móviles, sumando complejidad al modelo (Kellmann et al., 2008). La evolución en el tiempo de adquisición de los genes SXT aún no ha sido estimada, sin embargo, si tenemos en cuenta el ensamblaje del *cluster* de SXT en la evolución temprana, independientemente de las pérdidas, el reordenamiento de los genes de SXT podrían haber dado lugar a cepas no tóxicas así como a especies con diferente toxicidad (Stucken et al., 2010). Murray et al. (2011) en su análisis de cepas productoras y no productoras de saxitoxina de *Anabaena. circinalis*, *Aphanizomenon sp.* y *C. raciborskii* han encontrado que estas especies son monofiléticas y que tanto las productoras como las no productoras están estrechamente relacionadas (Beltrán & Neilan 2000, Moustafa et al., 2009). Esta característica sugiere la existencia de eventos de pérdida de genes putativos relativamente recientes en su evolución. Por otro lado, son aún desconocidas las razones por las cuales estos genes biosintéticos están restringidos solo a cuatro especies en dos órdenes de cianobacterias (Kellmann et al., 2008). En la figura 2 se muestra el *cluster* de genes de saxitoxina indicado por (Kellmann et al., 2008) para la cepa T3 de *C. raciborskii*.

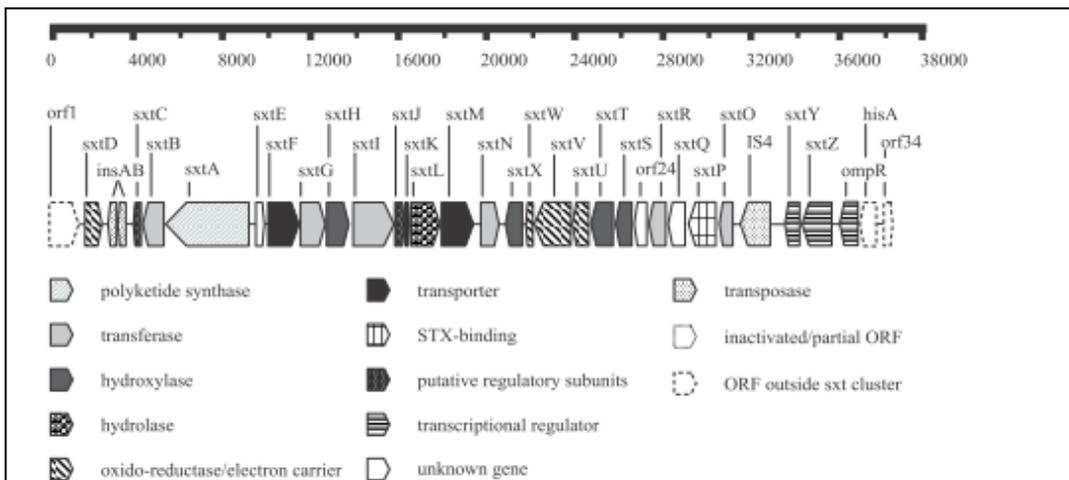


Figura 2: Estructura organizacional del *cluster* de genes de saxitoxina para *C. raciborskii* T3 (Kellmann et al. 2008).

1.6 Saxitoxina: algunos componentes de su ruta metabólica.

La síntesis de saxitoxina es una compleja ruta multienzimática y es la primera vía de alcaloides noterprenos descrita para bacterias. El inicio de la síntesis de saxitoxina involucra a una nueva clase de poliquétido sintetasa (PKS) que realiza la metilación de un acetato y la reacción de condensación de Claisen entre propionato y arginina, aminoácido que da inicio a la síntesis de SXT. Desde el descubrimiento de la agrupación

de genes de saxitoxina en *C. raciborskii* T3, Kellmann et al. (2008) indicaron que tiene un dominio típico de PKS sintetasa-incrustado en una proteína de fusión y que a su vez contiene un dominio de aminotransferasa (*SxtA*). El gen que da inicio a la biosíntesis es justamente *sxtA* y se postula que tiene un origen quimérico. Los productos del gen *SxtA* catalizan la incorporación del acetato al complejo de la enzima, su metilación posterior y la condensación de Claisen con arginina. Los pasos que siguen involucran enzimas que catalizan la formación de tres heterociclos y varias reacciones que resultan en numerosas isoformas de saxitoxina (Kellmann et al., 2008; Soto-Libe et al., 2010). Los tres heterociclos de SXT se forman por reacciones desconocidas y el intermediario resultante es metilado para formar una cadena lateral (Figura 3: paso 4), el cual es hidroxilado a través de un epóxido (Figura 3: paso 5 y 6), y transformado en un aldehído terminal. El grupo aldehído terminal que es reducido (Figura 3: paso 7 y 8) y luego O-carbamilado. Finalmente, uno de los carbonos del anillo (C-12) recibe dos grupos hidroxilos dando lugar a la toxina) (Figura 3).

La biosíntesis de SXT es catalizada por enzimas poco comunes en el metabolismo microbiano. Como ya se mencionó, se han descrito los genes putativos para cada una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de SXT. Uno de ellos es *sxtI* que codifica para una O-carbamiltransferasa, cuya función es la importante carbamilación de la cadena lateral de hidroximetilo, precursor de la molécula final de SXT. Kellmann et al., (2008b) utilizaron una PCR degenerada para identificar este gen (*sxtI*), que finalmente lo llevó a identificar la vía de la biosíntesis de SXT todo en las cianobacterias. Se ha visto que genes ortólogos a *sxtI* están presentes únicamente en cepas de cianobacterias tóxicas y tienen una gran similitud de secuencia. Esto ha llevado a Kellmann et al., (2008b) a postular que este gen estaría presente exclusivamente en organismos procariotas y se caracterizaría por una alta tasa de transferencia horizontal. Es así que los autores sugieren que el origen de *sxtI* es procariota y que evolucionó a partir de una proteobacteria ancestral (probablemente de la clase Alfabroteobacteria) y que el set de genes requeridos para la biosíntesis de SXT se dispersó en varias especies de cianobacterias por transferencia genética horizontal (Kellmann et al., 2008b).

Otro de los genes presentes en la biosíntesis de SXT es *sxtU*, el cual tiene una secuencia similar a la de la enzima alcohol deshidrogenasa de cadena corta. La enzima de función conocida con mayor similitud a esta secuencia es la clavaldehído deshidrogenasa. Se predijo que el producto del gen *sxtU* reduciría al grupo aldehído terminal de un precursor de SXT (Kellmann et al., 2008) (Figura 3: compuesto E). La acción de *sxtD*, *sxtS* y *sxtU* sería responsable de la hidroxilación y biocatalización del compuesto B hasta el E (Figura 3). La detección del compuesto F indica que la reacción final que dirige la producción completa de la molécula de saxitoxina es la O-carbamilación, sin

embargo, la secuencia actual de la reacción final que indican Kellmann et al., (2008) a través de *sxtI*, es aún desconocida.

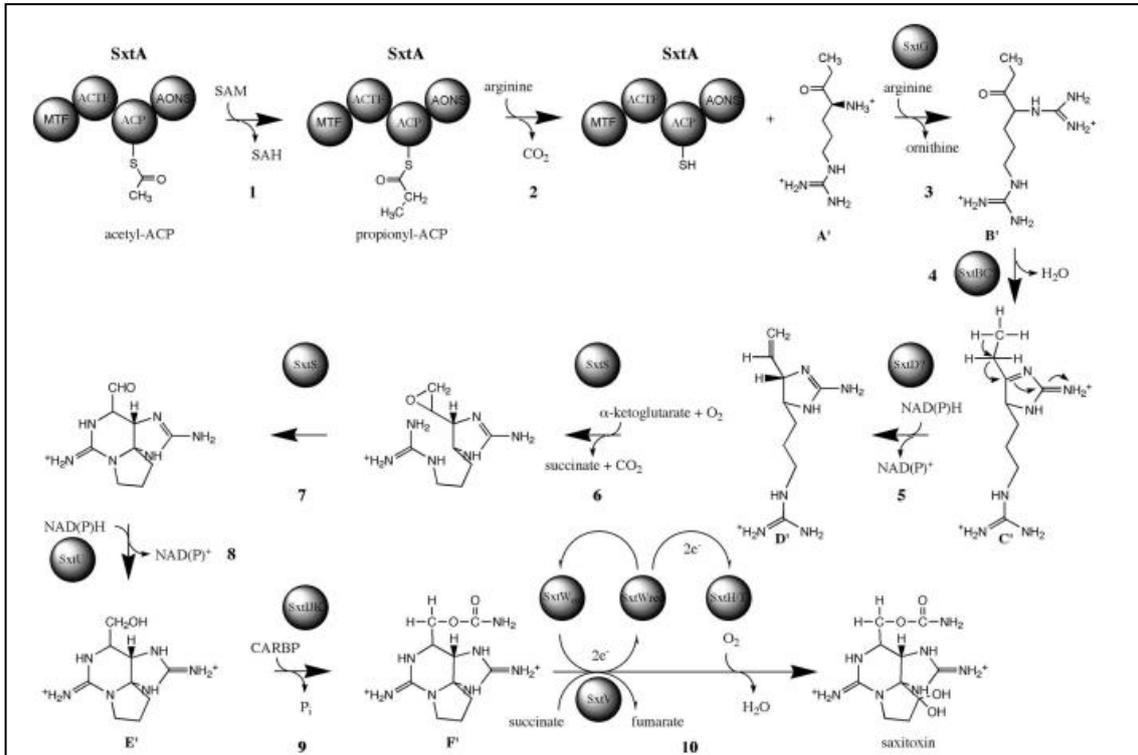


Figura 3: Vía de biosíntesis de SXT y las funciones de los genes putativos de SXT (Kellmann et al., 2008).

1.7 Regulación de la producción de cianotoxinas.

La producción de cianotoxinas parece ser constitutiva, pero la evidencia experimental sugiere que las condiciones ambientales pueden afectar su nivel de producción (Stucken et al. 2010). Varios estudios se han enfocado en determinar los posibles factores ambientales que puedan afectar la producción a pesar de los cambios radicales que ha sufrido la biosfera, ya que el *cluster* de SXT es altamente conservado a lo largo de la evolución (con un origen estimado en 2100 millones de años, ma) (Murray, et al., 2009). Dentro de dichos cambios se incluyen parámetros como la temperatura (Gorham, 1964; Westhuizen & Van der Eloff, 1985; Watanabe & Oishi, 1985), penetración de la radiación solar (Van der Westhuizen & Eloff, 1985; Sivonen 1990; Utkilen & Gjølme, 1992; Lehtimäki et al., 1994; Rapala et al., 1997), macronutrientes como nitrato, amonio, fosfato (Van der Westhuizen & Eloff, 1985; Codd & Poon, 1988; Sivonen, 1990; Lehtimäki et al., 1994; Rapala et al., 1997), elementos traza (hierro y otros) (Lukac & Aegerter 1993; Utkilen & Gjølme 1995), salinidad, CO₂, pH y presencia de depredadores (Sivonen & Jones, 1999).

Un detalle interesante en relación a la SXT es que, según estudios evolutivos, el origen del sistema genético para esta toxina se remonta a 2100 millones de años atrás, cuando la atmósfera era sustancialmente diferente a la de hoy y los organismos vivientes no habían desarrollado aún canales de sodio, los cuales son el blanco bioquímico de las SXT. Los canales de potasio son precursores evolutivos de los canales de sodio (Goldin, 2002), por lo que probablemente los canales de potasio hayan sido el blanco original de la SXT. El papel ecofisiológico de los canales de potasio en bacterias es en gran parte desconocido y el efecto de SXT en estos canales tampoco ha sido estudiado. Entonces, el hecho que este *cluster* se haya mantenido a lo largo de la evolución, sugiere que tendría un rol vital en la adaptación de las cianobacterias a su entorno. Es así que algunos autores plantean que uno de los factores que influiría en la síntesis de la toxina podría estar relacionado con el entorno, concretamente con la disponibilidad de nutrientes presentes en el ambiente y las presiones a las cuales se exponen. Saker et al., (1999) y Saker & Neilan (2001) investigaron el impacto de las diferentes fuentes de nitrógeno disueltas en la producción de CYN de aislamientos de *C. raciborskii* australianos. Curiosamente, estos estudios encontraron que el más alto contenido de CYN intracelular por HPLC se encontraba en los cultivos que carecían de nitrógeno y el más bajo, en células cultivadas con concentraciones de saturación de amonio. Lethtimaki et al., (1997) y Pattanaik et al., (2010) observaron que la concentración máxima de otra hepatotoxina (nodularina) se produce en deficiencia por N. Esta hepatotoxina, al igual que CYN y SXT también utiliza arginina como precursor para su ruta biosintética (Rinehart et al., 1994), lo que llevaría a suponer que el nitrógeno jugaría un papel importante en la síntesis de SXT y por tanto cabría esperar que a bajas concentraciones de N no se sintetice. Sin embargo, para SXT no se conoce con certeza si hay una relación entre la disponibilidad de nutrientes y la síntesis, aunque es esperable que también el estado nutricional incida en la capacidad de producción de la misma. Por otro lado, dado que *C. raciborskii* puede fijar N atmosférico, la disección del rol del N en la síntesis de SXT se dificulta.

Además de determinar los posibles factores que favorecen la producción de la toxina, conocer su rol ecológico es otra interrogante que se han planteando los investigadores desde su detección, tanto en cianobacterias como en dinoflagelados. En ambos casos, e independientemente de los factores que influyan en la producción de SXT en estos dos grupos de organismos ecológicamente distintos, sugiere que les otorga un beneficio competitivo que todavía no se ha podido comprender (Hackett et al., 2012). Existen varias hipótesis en cuanto al papel ecológico de la saxitoxina: como un método de defensa química, como almacenamiento de nitrógeno celular, o como químicos de señalización (Murray et al., 2011). Algunos autores plantean que las cianotoxinas podrían ser metabolitos secundarios (Carmichael, 1992; Paerl, 1997), moléculas orgánicas generalmente sintetizadas en una fase tardía de su ciclo de crecimiento (fase estacionaria) y luego almacenadas, que se caracterizan por no tener un rol directo en el

crecimiento bacteriano. Debido al costo energético que lleva su producción, se cree que SXT también sería un metabolito secundario. Cabe destacar que los grupos O-carbamoilo (*sxtI* codifica para la ya mencionada O-carbamiltransferasa) de ciertas bacterias están presentes en metabolitos secundarios como antibióticos y factores de nodulación (Coque et al., 1996).

1.8 Antecedentes de *C. raciborskii* en Uruguay.

Recientemente se han detectado floraciones de *C. raciborskii* en lagos someros de Maldonado y Canelones destinados a la potabilización y la recreación (Vidal & Kruk, 2008). Es de destacar que esta especie también se ha registrado durante el invierno, cuando la temperatura está por debajo de la óptima para estos microorganismos aumentando aún más la complejidad (Fabre et al., 2010). Debido al importante incremento de las floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas en ecosistemas lenticos uruguayos (Bonilla & Conde, 2000; Vidal & Kruk, 2008; Fabre et al., 2010), es sumamente necesario evaluar qué variables ambientales inciden favorablemente en la expresión de toxinas.

El grupo de fitoplancton de la Sección Limnología de la Facultad de Ciencias ha aislado dos cepas de *C. raciborskii* que, de acuerdo a la caracterización genotípica, morfológica, fisiológica y ecológica, constituirían ecotipos diferentes (Piccini et al., 2011). Asimismo, mediante métodos bioquímicos (ELISA y HPLC) y moleculares (PCR y secuenciación) se ha confirmado que ambas cepas uruguayas poseen el *cluster* genético para la biosíntesis de SXT y que la producen en altas concentraciones. Sin embargo, se ha visto que si bien las cepas uruguayas poseen los genes del *cluster* biosintético para la cilindrospermopsina, no son capaces de expresarla (Piccini et al., 2013). En base a estos hallazgos y teniendo en cuenta que esta cianobacteria ha sido encontrada en cuerpos de agua que se emplean para la potabilización y consumo, es necesario analizar la expresión de genes involucrados en la síntesis de SXT.

En el trabajo realizado por Martigani et al., (2011) (Sección Limnología de la Facultad de Ciencias de Uruguay), determinaron que la máxima producción de SXT cuantificada por el método de ELISA, de una cepa aislada de un lago del departamento de Canelones (MVCC19), se produjo cuando estuvo expuesta a la condición sin nitrato agregado con respecto a la condición de suficiencia por el nutriente. Por otro lado, en base a estudios de microarrays y PCR cuantitativo (Stucken et al., 2010b) sugirió que en *C. raciborskii* la mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de esta toxina no se encontrarían regulados a nivel transcripcional y que estarían relacionados con otras funciones celulares aún no reveladas. Dados estos hallazgos nuestro grupo de trabajo se encuentra abocado a dilucidar este aspecto.

1.9 Justificación.

El agua es un recurso natural imprescindible para el funcionamiento de todos los organismos vivos y es de vital importancia para todos los sectores socioeconómicos. Una inadecuada gestión de este recurso y el incremento de las actividades humanas traen como consecuencia, entre otras, la contaminación de sistemas acuáticos y la disminución del volumen de agua utilizable. Teniendo en cuenta que las floraciones de cianobacterias tóxicas y que su creciente incidencia es uno de los principales problemas a los que se ve expuesta la calidad del agua potable, es de gran importancia comprender los posibles factores que inducen a estos organismos a la producción de toxinas dañinas tanto para el hombre como para el resto de la biota.

En ese sentido, este trabajo se propone evaluar la influencia de la disponibilidad de N en la producción de SXT mediante la técnica de PCR en tiempo real, la cual nos permite detectar y cuantificar la expresión de genes involucrados en la síntesis de SXT en *C. raciborskii*. Para ello se analizaron dos de los genes del *cluster* biosintético de la toxina, *sxtI* y *sxtU*, que han sido previamente identificados como codificantes de enzimas con funciones bien distintas y que se encuentran en diferentes partes de la ruta biosintética: *sxtI* codifica para la enzima que tiene como sustrato el intermediario directo precursor de la SXT y *sxtU* para una enzima anterior a *sxtI* en la ruta biosintética (Kellman, 2008).

El abordaje aquí planteado involucra la realización de cultivos de un aislamiento de *C. raciborskii* y la detección de expresión de genes por qPCR. Se espera que los resultados obtenidos de esta aproximación permitan avanzar en el conocimiento del rol biológico que cumple esta toxina en relación a la dinámica de crecimiento y al ambiente. De dicha información se podrá contribuir a la generación de herramientas de monitoreo y prevención de la aparición de floraciones de cianobacterias tóxicas.

2 Hipótesis

Dada su relevancia como nutriente esencial, la hipótesis de este trabajo plantea que la variación en la disponibilidad de nitrato afecta la expresión de saxitoxina en cepas uruguayas de *C. raciborskii*.

Objetivo general:

Conocer los niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de saxitoxina en una cepa uruguaya de *C. raciborskii* (MVCC19) sometida a cambios en la disponibilidad de nitrato.

Objetivos específicos:

- 1) Poner a punto un método de extracción de ARN de *C. raciborskii* rápido y eficiente para cultivos de cianobacterias.
- 2) Diseñar y poner a punto la técnica de PCR en tiempo real para el gen *sxtU*.
- 3) Evaluar la expresión de los genes *sxtI* y *sxtU* en cultivos de la cepa de *C. raciborskii* MVCC19 durante la transición del estado sin nitrato agregado (-N) a un estado con nitrato (+N).

3 Metodología

3.1 PCR en tiempo real: detalles de la técnica.

El método elegido para estudiar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de SXT fue la técnica de PCR en tiempo real ya que en contraste con el PCR convencional (tiempo final), la detección se basa en la medición del cambio en la concentración del producto generado como incrementos en la fluorescencia durante cada ciclo registrado en tiempo real (Heid et al., 1996). La técnica de qPCR es considerada una herramienta muy útil para la detección y cuantificación de ARNm gracias a su alta sensibilidad con respecto a la técnica de PCR en tiempo final, buena reproducibilidad y robustez.

Con la técnica de qPCR, la información se obtiene en forma de curvas de amplificación a partir de las cuales es posible cuantificar la cantidad inicial de moléculas de molde con alta precisión dentro de un rango de concentraciones, basada en la medición del cambio en la concentración del producto generado como incrementos en la fluorescencia (Wong et al., 2005; Wilhelm et al., 2003; Ayra et al., 2005). Estos cambios se miden empleando un parámetro denominado Ct (*cycle threshold* o ciclo umbral) que corresponde al número de ciclos en el cual la señal de fluorescencia cruza el valor umbral, donde el nivel de señal refleja un incremento estadísticamente significativo sobre la línea de base. El fluoróforo elegido para registrar las señales fluorescentes proporcionales al producto de PCR, fue el SYBER Green ya que el mismo se une de forma inespecífica al surco menor del ADN (ADNc) doble cadena (Wittwer et al., 2001)

Para la validación de la reacción una vez finalizada se realizó una curva de *melting*. La curva de *melting* la cual se basa en aplicar un gradiente de temperatura creciente luego de la reacción, a fin de poder monitorear la cinética de disociación de los amplicones controlando la posible amplificación de productos inespecíficos (Wittwer et al., 1991, 2001).

3.2 Estrategia de trabajo.

Determinar qué factores inducen a *C. raciborskii* a la producción de toxinas llevaría a comprender las causas y la escala temporal de su expresión. Este abordaje permitiría contribuir con información para el monitoreo y prevención de la aparición de floraciones de cianobacterias tóxicas. Como las cianobacterias en los sistemas acuáticos se exponen a cambios frecuentes de la disponibilidad de nutrientes (fluctuaciones), la estrategia que se eligió para este trabajo se basó en simular a nivel de laboratorio un cambio abrupto en la concentración de nitrato en el medio y determinar cómo afecta la expresión de SXT de la cepa de *C. raciborskii* MVCC19.

Si bien hasta el momento no hay muchos trabajos en los que se estudie la expresión de toxinas por qPCR, algunos estudios ya han demostrado el potencial de esta

metodología para el análisis cuantitativo de microorganismos, y es ampliamente utilizada en ecología microbiana para medir el número de copias de un gen de interés en una comunidad, incluyendo especies que forman floraciones en muestras ambientales (Cullen et al., 2002; Fontaine & Guillot 2002; Phister & Mills, 2003; Skovhus, 2004; Suzuki et al., 2000; Vaitomaa et al., 2003). Los datos cuantitativos que se obtienen a partir de este método pueden usarse para relacionar la variación en la abundancia de genes con la variación de los factores bióticos o abióticos (Sharma et al., 2007), aumentando las posibilidades del uso de esta técnica para el control de la dinámica de las toxinas que se producen durante las floraciones (Te y Gin, 2011). En este trabajo se utilizó esta técnica porque permite detectar y cuantificar de manera rápida la posible expresión de genes involucrados en la biosíntesis de SXT en *C. raciborskii* mediante el estudio los dos genes de su *cluster* involucrados en la biosíntesis de la toxina. Para ello se seleccionaron los genes *sxtI* y *sxtU* porque han sido identificados como codificantes de enzimas con funciones bien distintas y que se encuentran en diferentes partes de la ruta: *sxtI* codifica para la enzima que tiene cómo sustrato el intermediario directo precursor de la SXT y *sxtU* para una enzima anterior en la ruta biosintética. Asimismo, dado que *C. raciborskii* es capaz de fijar N atmosférico, se determinó mediante PCR en tiempo final la presencia del gen de la nitrogenasa (*nifH*), para confirmar: a) que las condiciones de deficiencia de N eran tales y b) que aún en condiciones de baja disponibilidad de N disuelto esta especie cuenta con una fuente de N externa (fijación biológica).

3.3 Diseño experimental.

Para el diseño experimental se tomaron seis alícuotas de 75 ml de un cultivo madre de *C. raciborskii* sin nitrato. Cada alícuota fue resuspendida en 125 ml de medio BG11 (Stanier et al., 1971), de las cuales 3 fueron mantenidas en medio BG11 sin nitrato (-N, control) y las tres restantes fueron expuestas al medio BG11 completo, con nitrato en forma de nitrato de sodio (+N). De esta forma se simuló un ambiente con N disponible y así poder generar un estado de suficiencia nutricional por este elemento e inhibir la fijación de N₂. Las tres alícuotas del control se mantuvieron creciendo a expensas del N₂ fijado (-N). Una vez iniciado el tratamiento y el control, se tomaron las muestras correspondientes al tiempo 2h de cada réplica biológica (+N_{t=1} y -N_{t=1}), 6 horas (+N_{t=2} y -N_{t=2}), 24 horas (+N_{t=3} y -N_{t=3}), 72 horas (+N_{t=4} y -N_{t=4}) y a las 144hs (+N_{t=5} y -N_{t=5}). En todos los casos se tomó una muestra de cada réplica biológica.

Se tomó también una muestra directamente del matraz conteniendo el cultivo madre, para evaluar el estado del mismo, antes de iniciar el experimento a la cual se la llamó tiempo 0. En la figura 4 se detalla el diseño experimental.

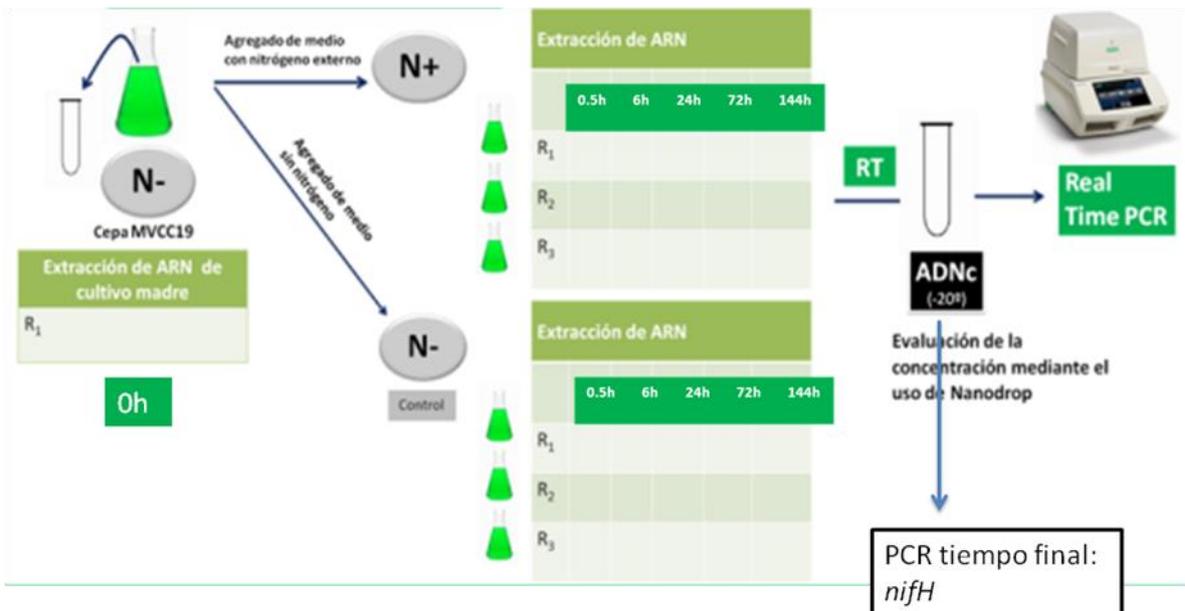


Figura 4: Esquema general del diseño experimental. Transferencia de una alícuota de cultivo de la cepa MVCC19 a un medio con nitrógeno inorgánico disuelto (+N) y a un medio sin nitrógeno (-N: control). R₁, R₂ y R₃: réplicas biológicas. RT: extracción de ARN. ADNc: ADN copia.

3.4 Condiciones de cultivo.

Los cultivos fueron realizados en el laboratorio de la Sección Limnología en el marco del proyecto FCE2009_1_2330 “Floraciones de cianobacterias acuáticas: respuestas fisiológicas adaptables y toxicidad frente a la disponibilidad de nutrientes”. Se empleó medio de cultivo BG-11 (Stanier et al., 1971), incubado con agitación automática intermitente (15 min de agitación por hora) a 25 °C y a una intensidad lumínica de 80 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La cepa empleada fue colectada en enero del 2009 en el lago Javier (34° 51' S, 56° 02' W) en el Departamento de Canelones y corresponde al aislamiento MVCC19 el cual es parte del cepario de la Sección Limnología y ha demostrado producir saxitoxina mediante HPLC (Piccini et al., 2011 y 2013).

El crecimiento de los cultivos fue evaluado en la Sección Limnología a través de la medición de la densidad óptica a 750 nm (espectrofotómetro Thermo Evolution 60), clorofila a y ficocianina por fluorescencia (Aquafluor Turner Designs).

3.5 Diseño de *primers*.

Los protocolos de PCR en tiempo real desarrollados fueron realizados empleando *primers* específicos para cada gen. Para el caso del gen *sxtI* se utilizaron los *primers* diseñados en el transcurso del proyecto “Causas y consecuencias de la dispersión de cianobacterias potencialmente tóxicas en lagos someros de Uruguay” (Proyecto FCE2007_353), que demostraron ser eficientes. Los *primers* de *sxtI* han demostrado amplificar con éxito dicho gen en ensayos de PCR en tiempo real a partir de muestras de ADNc de *C. raciborskii* en cultivo (Rigamonti et al., 2010). Los *primers* utilizados para el gen de referencia, el gen ARNr 16S de cianobacterias, fueron los descritos por Hugenholtz et al., (1998) (740F) y Jungblut et al., (2005) (809R). Los *primers* para el gen *sxtU* fueron diseñados en este trabajo. La secuencia utilizada para el diseño de los *primers* de *sxtU* fue a partir del *cluster* de saxitoxina de la cepa *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (gb|DQ787200.1|:23199-23948) (Kellmann & Mihali 2009) que están ingresados en el Gene bank. El diseño de los mismos se realizó con la herramienta disponible en el *National Center for Biotechnology Information* indicando los parámetros requeridos. La secuencia de *primers* diseñados para *sxtU* y la secuencia ya disponible para *sxtI* se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de *primers* diseñados en el laboratorio para el gen *sxtU*.

Nombre	Secuencia	Tm	Tamaño esperado	Referencia
<i>sxtU</i> FW:	ACT CCC AGA ACA TTCACA TCG	54,8 °C	79pb	Este trabajo
<i>sxtU</i> REV:	GGA ATT GGT GTG TTT GGT GC	55,1 °C	79pb	Este trabajo
<i>sxtI</i> FW:	TGC AGT GGG AGC AGC TTT AG	57.6°C	70pb	Rigamonti et al., (2010)
<i>sxtI</i> REV	GAT CGC CTG CTG TTG AAG TG	56.5°C	70pd	Rigamonti et al., (2010)

3.6 Secuenciación.

El producto de amplificación que correspondería al gen *sxtU* fue enviado sin purificar al servicio de secuenciación de Macrogen (Seoul, Korea) (<http://www.macrogen.com/eng/index/>). Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente con el programa BIOEDIT versión 7.1.11. Para la identificación de la homología buscada, la secuencia obtenida fue sometida a la función *nucleotide blast* disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> con la herramienta BLAST 2.2.27 del NCBI (Altschul, 1997).

3.7 Puesta a punto y extracción de ARN de cultivos de *C. raciborskii*.

Se puso a punto una técnica para extracción de ARN de los cultivos de *C. raciborskii* basada en la ruptura física de la pared bacteriana. Para ello, se utilizó parte del KIT de extracción ZR Soil Microbe DNA Mini Prep. El método de *bead-beating*, conjuntamente con agentes caotrópicos como el CTAB, se usa frecuentemente para extraer ácidos nucleicos de muestras complejas (Ablain et al., 2009). Dicho método permite mediante el agregado de finísimas esferas de vidrio (perlas duras o pequeñas partículas abrasivas) al medio en conjunto con un agitado, que las esferas choquen entre ellas y produzcan la ruptura física de la pared bacteriana (Ablain & Hallier Soulier, 2009; Leite & Magan, 2012). Como dicho KIT es especial para suelo, solamente fue utilizado el primer paso de las instrucciones provistas por el fabricante. Para evitar la ruptura total de las células, se puso a punto este paso del protocolo ya que un excesivo tiempo de exposición al batido con las esferas generaría una degradación de ARN, por aumento de la temperatura (Leite & Magan, 2012). Las células fueron sedimentadas por centrifugación durante 15 min a 7000rpm y luego fue traspasado el pellet al ZR BashingBead Lysis Tube provisto por el kit. Se realizó el paso uno del protocolo con la diferencia que la muestra fue sometida a vortex únicamente 90s. Las muestras de lisado obtenidas se centrifugaron luego a 8000g x 10min y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se procesó con el kit AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep (Axygen) de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. Finalmente, el ARN de las muestras se re-suspendió en 80 µl de buffer TBE y se determinó su concentración mediante espectrofotometría (Nanodrop).

3.7.1 Evaluación de concentración de cultivo requerido para los ensayos de expresión.

La concentración de células de *C. raciborskii* empleada para la extracción y posterior evaluación de la expresión de SXT se determinó previo al inicio de los experimentos. Se hicieron pruebas a partir de un volumen total de 15 ml de cultivo de *C. raciborskii* de la cepa MVCC19 probando tres concentraciones diferentes. Se evaluaron 15ml sin agregado de medio, 15 ml con una concentración de 5:15 y 15 ml con una concentración de células 1:15. La validación de ADNc implica extracción de ARN total y retrotranscripción (RT). La calidad ADNc se evaluó mediante Nanodrop. En la tabla 2 se muestra las concentraciones evaluadas mediante Nanodrop obtenidas en las tres extracciones:

Tabla2: Concentraciones de ADNc obtenidos de las extracciones de prueba de células de *C. raciborskii*.

Cultivo de <i>C.raciborskii</i>	Concentración de ADNc en ng/ μ l
Sin diluir	62.2
1:3	26.7
1:15	10.1

Cada muestra fue sometida a ensayos de PCR en tiempo real con los *primers* diseñados para *sxtU*. A pesar de haber obtenido concentraciones de ADNc variables en cada extracción, la sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real permitió detectar expresión de *sxtU* en todas (anexo 1). A fin de asegurarnos una mayor concentración de ADNc se decidió para los experimentos centrales de expresión partir de muestras de 15 ml sin diluir.

3.8 Ensayos de retrotranscripción y PCR.

3.8.1 Síntesis de ADNc.

El ARN extraído fue inmediatamente sometido a retrotranscripción para la producción de ADN copia (ADNc) con el kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Se preparó el mix siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante evaluando su concentración mediante Nanodrop. El ADNc obtenido se conservó a -20°C.

La obtención de ADNc fue realizada siempre luego de la extracción de cada toma de muestra. Una vez tomada cada muestra, las mismas fueron de inmediato al laboratorio para la realizar la extracción y síntesis de ADNc, ya que al estar trabajando con ARN se debió minimizar el stress al que se sometió el cultivo, y así poder maximizar la eficiencia y calidad de la extracción de ARN.

3.8.2 RT- PCR en tiempo real.

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen). Se utilizaron 2 µl de la dilución 1/10 de los ADNc (Rigamonti et al., 2010). El volumen final de reacción fue de 20 µl: 10 µl de agua, 7.76 µl de Mix (QuantiTect SYBR Green PCR), 0.12 µl de cada primer y 2 µl de muestra. Las condiciones de ciclado que se emplearon fueron las recomendadas por el fabricante del kit con una temperatura de *annealing* de 52 °C. Al finalizar se realizó la curva de *melting* para verificar la eficiencia de la reacción. El termociclador utilizado para los ensayos de PCR en tiempo real fue Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO RAD) y las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Protocolo estandarizado para la amplificación de los genes *sxtI* y *sxtU* por PCR en tiempo real

	Temperatura	Tiempo	
<i>Hold</i>	50°C	2 min	40 ciclos
<i>Hold2</i>	95°C	15 min	
Desnaturalización	94°C	15 seg	
<i>Anneling</i>	52°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
<i>Melting</i>	65°C a 95°C	Aumentando 1°C cada 4 seg	

3.8.2.1 Determinación de eficiencias de amplificación.

La eficiencia de una reacción de qPCR es un indicador del rendimiento e indica cuanto del gen de interés (blanco) está siendo producido en cada ciclo de la reacción. Una eficacia del 100% significa que con cada ciclo se ha duplicado el gen de interés. Para la evaluación de la eficacia de la reacción, se debe generar una curva estándar utilizando diluciones seriadas de una muestra representativa a través de un rango dinámico relevante. La eficiencia se calcula mediante:

$$\text{Eficiencia (exponencial)} = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Para una exacta cuantificación es necesario que la eficiencia del gen de referencia y de las muestras sea similar (mayor o igual) a 90% ya que pequeñas variaciones en la

eficiencia de reacción conlleva a grandes variaciones en los valores de expresión (Pfaffl, 2001); Vandesompele et al., (2002).

La eficiencia de amplificación se determinó mediante una curva de calibración con diluciones seriadas de ADNc de cada gen (*sxtI*, *sxtU* y *16S*) La eficiencia de la reacción calculada a partir de $[10^{(-1/\text{pendiente})}]-1$ se determinó a partir de la muestra de ADNc obtenida en el tratamiento con nitrato y corresponde a la réplica biológica número tres tomada a las 6hs (T=1) de iniciado el experimento por contener una buena cantidad de ADNc.

Para los tres genes (*sxtI*, *sxtU*, y *16S*) se determinó la eficiencia partiendo de la muestra elegida con diluciones seriadas 1/10, 1/100 y 1/1000. En el anexo 2 se muestra las curvas de amplificación de cada dilución para cada gen y su correspondiente curva de calibración.

3.8.3 PCR en tiempo final.

3.8.3.1 PCR en tiempo final: gen *sxtU*.

Previo al envío de secuenciación de los amplicones obtenidos con los *primers* diseñados para *sxtU* se realizaron ensayos de PCR en tiempo final, con el fin de obtener una concentración de ADN adecuada. Se realizaron 5 reacciones de PCR en tiempo final con un volumen final cada una de 25 μ l: 16.41 μ l de agua, 2.9 μ l de Buffer, 1.75 μ l de Cl_2Mg , 0.37 μ l de dNTPs, 0.37 μ l de BSA, 0.5 μ l de cada *primer*, 0.2 μ l de Taq polimerasa y 2.0 μ l de muestra.

Las condiciones de ciclado establecidas para *sxtU* se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Protocolo estandarizado para la amplificación del gen *sxtU* por PCR en tiempo final en cultivos de *C.raciborskii*

Condiciones de ciclado para <i>sxtU</i> para PCR en tiempo Final			
	Temperatura	Tiempo	
Inicio	94 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	30 seg	29 ciclos
Hibridación	45 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión final	72°C	7 min	

3.8.3.2 PCR en tiempo final: gen *nifH*.

Se realizaron ensayos de PCR en tiempo final también para la detección de genes *nifH* en ambas condiciones nutricionales utilizando las muestras de ADNc obtenidas. Para ello, utilizando las réplicas biológicas de cada tratamiento (+N y -N) se hizo un *pool* de muestra de cada tiempo. Las reacciones de PCR en tiempo final tuvieron un volumen final de 25 µl: 16.41 µl de agua, 2.9 µl de Buffer, 1.75 µl de Cl₂Mg, 0.37 µl de dNTPs, 0.37 µl de BSA, 0.5 µl de cada primer, 0.2 µl de Taq polimerasa y 2.0 µl de muestra. Los *primers* utilizados fueron los establecidos por Gugger et al., 2005 (*nifH* y *nifHr*) y las condiciones de ciclado para la reacción se establecen en la tabla 5.

Tabla 5: Protocolo indicado por Piccini et al., 2011 para la amplificación del gen *nifH* por PCR en tiempo final en cultivos de *C. raciborskii*

Condiciones de ciclado para <i>sxtU</i> para PCR en tiempo Final			
	Temperatura	Tiempo	
Inicio	94 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	1 min	30 ciclos
Hibridación	58 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	

3.8.3.3 Electroforesis.

Los productos de PCR obtenidos para *sxtU* fueron separados en geles de agarosa 0.9 % para el caso de *sxtU* en TBE 0.5X (90V 15 min) revelado con gel RED y de 0.9 % para el caso de *nifH* en TBE 0.5X (90V 20 min), también revelado con gel RED.

3.9 Determinación de la expresión relativa de *sxtI* y *sxtU* vs *16S*.

Para la cuantificación relativa de la expresión génica de la toxina, el ADNc obtenido en cada réplica de cada tratamiento fue sometido a los ensayos de PCR en tiempo real. Todos los ADNc se analizaron por duplicado, aceptándose diferencias en los Ct de ± 1 ciclo y un único pico de *melting* en la posición característica del amplicón. Como el termociclador permite utilizar placas con 96 pocillos fue posible analizar en un único ensayo todas las muestras correspondientes a cada tratamiento (+N y -N), permitiendo además incluir muestras para determinación de la eficiencia de la reacción.

La estrategia correcta para la cuantificación dependerá del objetivo de cada experimento. En este caso se utilizó una cuantificación relativa ya que es la que permite determinar los cambios en los niveles de ARNm de un gen de interés a través de múltiples muestras, expresando estos cambios en relación a los niveles de un ARN de control interno (gen de referencia), donde las unidades son irrelevantes, (Orlando et al., 1998; Vandesompele et al., 2002; Hellemans et al., 2006; Pfaffl, 2004) y sin necesidad de tener una curva de calibración o estándares con concentraciones conocidas (cuantificación absoluta) (Bustin, 2002).

La cuantificación relativa de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de saxitoxina se basó en los niveles de expresión del ARNm del gen *sxtI* y *sxtU* vs. ARNr *16S* como gen de referencia. En nuestra experiencia, el modelo aplicado es el descrito por Pfaffl, (2001) ya que permite cuantificar las diferencias en la expresión del gen problema en relación a la expresión del gen de referencia combinando la cuantificación relativa y la normalización, en un único cálculo. Este modelo a su vez, corrige las diferencias entre los dos ensayos, al incluir en el cálculo las eficiencias de amplificación del gen de interés y la del gen de referencia. El cociente de expresión relativa se calcula basándose en la eficiencia y la variación de Ct entre una muestra problema y una muestra control, y se expresa en comparación al gen de referencia:

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target} (Ct_{control} - Ct_{muestra})}}{(E_{ref})^{\Delta Ct_{ref} (Ct_{control} - Ct_{muestra})}}$$

Donde E_{target} es la eficiencia de qPCR del gen de interés y E_{ref} es la del gen de referencia (*16S*). Para el cálculo de expresión, con este método sólo se necesitan los valores de las eficiencias individuales y las diferencias de Ct de cada transcripto.

Entonces, en este trabajo para la determinación de la expresión relativa se empleó la siguiente ecuación (Ec.1):

$$\text{Expresión Relativa}_{(t=n)} = \frac{(E_{sxtI})^{\Delta Ct_{sxtI} (Ct_{control} (t=0) - Ct_{muestra} (t=n))}}{(E_{16S})^{\Delta Ct_{16S} (Ct_{control} (t=0) - Ct_{muestra} (t=n))}}$$

(Ec. 1)*

*se ejemplifica con el gen *sxtI* pero esta ecuación también es válida para *sxtU*.

Los valores utilizados como **Ct control** para cada réplica biológica (tanto para el gen problema -*sxtI* y *sxtU*- como para el gen de referencia) corresponden a los Ct obtenidos para cada gen en el cultivo madre. Para el cálculo de los ΔCt de cada tiempo, se

comparó siempre ese mismo valor de **Ct control** con respecto al Ct de su correspondiente réplica.

4 Resultados.

4.1.1 Evaluación de los *primers* diseñados para *sxtU* por PCR en tiempo real.

Los ensayos de PCR en tiempo real a los que fueron sometidos los cultivos de la cepa MVCC19 de *C. raciborskii* permitieron probar que los *primers* diseñados para el gen *sxtU* amplificaron con éxito en las mismas condiciones previamente establecidas para el gen *sxtI*. En la figura 5 se muestra el gen *sxtU* y *16S* amplificados por qPCR.

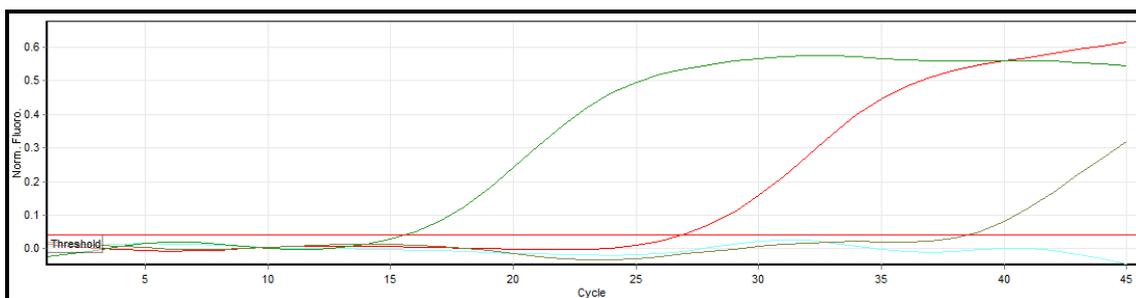


Figura 5: Curvas de amplificación del gen *sxtU* y *16S* (unidades de fluorescencia vs ciclos de amplificación). En verde se observa la curva correspondiente al *16S* y en rojo la correspondiente a *sxtU*.

En la figura 6 se muestra el gel de agarosa donde se corrieron los amplicones obtenidos mediante qPCR para *sxtU* y *16S*. No se observó amplificación inespecífica.

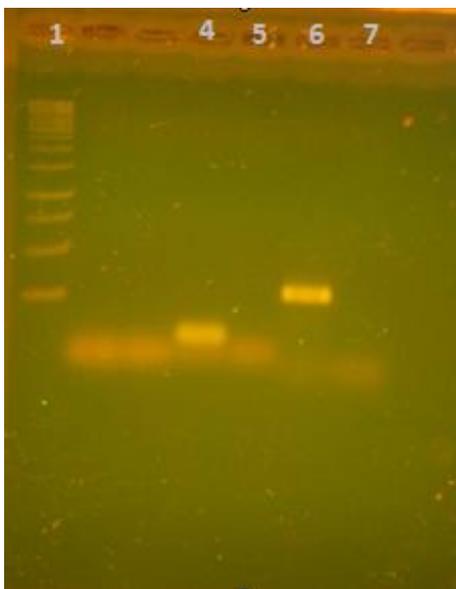


Figura 6: Electroforesis en gel de Agarosa 1.5% correspondiente a los amplicones obtenidos por PCR en tiempo real para *sxtU* y *16S*. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1kb. Carriles 2 y 3: vacíos. Carril 4: *sxtU*; 5: blanco *sxtU*; 6: *16S*; 7: Blanco *16S*.

4.1.2 PCR en tiempo final.

En la figura 7 se muestran los amplicones obtenidos a partir del ensayo de PCR en tiempo final con los *primers* diseñados para *sxtU* que fueron enviadas al servicio de secuenciación.

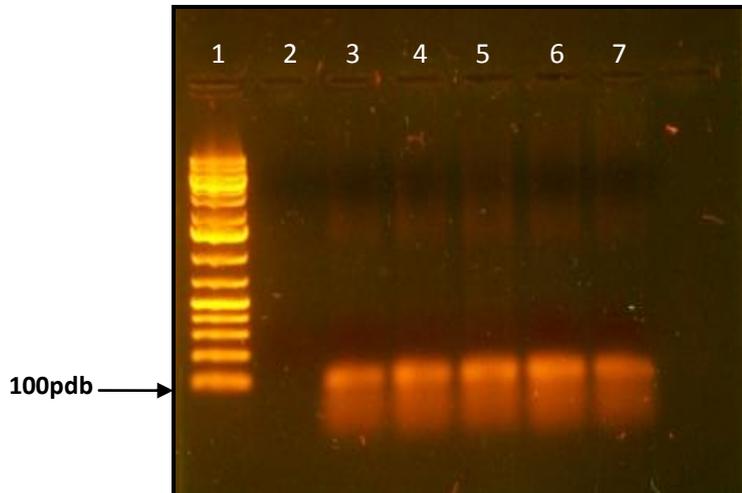


Figura 7: Electroforesis en gel de Agarosa 0.9% correspondiente a los amplicones obtenidos por PCR en tiempo final para *sxtU*. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1kb plus. Carril 2: Blanco de *sxtU*; Carril 3a7: *sxtU*.

4.1.3 Especificidad de los *primers*.

Se determinó la identidad de la secuencia obtenida para *sxtU* con secuencias de la base de datos GenBank. La secuencia que dio mayor % de identidad fue la de *C. raciborskii* T3; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/114462345>. Esto confirmó la especificidad de los *primers* diseñados.

4.2 Extracción de ARN de cultivos de *C. raciborskii*:

El método desarrollado para la extracción de ARNm mostró ser efectivo. Las concentraciones de ADNc obtenidas para cada extracción se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Concentraciones de ADNc obtenidas de cada alícuota en cada tiempo de incubación correspondiente tratamiento determinadas mediante Nanodrop.

Réplicas biológicas		Concentración de ADNc ng/ μ l				
		T=1 (0.5hs)	T=2 (6hs)	T=3 (24hs)	T=4 (72hs)	T=5 (144hs)
Tratamiento con Nitrato	N+ (R1)	35.85	45.35	44.6	51.85	44.75
	N+(R2)	27.40	52.85	39.85	44.85	32.75
	N+ (R3)	48.65	57.30	40.90	48.10	61.50
Tratamiento sin Nitrato	N- (R1)	49.30	27.35	42.85	49.50	31.45
	N- (R2)	49.85	47.55	39.05	29.30	45.30
	N- (R3)	96.85	10.20	45.25	34.00	36.85
ADNc ng/ μ l						
t=0		35.00				

La cantidad de ADNc obtenida entre cada replica fue variable, aunque a pesar de ello, en todas las extracciones se logró obtener una cantidad suficiente para realizar los ensayos de expresión.

4.3 Detección del ADNc de los genes *sxtI* y *sxtU* por PCR en tiempo real en cada condición de disponibilidad de nitrato.

La detección de la expresión de saxitoxina fue observada mediante las curvas de amplificación obtenidas por PCR en tiempo real. En la figura 8 se observan las curvas de *melting* para los genes estudiados en cada tratamiento (+N y -N).

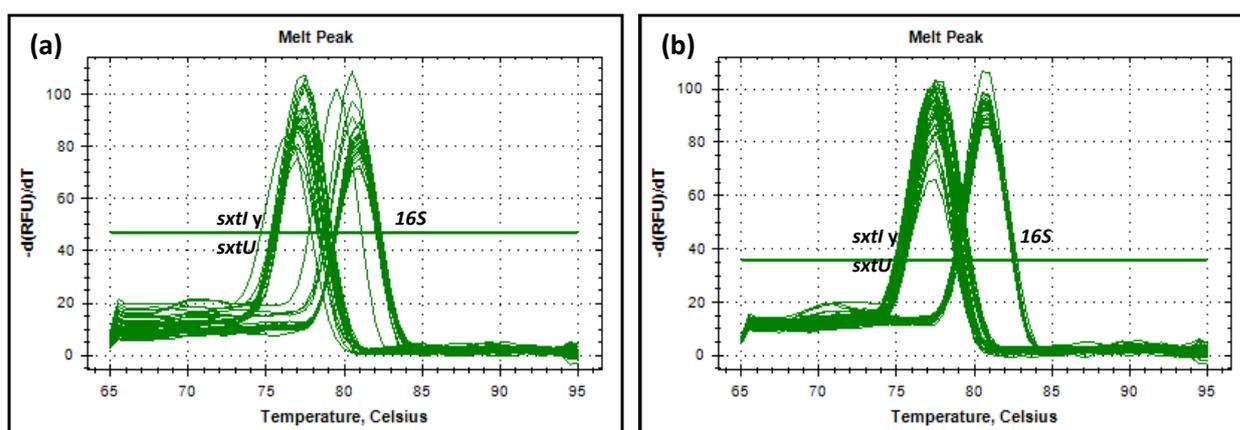


Figura 8: Curvas de *melting* para los genes *sxtI*, *sxtU* y *16S*. (a) tratamiento sin Nitrógeno (-N). (b) tratamiento con Nitrógeno (+N).

Los tres genes analizados mostraron la misma T_m en ambos tratamientos lo que indica que no hay amplificación inespecífica y que los *primers* son específicos para cada gen. Los genes de saxitoxina tienen su T_m en 77.00 ± 1 °C y el gen *16S* en 80.50 ± 1 °C. Las curvas de amplificación se adjuntan en el anexo 3.

4.4 Determinación de la expresión relativa de *sxtI* y *sxtU* en las diferentes condiciones de disponibilidad de Nitrato. Detección de *nifH* en cada condición.

Luego de obtener la eficiencia de amplificación de *sxtI*, *sxtU* y *16s* se calculó para cada tratamiento la expresión relativa de los genes en estudio. Como ya se mencionó, las curvas de eficiencia de *sxtI*, *sxtU* y *16s* se muestran en el anexo 2.

Como el cultivo es unialgal pero no axénico, se consideró a cada réplica biológica de cada tratamiento como repeticiones del mismo experimento. Para un mejor seguimiento de cada gen la expresión relativa de cada uno analizó por separado. Para ello, se graficó el promedio de la expresión relativa de *sxtI* y *sxtU* obtenida por duplicado en cada réplica biológica en función de los tiempos de incubación. En la figura 9 se muestra la expresión relativa de *sxtI* y *sxtU* en +N y -N en función de los tiempos incubación.

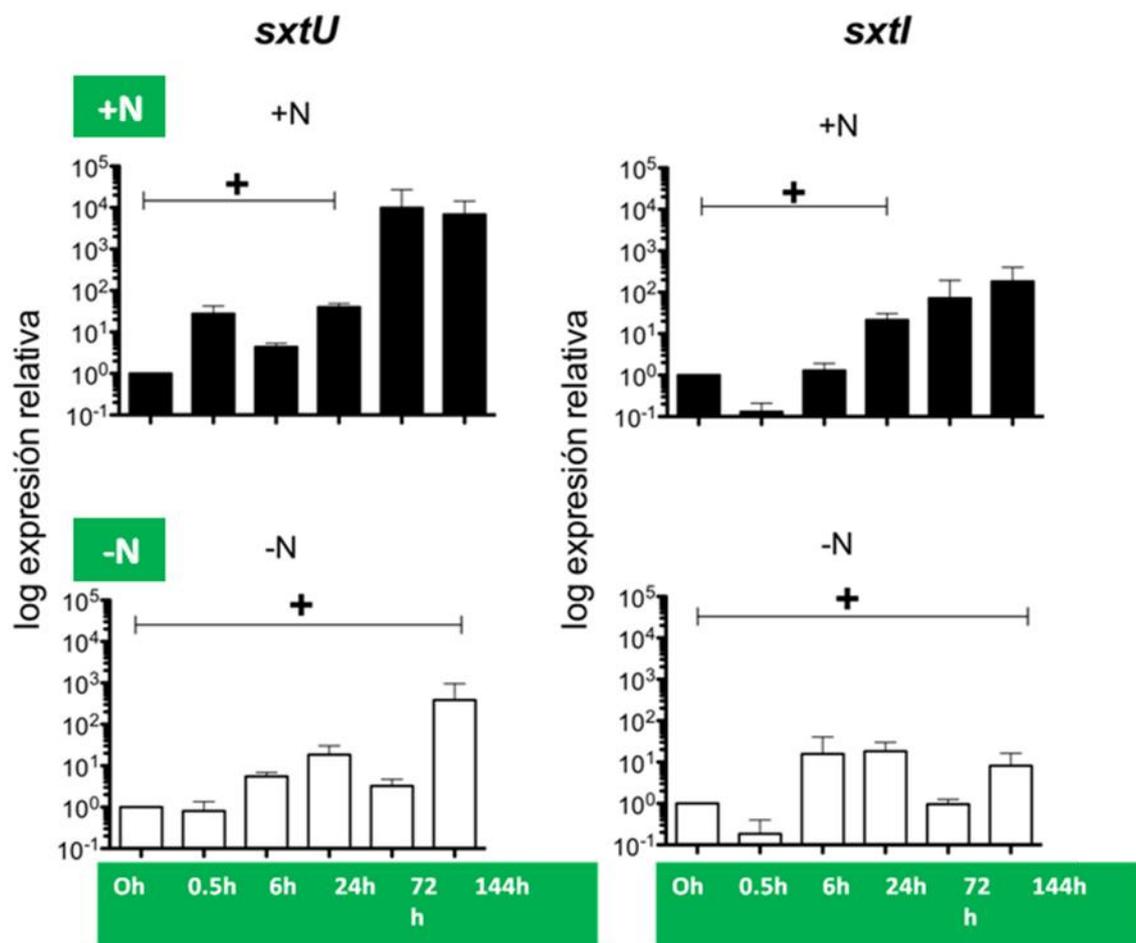


Figura9: Expresión relativa de *sxtI* y *sxtU* en cada condición (+N y -N) durante 144 de incubación. (a) Expresión relativa de *sxtU* en +N. (b) Expresión relativa de *sxtU* en -N. (c) Expresión relativa de *sxtI* en +N. (d) Expresión relativa de *sxtI* en -N. Se indica con “+” los tiempos de incubación donde se detectó expresión de *nifH*.

El análisis de expresión relativa de *sxtI* y *sxtU* entre los dos tratamientos o condiciones de cultivo mostró que en ambos genes ésta es significativamente mayor cuando hay nitrato disponible en el medio (+N) (ANOVA, $p < 0.0001$). A pesar de esta diferencia en niveles de expresión entre condiciones, la tendencia en la expresión de ambos genes tuvo un patrón similar, mostrando un aumento hacia el final del experimento.

Cuando se analizó cada gen por separado, en el caso de *sxtU* se observó que en ambas condiciones existieron diferencias significativas en la expresión relativa determinada a cada tiempo de incubación (ANOVA, $p < 0.0001$). Sin embargo, en la condición -N la tendencia mostró mayor variabilidad, observándose una disminución a las 72 h de incubación.

Para el caso de *sxtI*, al analizar las diferencias de expresión entre tiempos de incubación se detectaron diferencias significativas en la condición +N entre los tiempos iniciales (0, 6 y 24 h) y el tiempo final (144 h) (ANOVA, $p < 0.05$). En el caso de la condición -N la variabilidad entre tiempos fue mayor, encontrándose también diferencias significativas en la expresión de este gen entre el tiempos inicial (0 h) y final (144 h) (ANOVA, $p < 0.05$).

Los análisis de correlación entre tratamientos para cada gen fueron hechos a través del test de Spearman. De esta forma se determinó que para *sxtI* la expresión relativa entre ambos tratamientos se correlaciona de manera significativa. Ambos aumentan de manera relacionada y similar.

Para *sxtU* en cambio, el análisis no mostró correlación entre ambos tratamientos. En este caso hay una dispersión mayor de los datos en los tiempos de incubación tres y cuatro con respecto a los mismos tiempos para *sxtI*.

Se analizó por PCR en tiempo final la presencia de ARNm de *nifH* en cada tiempo de incubación en ambos tratamientos. Se encontró la expresión del gen *nifH* para el tratamiento -N en todos los tiempos analizados. Para el tratamiento +N, solo se detectó la expresión del gen en los tiempos de incubación iniciales (0.5h y 24h) y no se detectó expresión en los tiempos finales. En la figura 10 se muestra el resultado de la electroforesis conteniendo las bandas indicadas para el gen. En la figura 9 se encuentra señalado con (+) los tiempos de incubación donde se observó expresión de *nifH*.

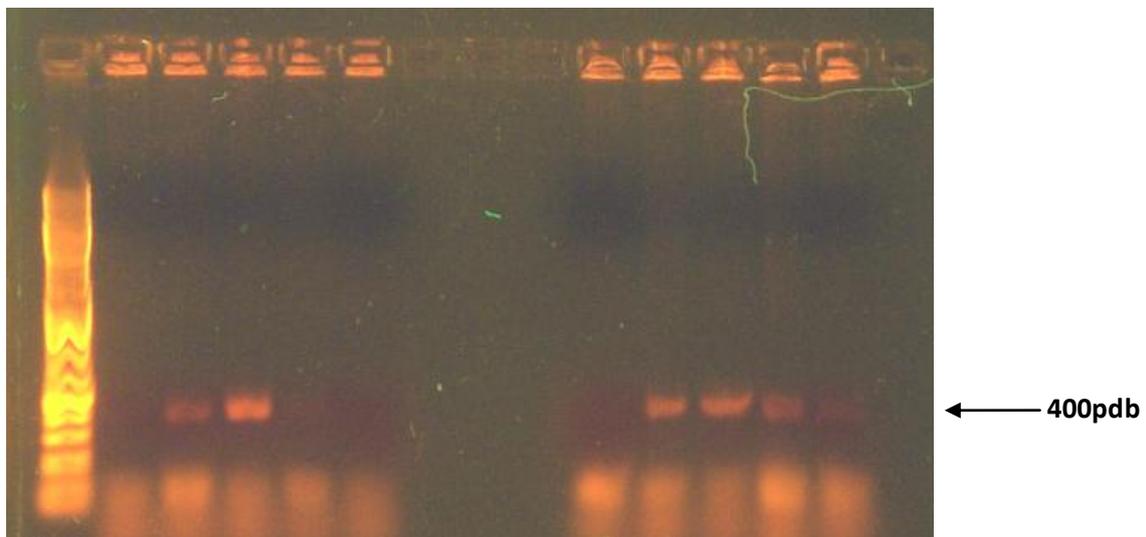


Figura 10: Gel de Agarosa 0.9% correspondiente a los amplicones obtenidos por PCR en tiempo final para *nifH*. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1kb. Carril 2: Blanco *nifH*; 3: t=1, 0.5h +N; 4: t=3 24h +N; 5:t=4 72h +N; 6:t=5 144h +N; 7:Blanco; 8: t=1 0.5h -N; 9:t=3 24h -N; 10: t=4 72h -N; 12: t=5 144h -N

4.4. 1 Evaluación del crecimiento de *C. raciborskii*. Relación con la expresión relativa obtenida para *sxtI* y *sxtU* en cada tiempo de incubación.

Se evaluó el crecimiento de la cepa en las condiciones de cultivo ensayadas mediante densidad óptica de los cultivos. Si bien las extracciones (y posterior evaluación de la expresión) se hicieron hasta las 144hs la medición de la densidad óptica se continuó hasta el día 16 de comenzado el experimento. La figura 11 muestra la curva de crecimiento para *C. raciborskii* en las dos condiciones de disponibilidad de nitrato (+N y -N).

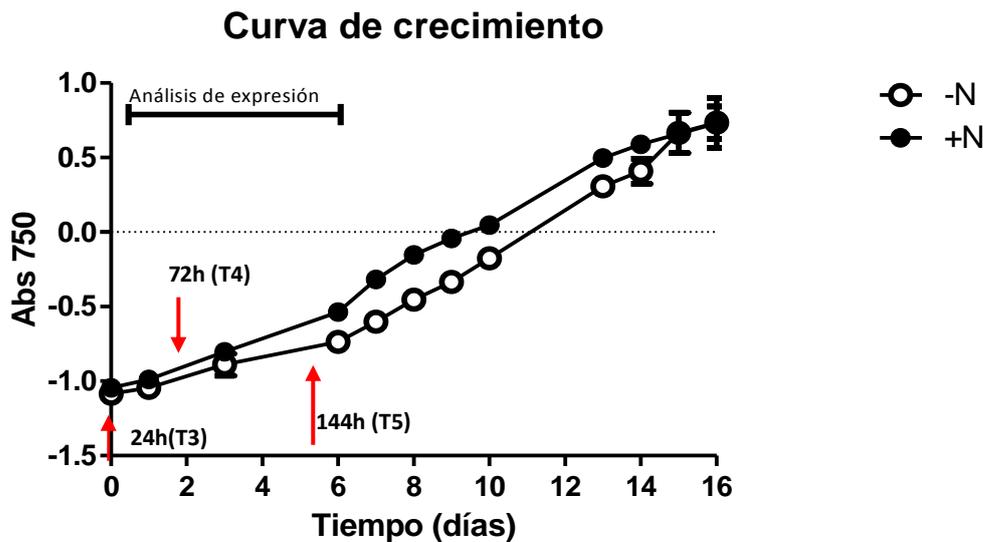


Figura 11: Curva de crecimiento de *C. raciborskii* para los dos tratamientos con (+N) y sin (-N) disponibilidad de nitrógeno inorgánico disuelto. Las flechas indican los tiempos donde se realizaron las extracciones en relación a la curva de crecimiento. El eje y corresponde a la densidad óptica medida como absorbancia a 750 nm.

Si bien las curvas de crecimiento en ambas condiciones mostraron una tendencia similar, en el caso +N mostraron una velocidad de crecimiento mayor aunque no significativa (μ -N: $0.14 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$; μ +N: $0.19 \pm 0.06 \text{ d}^{-1}$; t, p = 0.2), sobre todo durante la fase en que se determinó la expresión génica. Al cabo de 16 días los cultivos en ambas condiciones llegaron a los mismos valores.

Al relacionar la dinámica de crecimiento de *C. raciborskii* con la expresión de cada gen en función del tiempo de incubación es posible observar la evolución de la expresión durante el crecimiento de la población (figura 9 y 11).

Al inicio del cultivo en ambas condiciones la expresión relativa que registró *sxtU* fue más de un orden de magnitud mayor en el tratamiento +N con respecto a -N. Durante las primeras 24 h, cuando los cultivos estaban aún en fase de latencia, los niveles de expresión relativa de este gen se mantuvieron similares en ambos tratamientos. Sin embargo, a partir de las 72 h y al comienzo de la fase exponencial observada por densidad óptica (144h), los niveles de *sxtU* aumentaron significativamente ($p < 0.05$) en relación a los demás tiempos de incubación tanto en -N como en +N. Pese a las diferencias significativas ya mencionadas entre ambos tratamientos, el aumento de expresión relativa más pronunciado fue registrado a los tiempos de incubación finales.

En el caso de *sxtI* el aumento de expresión relativa fue más pronunciado durante los tiempos iniciales y se hizo menos abrupto hacia el final del experimento de expresión (144 h). En la condición -N y al igual de lo observado para *sxtU*, al comienzo de la fase exponencial de crecimiento (72h) mostró un descenso de su expresión relativa.

5 Discusión

El posible efecto de la disponibilidad de nitrato en a la síntesis de saxitoxina en *C. raciborskii* fue investigado a partir de cultivos de la cepa MVCC19 en condición de disponibilidad o carencia de dicho nutriente durante seis días. Los resultados de este trabajo mostraron que los dos genes analizados (*sxtU* y *sxtI*) desplegaron niveles de expresión relativa significativamente mayores en los cultivos que fueron expuestos al aporte de nitrato . Pese a esto, la tendencia de expresión relativa de cada gen en ambos tratamientos fue similar. Este hecho sugiere que el efecto que tiene el nutriente sobre el crecimiento de la cepa sería lo que habría provocado las diferencias en cuanto a la expresión relativa de *sxtI* y *sxtU* entre tratamientos, y no la presencia del propio nutriente. Sin embargo, el nivel de expresión relativa que se registró de cada gen fue diferente. En ambos tratamiento el gen *sxtU* tuvo mayor expresión relativa que el gen *sxtI* y esta diferencia podrían deberse a que cada gen se encuentra en distintas etapas de síntesis de la toxina.

El nitrato es un nutriente estimulador del crecimiento que influye positivamente en la tasa de crecimiento y en la actividad metabólica. Aunque el ingreso de un pulso de nitrato a cultivos de *C. raciborskii* favoreció la expresión de genes involucrados en la síntesis de SXT, la disponibilidad de mismo no parece ser determinante para que pueda expresarla. Los cultivos expuestos al tratamiento –N también registraron un aumento en los niveles de expresión relativa aunque en menor proporción. La producción de SXT entonces no estaría directamente influida por la presencia de N sino que sería un efecto de la mayor tasa de crecimiento de la población. Es decir, el evento de síntesis de toxina podría estar mayormente vinculado a la división celular del organismo y a la actividad metabólica durante el propio crecimiento, inducido por una condición nutricional favorable para el crecimiento masivo. Este hecho se relaciona con lo propuesto por Orr & Jones (1998) para otra cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, quienes sugieren la existencia de una correlación lineal directa entre la división celular y las tasas de producción de microcistina. Dicha relación sería independiente del algún factor ambiental que pueda influir o no en la división celular y proponen considerar a la toxina como con compuesto nitrogenado esencial en las cianobacterias. Esto no implica necesariamente que la producción de toxinas esté asociada al ciclo de división celular (Kosol et al., 2009). En términos fisiológicos, los nutrientes y otros factores que intervienen en el crecimiento (luz, temperatura, etc.), provocarían un efecto indirecto en la producción de toxinas a través del crecimiento y la división celular y no un efecto directo en la biosíntesis o vías catabólicas (Orr & Jones, 1998). En particular, el aporte del nutriente a un ambiente que se encuentre limitando el crecimiento provocaría la estimulación del crecimiento exponencial (floración), e indirectamente, de la producción de SXT.

Al analizar la expresión por separado de cada gen se observó que independientemente del tratamiento, *sxtI* aumentó rápidamente varios órdenes de magnitud a las 24h. Considerando que el producto del gen *sxtI* es el precursor directo de SXT, el comienzo de una floración funcionaría como un evento estimulador de la síntesis de la toxina. Esto podría explicar que se registre una significativa concentración de la toxina incluso cuando hay poca biomasa (ej. fase lag). Estos resultados también sugieren que la producción de la toxina estaría mayormente relacionada al estado fisiológico en que se encuentre la población que a la disponibilidad del propio nutriente.

El gen *sxtU* es un intermediario común de saxitoxina y análogos. A diferencia de *sxtI*, su aumento abrupto en el nivel expresión fue durante las fases finales del experimento en las dos condiciones ensayadas. El nivel de expresión relativa de *sxtU* en órdenes de magnitud es mayor que *sxtI*. Las diferencias significativas encontradas en la expresión relativa tiempo a tiempo de cada gen podrían ser reflejo de las diferentes funciones que tiene cada uno en la vía biosintética. Así, una posible hipótesis para explicar estas diferencias sería que *C. raciborskii* responde rápidamente a cambios ambientales, produciendo un tipo de saxitoxina al inicio del crecimiento exponencial de la población (por ej. durante una floración) y luego sería capaz de producir análogos de la misma. Esto demuestra la importancia de la utilización de más de un gen para estudios de expresión al ambos indicar diferentes etapas de síntesis.

Dado que el gen *sxtU* es un intermediario común de otros análogos de SXT, es posible considerarlo relevante a la hora de desarrollar herramientas para generar alertas tempranas de la presencia de *C. raciborskii*. Como su expresión es necesaria para sintetizar otras variantes conocidas de SXT también podría ser más influido por el ambiente y ser considerado un indicador de la posible formación de floraciones. Sería conveniente realizar nuevos análisis para determinar un valor umbral de expresión de este gen que favorezca la predicción de floraciones. En el estudio realizado por Piccini, et al., (2011), se encontraron altas concentraciones de GTX 2/3 analizadas por HPLC, ambos análogos de SXT en cultivos de la misma cepa utilizada en este trabajo. Teniendo en cuenta esto, la detección de estos genes en muestras ambientales también podría indicar la presencia de otras especies productoras distintas variantes de SXT (Soto-Liebe et al., 2010). Si la evaluación de la expresión de SXT queda limitada a la expresión de un solo gen es posible que se pierda información en cuanto a la posible formación de análogos tan tóxicos como SXT.

En otro estudio en el que se utilizó la misma cepa de *C. raciborskii* MVCC19, Martigani et. al., (2011) determinaron la producción de SXT por ELISA a los 5 días de incubación y con cultivos ya aclimatados a las condiciones +N y -N. Los resultados de Martigani et. al., (2011) indican la máxima producción de SXT en la condición aclimatada a -N. A diferencia de ese estudio, en este trabajo se evaluó la producción de SXT con un

método molecular y durante la transición del estado -N al +N en la etapa inicial del crecimiento de *C. raciborskii*. Una evaluación paralela de la producción de SXT por ELISA en nuestros experimentos confirmó que la concentración de la toxina por célula es mayor en la condición -N al final de la curva de crecimiento (ver Fig. 11; t = 400 h: -N, 13.3 ± 2.2 fg cel⁻¹; +N, 8.8 ± 2.1 fg cel⁻¹, F. Martigani com. pers.). Si bien a priori los resultados serían contradictorios, estas diferencias podrían deberse a la diferente escala temporal de ambas aproximaciones metodológicas, a las cuantificaciones en diferentes etapas del proceso (expresión génica versus producto final), a que la producción de SXT varía con los distintos tiempos de incubación, a la velocidad de duplicación en cada fase del crecimiento y a que la cepa también es capaz de producir análogos que no son correctamente cuantificados por el test ELISA (ej. 23% de reactividad cruzada para GTX 2/3, presente en MVCC19). Esto reafirmaría la complejidad del fenómeno de la síntesis de la toxina, lo que explica la variabilidad de las cuantificaciones en muestras naturales, así como subraya la importancia de evaluar la producción de toxina en relación a la etapa de crecimiento en que se encuentre la floración con metodologías complementarias.

Nuestros resultados contradicen el concepto propuesto de las cianotoxinas como metabolitos secundarios de las cianobacterias (Carmichael, 1992, Paerl, 1997). El hecho de que se compruebe que la expresión de genes para la síntesis de SXT ocurre en fases tempranas del crecimiento poblacional estaría indicando lo contrario. Si bien el costo energético que conlleva la síntesis de SXT (Kellman et al., 2008) es elevado, esta toxina estaría siendo sintetizada rápidamente desde el inicio de la fase de crecimiento, es decir, desde el comienzo de una potencial floración.

Como se ha descrito anteriormente, cuando *C. raciborskii* se encuentra en un ambiente sin nitrato disponible la obtención de nitrógeno es a través de la fijación de N₂ atmosférico. Dado que la diferenciación del heterocito está sujeta a la represión nutricional mediada por la presencia de N, determinamos cuánto tiempo necesita la población para “apagar” la síntesis de *nifH* y comenzar a usar únicamente las fuentes disueltas de N. Sorprendentemente, la síntesis de *nifH* continuó en la condición +N durante 24 h luego de agregado el nutriente. Durante esa fase se produjo un pequeño incremento de la biomasa de la población (5% y 6%, -N y +N, respectivamente). Como *C. raciborskii* se encuentra aún en fase de latencia, la detección de la enzima podría deberse al tiempo que la población necesita para censar la disponibilidad del nutriente. Esto podría cuestionar la relación a la formación del heterocito y la fijación de N₂. Como estaba previsto, sí se detectó la presencia de la enzima en los cultivos sin nitrato disponible. Se ha observado que el nitrógeno fijado es acumulado en gránulos citoplasmáticos de cianoficina (Sherman, 2000; Allen, 1984; Oppermann-Sanio & Steinbuchel, 2002), los cuales son considerados un reservorio dinámico de nitrógeno cuando son degradados para permitir el crecimiento. Picosi & Balladares (2004)

plantean que es posible que este péptido, además de ser degradado para la utilización del nitrógeno en las rutas metabólicas, sea liberado para la producción de SXT, ya que al degradarlo se liberan ácido aspártico y arginina (Allen, 1984; OppermannSanio & Steinbuchel, 2002;) siendo este último, el aminoácido precursor del inicio de la síntesis de SXT.

Se ha descrito que *Raphidiopsis brookii* D9, una cianobacteria similar a *C. raciborskii* también es capaz de sintetizar SXT y análogos pero sin tener la posibilidad de fijar nitrógeno. En un estudio genético Stucken et al., 2010 propone que la capacidad de formar heterocitos adecuados en esta cianobacteria se perdió secundariamente junto con la fijación. Esto sugiere que si la expresión de la toxina estuviera relacionada con la accesibilidad de N y que si esta se viera favorecida o disminuida en relación a la disponibilidad del nutriente, evolutivamente *R. brookii* D9 no hubiera perdido la capacidad de fijar nitrógeno. Nuestros resultados se relacionan con estos hallazgos y fortalecen lo sugerido anteriormente en cuanto a que la producción de la toxina estaría mayormente vinculada a la dinámica de crecimiento y no a la presencia del nutriente.

Los estudios moleculares, especialmente los relacionados con la actividad de grupos de genes que involucran metabolitos secundarios, requieren de la habilidad de extraer ARN de buena calidad. En este trabajo se puso a punto una técnica de extracción basada en la ruptura mecánica de las células. Utilizando el método de *bead – beating* en conjunto con el kit comercial, fue posible generar un protocolo de extracción de ARN y síntesis de ADNc confiable. Si bien se observaron variaciones en las concentraciones de ADNc entre las réplicas biológicas (necesarias para obtener un sustento estadístico) estas variaciones pueden deberse a la manipulación en el momento de la extracción. Este protocolo permitió obtener ARN de alta calidad requerido para el análisis de expresión génica y genética funcional por qPCR (Bustin, 2009).

Mientras que el aumento en la información sobre los riesgos para la salud que provocan las floraciones de cianobacterias tóxicas ha aumentado y este fenómeno es cada vez más frecuente, la demanda de métodos de monitoreo que permitan una detección temprana también ha crecido. Es necesaria una evaluación de la legislación actual de nuestro país que se ajuste a los riesgos que generan estos organismos acorde al actual conocimiento científico. El método de qPCR que aquí se proporciona, acoplado a la eficiente preparación de la muestra, permitiría una alerta temprana de una inminente floración tóxica y el monitoreo continuo de la calidad del agua en relación a la presencia de cianobacterias tóxicas en el medio ambiente. Esto permitiría implementar la aplicación de estrategias de control para evitar la exposición humana a cianobacterias productoras de saxitoxinas (y otras toxinas) antes de llegar a niveles peligrosos para la salud humana y animal. La aplicación una estrategia de seguimiento

a través qPCR durante un evento de floración, conjuntamente con la utilización de métodos tradicionales de detección de toxinas, podrían proporcionar información crítica con respecto a la calidad del agua y a la ecofisiología de cianobacterias. A través de la detección en muestras ambientales con los genes que aquí se proponen (*sxtI* y *sxtU*) se podría indicar la presencia de especies productoras de saxitoxina y análogos. La aplicación de un "análisis de perfil de genes" en la predicción de la producción de la toxina en nuevas cepas tóxicas también podría ayudar en la evaluación del riesgo de toxicidad debido a la continua proliferación de floraciones de cianobacterias en ecosistemas acuáticos.

6 Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se determinó que la expresión de SXT no es influida directamente por la disponibilidad de nitrato sino que este proceso estaría mayormente relacionado con la actividad metabólica y por consiguiente a la fase de crecimiento de la población bacteriana. Por lo tanto el nitrato tendría un efecto indirecto en la producción de toxinas, como podría serlo otro factor que se encuentre transitoriamente limitando el crecimiento, cuyo incremento desencadenaría el crecimiento exponencial o floración (ej, fosfato, luz, temperatura). El efecto que tiene el nutriente sobre el crecimiento de la cepa sería lo que habría provocado las diferencias en cuanto a la expresión relativa de *sxtI* y *sxtU* entre tratamientos. Al ser una especie capaz de adaptarse a distintas condiciones ambientales es probable que tenga una estrategia flexible en cuanto a la utilización del nitrógeno sin que este influya en el desarrollo final de la toxina. El aumento de la producción de toxina podría estar mayormente relacionado con la preparación que podrían tener estas bacterias al comienzo de una floración a fin de colonizar el ambiente sintetizando un tipo de SXT al inicio y luego sus análogos.

En este trabajo se desarrolló un protocolo de extracción de ARN fácil y eficiente con el que es posible extraer una concentración de ADNc suficiente para ser utilizada en ensayos de PCR en tiempo final y en tiempo real. Respecto a los *primers* diseñados, estos demostraron amplificar con éxito la región elegida. Los *primers* funcionaron bajo las condiciones de trabajo establecidas ya que no evidenciaron productos inespecíficos de amplificación, confirmando por las curvas de *melting*.

Para continuar con los estudios sobre los posibles factores que inducen la expresión de SXT, sería necesario realizar este mismo análisis durante otras fases del crecimiento de la población. Asimismo, sería importante analizar el comportamiento de *C. raciborskii* en cuanto a la expresión génica de SXT directamente en el ambiente, así como una evaluación de la expresión de los genes que codifican para el metabolismo de la cianoficina (cianoficina sintetasa y cianoficinasasa) que se encuentran en el heterocito (Picosi & Balladares, 2003). Esta aproximación permitiría determinar la existencia de un vínculo entre la expresión de SXT y la degradación de este péptido que libera arginina y la dejaría disponible para la síntesis de toxina.

ANEXO 1:

Curvas de amplificación y *melting* para las extracciones de prueba (Figura 1' a y b):

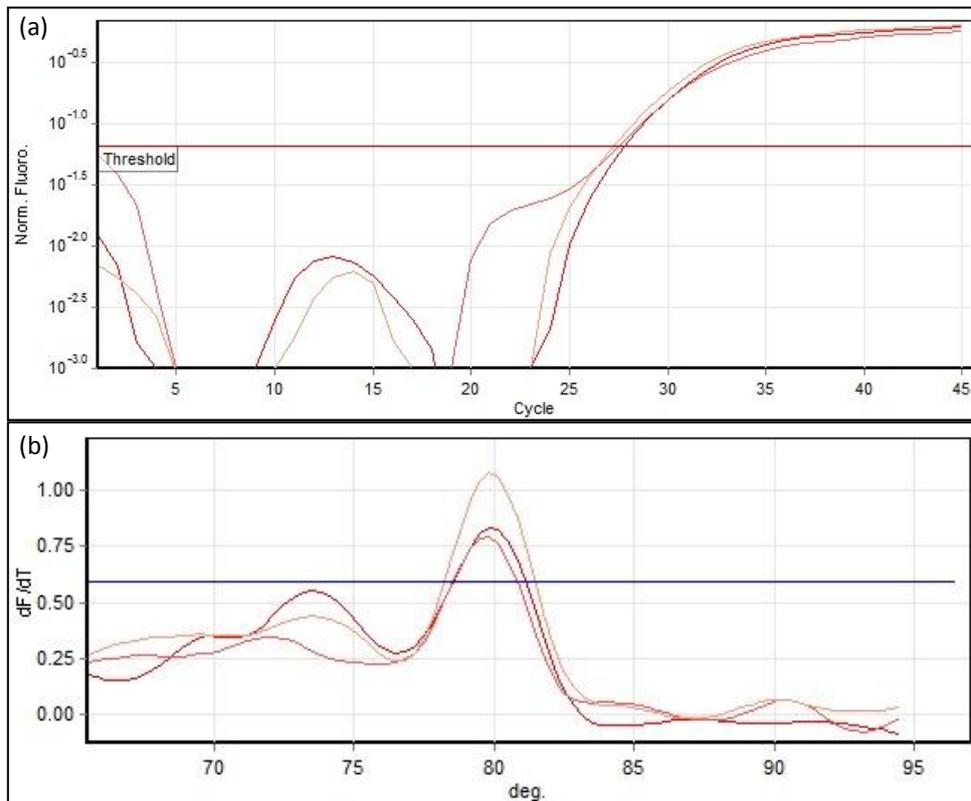


Figura 1'(a y b): Ensayo de qPCR para el gen *sxtU* con las extracciones de prueba de muestra sin diluir, 5:15 y 1:15. (a) Curvas de amplificación para el gen *sxtU*. (b) Curva de *melting*:

ANEXO 2

Curvas de amplificación para la determinación de la eficiencia de amplificación:

Eficiencia del gen *sxtI* (Figura 2' a y b):

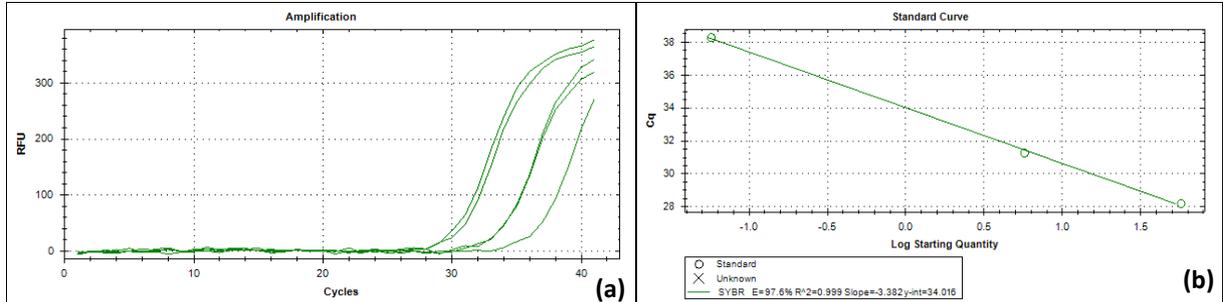


Figura 2'(a y b): Curva de calibración para el gen *sxtI*. (a) Curvas de amplificación para las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. (b) Curva de calibración: Eficiencia de reacción 97.6%. Slope -3.382 y r^2 0.999.

Eficiencia del gen *sxtU* (Figura 2' c y d):

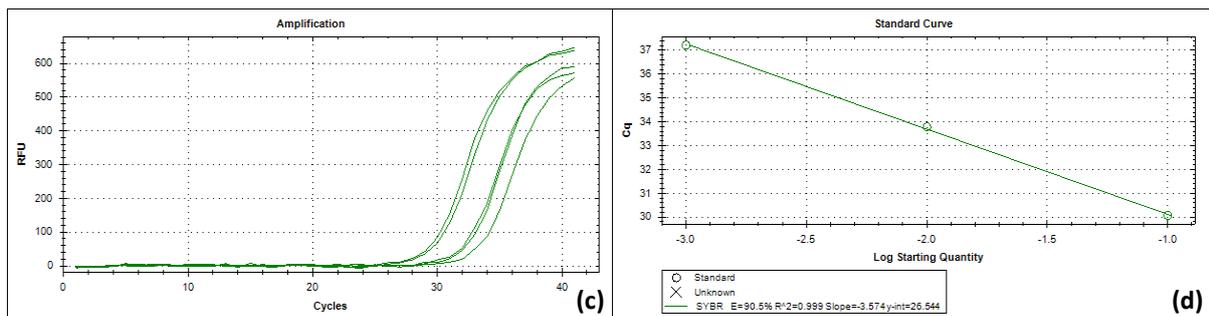


Figura 2'(c y d): Curva de calibración para el gen *sxtU*. (c) Curvas de amplificación para las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. (d) Curva de calibración: Eficiencia de reacción 90.5%. Slope -3.574 y r^2 0.999.

Eficiencia del gen *16S* (Figura 2' e y f):

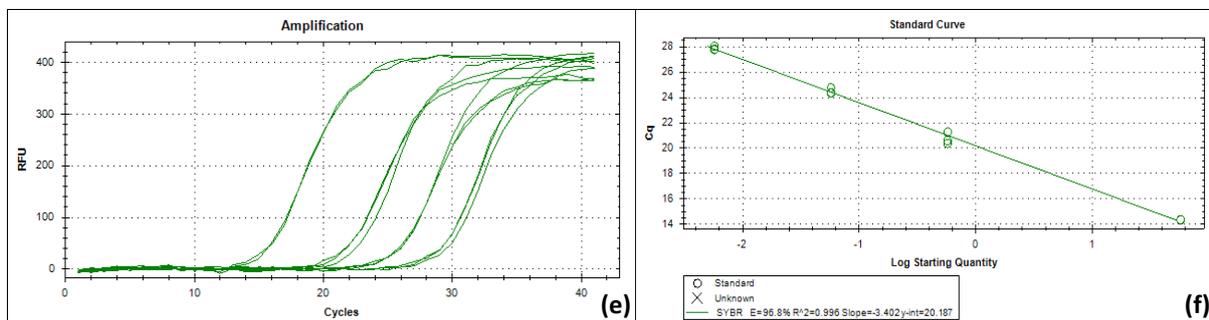


Figura 2' (e y f): Curva de calibración para el gen *16S*. (e) Curvas de amplificación para las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. (f) Curva de calibración: Eficiencia de reacción 96.8%. Slope -3.402 y r^2 0.996.

ANEXO 3

Curvas de amplificación para los genes *16S*, *sxtU* y *sxtI* en cada tratamiento (+N y -N)
Figura 3' (a y b):

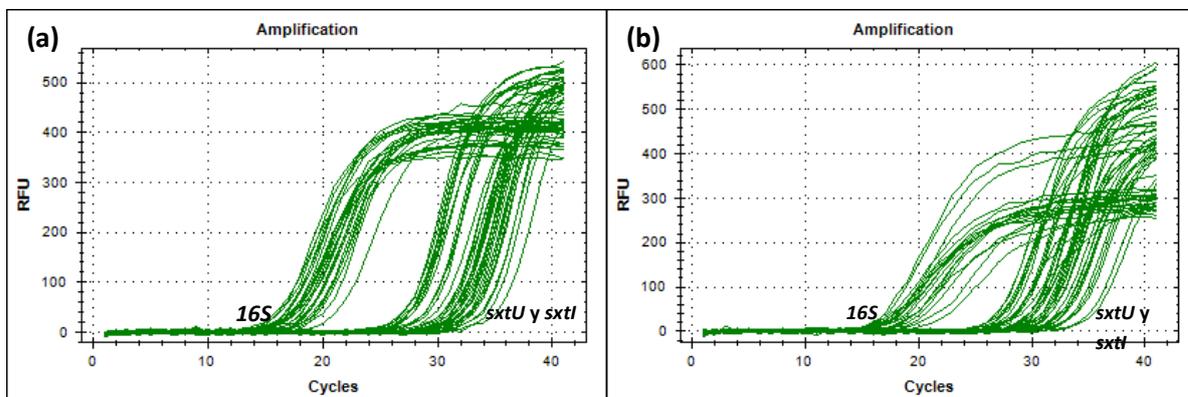


Figura 3' (a): Curvas de amplificación de los genes *sxtU*, *sxtI* y *16S* en la condición con agregado de Nitrógeno externo. Las primeras curvas de amplificación corresponden al gen *16S* y el segundo grupo de curvas corresponde a los genes de SXT. **(b)** Curvas de amplificación de los genes *sxtU*, *sxtI* y *16S* para la condición sin Nitrógeno agregado. **(a y b)** Las curvas de amplificación que corresponden al gen *16S* muestran valores de Ct menores, con respecto a las curvas de amplificación para los genes de SXT. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas específicas en la muestra original. Las curvas que corresponden a los genes de SXT muestran valores de Ct mayores con respecto al *16S*. A menor concentración de secuencia en la muestra inicial, se necesitará más ciclos para ser detectada, por lo tanto se obtienen valores de Ct mayores para muestras con menor cantidad de transcritos.

Agradecimientos

A mi tutora Claudia, por su paciencia y sinceridad, por su aliento y por compartir siempre su conocimiento y contagiarme su pasión por la ciencia. A Luis, por toda su ayuda, por su tiempo y sus ideas.

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología porque todos en algún momento me brindaron ayuda y sus conocimientos, en especial Gaby, Martina y Germán por la compañía, las charlas y la contención.

A Fátima, por prepararme los cultivos pero sobre todo por su amistad de todos estos años, su ayuda y sus consejos en esta etapa.

A mi familia, el más querido agradecimiento. A mi mamá Carmen y a mi papá Heber que desde que abrí los ojos me enseñaron que sin esfuerzo no hay logros y gracias a ellos soy lo que soy. Por el esfuerzo que ambos hicieron en épocas difíciles para que yo siga adelante. A mi hermano Matías, por su aliento, sus palabras justas y por su amistad. ¡Gracias!

A todos y cada uno de mis grandes amigos que me ha regalado la vida, gracias por aguantarme, ayudarme, aconsejarme y acompañarme en todo este camino.

A cada compañero de trabajo que en algún momento me cambió de horario para que yo pudiera seguir adelante con mi carrera.

A la familia de Seba, por alentarme y hacerme sentir querida desde el principio.

Y a Seba, por todo su amor, por toda su contención y por toda su alegría que me alienta y me enseña a mirar la vida siempre con una sonrisa.

Finalmente, agradezco a la ANII por la financiación dentro del programa de becas de iniciación a la investigación.

Gracias.

Referencias bibliográficas

- Ablain, W., Hallier Soulier, S., Causeur, D., Gautier, M., Baron, F. (2008). A simple and rapid method for the disruption of *Staphylococcus aureus*, optimized for quantitative reverse transcriptase applications: Application for the examination of Camembert cheese. *Dairy Sci. Technol*, 89: 69–81
- Alam, M., Ikawa, M., Sasner, J. J., Sawyer, P. J. (1973). Purification of Aphanizomenon flos-aquae toxin and its chemical and physiological properties. *Toxicon*, 11: 65–72.
- Allen, M.M. (1984) Cyanobacterial cell inclusions. *Annu Rev Microbiol* 38: 1–25.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Miller, W., Lipman, D.J (1997). Source National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-402.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall L., Arya, N., Patel, H.R. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Diagn*, 5(2):209-19.
- Beltran, E.C, Neilan B.A., (2000). Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Appl Environ Microbiol*, 66:4468–4474.
- Berg, K.A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P. & Rapala, J. (2008). High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *The ISME Journal*, 3: 314–325.
- Bonilla, S., Pérez, M.C., De León, L. (1995). Cyanophyceae planctónicas del Lago Ton Ton, Canelones, Uruguay. *Hoehnea*, 21(1/2): 185-192.
- Bouvy, M., Molica, R., De Oliveira, S., Marinho, M., Beker, B. (1999). Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of Northeast, Brazil. *Aquat Microbiol Ecol.* 20: 285–97.
- Branco, C.W.C., Senna, P.A.C., (1994). Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. *Algological Studies*, 75: 85 - 96.
- Briand, J., Leboulanger, C., Humbert, J., Bernard, C., Dufour, P. (2004b). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology*, 40: 231-238.
- Briand, J.F., C. Robillot, C. Quiblier-Lloberas, J.F. Humbert, and A. Coute. (2002). Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Research*, 36: 3183-3192.
- Bustin, S.A (2002). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29(1): 23–39.
- Bustin, S.A, (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25:169-193.
- Bustin, S.A, Benes V, Nolan T, Pfaffl, M.W (2005). Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol* 34(3): 597–601.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., (2009). The MIQE guidelines minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.

Burford, M. A & Davis, T. W. Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (2011). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29 (4): 883-891.

Capone, D. G., Zehr, J. P., Paerl, H. W., Bergman, B. & Carpenter, E. J. (1997). *Science*, 276: 1221–1229.

Carmichael, W. W., Evans, W. R., Yin, Q. Q., Bell, P. & Moczydlowsky, E. (1997). Evidence of paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl Environ Microbiol* 63, 3104–3110.

Carmichael, W. W., Falconer, I. (1993). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press London, 187-210.

Carmichael, W.W., 2001. *Assessment of Blue-Green Algal Toxins in Raw and Finished Drinking Water*. AWWA Research Foundation, Denver, Colo. 179 pages.

Carrieri, D., Ananyev, G., Lenz, O., Bryant, D.A., Dismukes, G.C. (2011). Contribution of a sodium ion gradient to energy conservation during fermentation in the cyanobacterium *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* CS-328. *Appl. Environ. Microbiol*, 77 (20), 7185–7194.

Castro, D., Vera, D., Lagos, N., García, C., Vásquez, M., (2004). The effect of temperature on growth and production of paralytic shell fish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 44, 483–489.

Catterall, W. A., Morrow, G. S., Hartshorne, R. P. (1979). Neurotoxin binding to receptor sites associated with the voltage sensitive sodium channels in intact, lysed, and detergent solubilized brain membranes. *J Biol Chem* 254, 11379–11387.

Catterall, W. A. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20, 15–43.

Cembella, A., Vásquez, M., (2010). Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases on synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon* 56, 1350–1361.

Cestele, S., Catterall, W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883–892.

Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K., Watanabe, M.M., 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 48 (3), 345 e 355.

Choque, T.M., Tomayko, J.F., Ricke, S.C., Okhyusen, P.C., Murray, B.E. (1996). Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 40, 2605-2609.

Cullen, D. W., A. K. Lees, I. K. Toth, and J. M. Duncan. 2002. Detection of *Colletotrichum* coccodes from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathol.* 51:281-292

Cylindrospermopsis raciborskii from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Safe*, 55: 243-250.

De León, L. (2002). Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. En: *Perfil Ambiental del Uruguay 2002*, Domínguez, A. y R. G. Prieto (eds.), Nordan-Comunidad, Montevideo, 28-37.

De León, L., Yunes, J.S. (2001). First report of a Microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environm. Toxicol.* 16 (1): 110-112.

Dokulil, M.T., Mayer, J. (1996). Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis-Limnotherix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Austria. *Algolog. Stud.* 83: 179-195.

Dokulil, M.T., Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438: 1-12.

Fabre, A., Carballo, C., Hernández, E., Piriz, P., Bergamino, L., Mello, L., González, S., Pérez, G., José G. León, J.G., Aubriot, L., Bonilla, S., Kruk, C. (2010). El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5(1): 112-125.

Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Froscio, S.M., Tozer, G.J., Hawkins, P.R. (1999). Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss Albino mice. *Environ. Toxicol.* 14: 143-150.

Falconer, I.R., Humpage, A.R. (2001). Preliminary evidence for in vivo tumor initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 16: 192-195.

Falconer, I.R., Humpage, A.R. (2005). Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *Int J Environ Res Public Health*, 2: 43-50.

Fontaine, M., and E. Guillot. 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *Fems Microbiol. Lett.* 214:13-17.

Freeman, T.C., Lee, K., Richardson, P.J. (1999). Analysis of gene expression in single cells. *Curr Opin Biotechnol*, 10(6): 579-582.

Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y (2002) A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*, 16(2): 99-110.

Gademann, K., Portman, C., 2008. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Curr. Org.Chem.* 12, 326-341.

Gallacher, S., Smith, E. A. (1999). Bacteria and paralytic shellfish toxins. *Protist* 150, 245-255.

Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M., (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6: 1095-1101.

- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C., Humbert, J.F., (2005). Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1097–1100.
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M. & Wiedner, C. (2008). Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae*, 7:692–701.
- Hackett, J.D., Wisecaver, J.H., Brosnahan, M.L., Kulis, D.M., Anderson, D.M., Bhattacharya, D., Plumley, F.G., Erdner, D.L. (2012). Evolution of Saxitoxin Synthesis in Cyanobacteria and Dinoflagellates. *Molecular Biology and Evolution*.
- Hamilton, P.B., Ley, L.M., Dean, S. & Pick, F.R. (2005). The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprocarvate new to Canada. *Phycologia*, 44: 17–25.
- Harada, T., Oshima, Y., Yasumoto, T. (1982). Structure of two paralytic shellfish toxins, gonyautoxins V and VI, isolated from a tropical dinoflagellate, *Pyrodinium bahamense* var. *compressa*. *Agric Biol Chem* 46, 1861–1864.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6: 986–993.
- Hellemans, J., Mortier, G., Coucke, P., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. (2006). qBase: open source relative quantification software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data (submitted to *Biotechniques*).
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11(9): 1026–1030.
- Humpage, A. R., Rositano, J., Bretag, A., Brown, R., Baker, P., Nicholson, B. C. Steffensen, D. A. (1994). Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aust. J. Mar. Freshw. Res* 45, 761–771.
- Kaas, H., Henriksen, P. (2000). Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. *Water Res* 34, 2089–2097.
- Kao, C.Y., Levinson, S.R. (1986). Tetrodotoxin, saxitoxin, and the molecular biology of the sodium channel. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 479:1–445.
- Karl, D., Michaels, A., Bergman, B., Capone, D., Carpenter, E., Letelier, R., Lipschultz, F., Paerl, H., Sigman, D., Stal, L. (2002). *Biogeochemistry*, 57,58: 47–98.
- Kellmann, R., Kaan, T., Young, J.J.M., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A. (2008). Biosynthetic Intermediate Analysis and Functional Homology Reveal a Saxitoxin Gene Cluster in Cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 4044–4053.
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Neilan, B.A., 2008b. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. *J. Mol. Evol.* 67, 526–538.
- Kokocin'ski, M., Dziga, D., Spoo, L., Stefaniak, K., Jurczak, T., Mankiewicz-Boczek, J., Meriluoto, J. (2008). First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of western Poland. *Chemosphere*, 74: 669–675.
- Kosol, S., Schmidt, J. Kurmayer, R. (2009). Variation in a peptide net production and growth

among strains of the toxic cyanobacterium. *Planktothrix* spp. *European Journal of Phycology* 44, 49-62.

Kuiper-Goodman T., Falconer I., Fitzgerald J. (1999). Human health aspects. Chorus I, Bartam J (eds.). *Toxin cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management.* E & F.N Spon, New York, 113- 153

Kurmayer, R. & Christiansen , G. (2009). The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria. *Freshwater*, 2(1): 31-50.

Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. Q. & Oshima, Y. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359–1373.

Lampert W., Sommers U. 2007. *Limnoecology.* New York: Oxford University Press.

Lehtimäki J., Moisander, K., (1997). Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two baltic sea cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1647

Leite, G.M., Magan, N., Medina, A. (2012). Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: An optimized method for filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 88 413–418

Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, et al. (2001) First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *J phycol*, 37: 1121–1126.

Liu, H., Nolla, H. A. & Campbell, L. (1997). *Aquat. Microb. Ecol*, 12: 39–47.

Manti, G., Mattei, D., Messineo, V., Melchiorre, S., Bogianni, S., Sechi, N., Casiddu, P., Luglio, L., Di Brizio, M. & Bruno, M. (2005). First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algae News*, 28: 8–9.

McGregor, G.B., Fabbro, L.D., (2000). Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 5 (3): 195-205.

Mihali, T., Kellmann, R., Neilan, B. (2009). Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochem.* 10, 8.

Moisander, P. H., Paerl, H. W., Zehr, J. P. (2008). Effects of inorganic nitrogen on taxaspecific cyanobacterial growth and *nifH* expression in a subtropical estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 53: 2 519-2 522.

Moustafa, A., Loram, J.E, Hackett, J.D, Anderson, D.M., Plumley, F.G., Bhattacharya, D. (2009). Origin of saxitoxin biosynthetic genes incyanobacteria. *PLoS One.* 4:e5758.

Mtagati, T.A.M, Siame, B.A., Shushu, D.D. (2006). Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, 78: 382–397.

Murray, S. A., Mihali, T. K., Neilan, B. A. (2011). Extraordinary Conservation, Gene Loss, and Positive Selection in the Evolution of an Ancient Neurotoxin. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 1173 -1182.

- Nixdorf, B., Mischke, U. & Rucker, J. (2003). Phytoplankton assemblages and steady state in deep and shallow eutrophic lakes an approach to differentiate the habitat properties of Oscillatoriales? *Hydrobiologia*, 502: 111–121.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. (1992). Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 7941–7942.
- Oppermann-Sanio, F.B., Steinbuchel, A. (2002). Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften*, 89:11–22.
- Orlando, C., Pinzani, P., Pazzagli, M. (1998). Developments in quantitative PCR. *Clin Chem. Lab. Med.*, 36: 255-269.
- Orr, P.T., Jones, G.J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography*, 43: 1604-1614.
- Padisak, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol*, 107: 563–593.
- Paerl, H. W. 1997. Coastal eutrophication and harmful algal blooms: Importance of atmospheric deposition and groundwater as "new" nitrogen and other nutrient sources. *Limnology and Oceanography*, 42: 1154–1165.
- Paerl, H. W. & Huisman, J. (2008). Blooms like it hot. *Science*, 320: 57-58.
- Paerl, H. W. & Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1: 27-37.
- Pattanaik, B., Wulff, A., Roleda, M.Y., Garde, K., Mohlin, M., (2010). Production of the cyanotoxin nodularin: A multifactorial approach. *Harmful Algae*, 10: 30-38.
- Pearson, L.A. Neilan, B.A (2008). The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 281-288.
- Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N. & Oshima, Y. (2000). Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38, 1689–1702.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 26(6): 509–515.
- Pfaffl, M.W, Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechn. Lett.*, 23: 275–282.
- Phister, T. G., and D. A. Mills. 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7430-7434.
- Piccini, C. Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., Gonzalez-Piana, M., Giani, A. Figueredo, C., Vidal, L., Kurk, C., Bonilla, S. (2011). Genetic and eco-physiological differences of South American

Cylindrospermopsis raciborskii isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, 10(2011): 644–653.

Picossi, S. Valladares, A. Flores, E. Herrero, A. (2004). Nitrogen-regulated Genes for the Metabolism of Cyanophycin, a Bacterial Nitrogen Reserve Polymer. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (12): 11582–11592.

Pomati, F., Neilan, B.A., Suzuki, T., Manarolla, G., Rossetti, C., (2003a). Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). *J. Phycol.* 39, 535–542.

Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A., (2004). Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150, 455–461

Pomati, F., Rossetti, C., Calamari, D., Neilan, B.A., (2003b). Effects of saxitoxin (SXT) and veratridine on bacterial Na⁺–K⁺ fluxes: a prokaryote-based SXT bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7371–7376.

Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C., Giovannardi, S., Onodera, H., Oshima, Y. & Neilan, B. A. (2000). The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol* 36, 553–562.

Quintero, M. J., Muro-Pastor, A. M., Herrero, A. & Flores, E. (2000). Arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 involves the urea cycle and arginase pathway. *J. Bacteriol* 182, 1008–1015.

Reynolds, C. S. (1984). *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University, London: 384.

Rigamonti, N; Bonilla, S; et al; Desarrollo de un sistema para cuantificar la expresión de toxinas de *Cylindrospermopsis raciborskii* en ecosistemas límnicos de Uruguay basado en PCR en tiempo real, [en línea], Uruguay, SUB XIII, 2010, [citado 5-08-2010], Disponible en Internet: http://sub2010.programacientifico.info/programa/buscar.php?id_tl=207

Rinehart, K., Namikoshi, M., Choi, B. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 6: 159-176.

Saker, M., Moreira, C. & Martins, J. (2009). DNA profiling of complex bacterial populations: toxic cyanobacterial blooms. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 85:237–252.

Saker, M.L., Nogueira, I.C.G., Vasconcelos, V.M., Neilan, B.A., Eaglesham, G.K., Pereira, P. (2003). First report and toxicological assessment of the cyanobacterium. *Environ Toxicol*, 14:179-182.

Saker, M.L., Thomas, A.D., Norton, J. H. (1999). Cattle Mortality Attributed to the Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an Outback Region of North Queensland.

Scasso, F., Mazzeo, N., Gorga, J., Kruk, C., Lacerot, G., Clemente, J., Fabian, D., Bonilla, S. (2001). Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: two years of a whole-lake experiment. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 11: 31-44.

Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J., Reed, M.W. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal. Biochem.*, 285(2): 194–204.

- Sharma S, Radl V, Hai B, Kloos K, Mrkonjic Fuka M, Engel M, et al. Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR. *J Microbiol Meth* 2007;68:445–52.
- Sherman, D. M., Tucker, D., and Sherman, L. A. (2000). *J. Phycol.* 36, 932–941.
- Shimizu, Y. (1996). Microalgal metabolites – a new perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 431–465.
- Shimizu, Y. (1993). Microalgal metabolites. *Chem. Rev.* 93: 1685-1698.
- Sivonen, K., Jones, G. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E & FN Spon, London: 41–111.
- Skovhus, T. L., N. B. Ramsing, C. Holmstrom, S. Kjelleberg, and I. Dahlløf. 2004. Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2373-2382
- Skulberg, O. M., Carmichael, W. W., Codd, G. A., Skulberg, R. (1993). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water.* Academic Press London, 145-164.
- Smayda, J. (1997). What is a bloom? A commentary. *Limnology and Oceanography*, 42(5):1132-1136.
- Soto-Liebe, K. , Méndez, M.A , Fuenzalida, L., Krock, B., Cembella, A., Vásquez, M. (2012). PSP toxin release from the *cyanobacterium Raphidiopsis brookii* D9 (Nostocales) can be induced by sodium and potassium ions. *Toxicon* 60 (2012) 1324–1334.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35: 171-205.- modified according to Rippka, R. & Herdman, M. (1993)
- Stucken, A., Rucker, J., Endrulat, T., Preussel, K., Hemm, M., Nixdorf, B., Karsten, U., Wiedner, C. (2006). Distribution of three alien cyanobacterial species (Nostocales) in northeast Germany: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii* and *Aphanizomenon aphanizomenoides*. *Phycologia.* 45: 696–703.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes- Valdés, J.J., Friedel, M., Plominsky, A.M., Vásquez, M., Glöckner, G., (2010a). The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE* 5, e9235.
- Stucken, K.S., (2010b). *Physiogenomics of Cylindrospermopsis raciborskii and Raphidiopsis brookii (Cyanobacteria) with Emphasis on Evolution, Nitrogen Control and Toxin Biosynthesis.*
- Stüken A., Orr J.S., Kellmann, R., Murray, S.A., Neilan, B.A., Jakobsen, K.S. (2011). Discovery of Nuclear-Encoded Genes for the Neurotoxin Saxitoxin in Dinoflagellates. *Plos ONE*, 6(5): e20096. doi:10.1371/journal.pone.0020096
- Suzuki, M. T., L. T. Taylor, and E. F. DeLong. 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5' -nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4605-4614.
- Te SH, Gin K-YHH. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore. *Harmful Algae* 2011;10:319–29.

- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ito, E & Watanabe, M. (1994). Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon*, 32: 833–843.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E., (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 75: 291-295.
- Tomitani, A., Knoll A.H, Colleen M. Cavanaugh C.M., & Ohno, T., (2006). The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *PNAS*, 103(14):5442–5447.
- Vaitomaa, J., and others 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7289-7297.
- Van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Gerrit, J.A., Speijers, A., & Bakker, G.J.I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Nutr. Food*, 51: 7-60.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):0034.1–0034.11
- Vidal, L. & Kruk, C. (2008). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(2):142-151.
- Whitton, B. A. & Potts, M. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Dordrecht, The Netherlands: 1–11.
- Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M (2003) SoFAR – Validation of an algorithm for automatic quantification of nucleic acid copy numbers by real-time polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 317(2): 218–225.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N., Elenitoba-Johnson, K.S. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 25(4): 430–442.
- Wittwer, C.T., Garling, D.J. (1991). Rapid cycle DNA amplification: Time and temperature optimization. *BioTechniques* 10: 76–83.
- Wolk, C. P., Ernst, A., and Elhai, J. (1994) in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D. A., ed) pp. 769–823, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Woloszynka, J. 1912. Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des Sawa-Planktons. *Bulletin of the International Academy of Science Cracoviae*, 6: 649-709.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1): 75–85.
- Wu, Z., Zeng, B., Li, R., & Song, L. (2012). Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. *Harmful Algae*, 15: 53-58.

