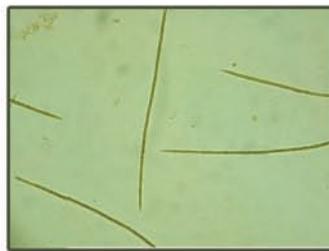




TESINA

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora  
*Cylindrospermopsis raciborskii* a las fluctuaciones  
en la disponibilidad de fosfato**



**VALENTINA AMARAL**

Docente Orientador: Dr. Luis Aubriot

Docente Co-orientador: Dra. Sylvia Bonilla

Sección Limnología

Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Tribunal: Dra. Sylvia Bonilla, Dr. Luis Aubriot y Dra. Cecilia Alonso

Junio de 2011

## INDICE TEMÁTICO

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Fitoplancton	2
2.2. Flexibilidad fenotípica	3
2.3. Problemática de la cianobacteria <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	4
3. Hipótesis	6
3.1. Hipótesis 1	6
3.2. Hipótesis 2	7
4. Objetivos	7
4.1. Objetivo general	7
4.2. Objetivos específicos	8
5. Materiales y métodos	8
5.1. Cultivo de la cianobacteria <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	8
5.2. Determinación de la tasa de crecimiento	9
5.3. Diseño experimental	9
5.4. Determinación de la tolerancia al estrés por fosfato	11
5.5. Determinación de la morfología	11
5.6. Análisis de datos	11
6. Resultados	12
6.1. Crecimiento del aislamiento sudamericano frente a diferentes patrones de fosfato	12
6.2. Crecimiento del aislamiento norteamericano frente a diferentes patrones de fosfato	14
6.3. Comparación del efecto del patrón de pulsos de fosfato en la tasa de crecimiento de ambos aislamientos	15
6.4. Respuesta morfológica en el aislamiento sudamericano frente a diferentes patrones de fosfato	17
6.5. Respuesta morfológica en el aislamiento norteamericano frente a diferentes patrones de fosfato	19
6.6. Comparación en las respuestas de crecimiento y morfología de los aislamientos	21
7. Discusión	23

8. Conclusiones y perspectivas	28
Agradecimientos	30
Referencias	31

## 1. RESUMEN

El crecimiento del fitoplancton en los ecosistemas acuáticos esta frecuentemente limitado por la disponibilidad de nutrientes. La formación de floraciones de cianobacterias depende en parte de la capacidad de estos organismos de obtener los recursos necesarios para el crecimiento en condiciones sub-óptimas. En particular, el fitoplancton dominado por cianobacterias es capaz de adaptarse fisiológicamente a las fluctuaciones ambientales del recurso limitante para optimizar el crecimiento. Recientemente, la cianobacteria tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* captó la atención científica debido a su éxito como organismo invasor ya que se ha expandido desde zonas tropicales hacia zonas templadas y subtropicales. En Uruguay ha sido encontrada en diversos lagos, algunos destinados a la potabilización. La flexibilidad fisiológica de *C. raciborskii* a las fluctuaciones ambientales de recursos limitantes podría ser un factor clave para explicar su éxito como organismo invasor. Este trabajo propone que *C. raciborskii* es capaz de optimizar su crecimiento a las fluctuaciones de fosfato a corto plazo, lo que podría explicar su éxito en la invasión de diversos ambientes. Para ello, se realizaron experimentos de crecimiento en función de la disponibilidad de fosfato con dos cepas americanas de *C. raciborskii* (MVCC19, Uruguay y CCMP1973, USA). Se utilizaron cultivos deficientes por fosfato y se los expuso a cinco concentraciones (0,5, 1, 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  fosfato), cada una aplicada en dos patrones de pulsos del nutriente: un pulso único y la misma concentración total pero fraccionada en una secuencia de diez pulsos. La secuencia de pulsos se aplicó en un lapso de 54 minutos (un pulso de fosfato cada 6 minutos). Ambas cepas mostraron una tasa de crecimiento mayor bajo el patrón de secuencia de pulsos, mostrando una alta flexibilidad fisiológica de la especie frente a cambios a corto plazo en la disponibilidad de fosfato. Esta flexibilidad fisiológica de la especie le permitiría una rápida optimización en el crecimiento. Las diferencias en las respuestas del crecimiento y de la morfología de ambas cepas muestran una importante variabilidad intraespecífica, apoyando así la hipótesis de múltiples ecotipos. La flexibilidad fisiológica y la diversificación de la especie en ecotipos podría haber favorecido la expansión de la especie en diferentes latitudes.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Fitoplancton

El fitoplancton es la comunidad de productores primarios acuáticos responsable de la fijación de la mitad del CO<sub>2</sub> anual del planeta (Kahl et al. 2008). El crecimiento microalgal en los ecosistemas acuáticos esta frecuentemente limitado por la disponibilidad de nutrientes (ej., fósforo, nitrógeno, carbono) (Schindler 1977). El fosfato es un nutriente clave en el crecimiento ya que se encuentra solo disponible en el agua y generalmente en concentraciones muy bajas, por lo que puede tornarse limitante y provocar el estrés nutricional (Schindler 1977, Hudson et al. 2000). Cuando éste es el caso, la concentración externa de fosfato fluctúa alrededor de un valor umbral en el cual la energía es insuficiente para dirigir la incorporación del nutriente (Falkner et al., 1989, 1994). Los aumentos ocasionales de concentración de fosfato en el ambiente son incorporados activamente por la comunidad, de tal forma que el fitoplancton experimenta este fenómeno como una serie de pulsos de concentración (Aubriot et al. 2011).

Las cianobacterias son los componentes procariotas del fitoplancton y los organismos fotosintetizadores aeróbicos más antiguos del planeta, que dieron lugar a la atmósfera oxidante (Graham & Wilcox 2000). Muchas cianobacterias pueden alcanzar altas densidades en cortos períodos de tiempo, un fenómeno denominado floración (*bloom*), el que se produce generalmente en verano (Reynolds & Walsby 1975, Bourrelly 1985, Reynolds 1987). La ocurrencia de floraciones en sistemas acuáticos de todo el mundo se ha visto incrementada en la última década, debido a la eutrofización o enriquecimiento con nutrientes de los ecosistemas acuáticos y al cambio climático global (Schindler 2006 ; Paerl & Huisman 2008). El desarrollo de floraciones tóxicas en Uruguay es un fenómeno cada vez más frecuente, lo que hace necesaria la generación de conocimiento científico que apoye la implementación de las medidas de gestión apropiadas. Se han observado floraciones en la mayoría de los recursos acuáticos del Uruguay, como el Río Uruguay y el Río Negro y los grandes embalses, así como también en la costa del Río de la Plata (Bonilla et al. 1995, Pérez et al. 1999, Bonilla & Conde

2000, De León & Yunes 2001, Kruk et al. 2002, Kruk et al. 2003). Muchas especies de cianobacterias producen cianotoxinas (hepatotoxinas, neurotoxinas, dermatotoxinas y citotoxinas), metabolitos secundarios tóxicos que adicionalmente pueden afectar seriamente la calidad de los sistemas acuáticos, ocasionando perjuicios sanitarios y económicos; por ejemplo, efectos agudos y crónicos para la salud humana, pérdida de calidad de agua, pérdida de biodiversidad por mortandad de peces y aves, restricción de usos potenciales, entre otros (Codd et al. 1989, Falconer 1996; Falconer & Humpage 1996). La formación de floraciones de cianobacterias depende en parte de la capacidad de estos organismos en obtener los recursos necesarios y optimizar su asimilación (Oliver & Granf 2000). En ambientes pobres en formas inorgánicas de nitrógeno, algunos grupos de cianobacterias tienen la ventaja de poder obtenerlas por medio de la fijación del nitrógeno atmosférico, mediante células especializadas llamadas heterocistos que contienen la enzima nitrogenasa (van Den Hoek et al. 1995). Sin embargo, la formación de estas células especializadas así como la fijación *per se* constituyen un consumo energético importante (Ferber et al. 2004).

## **2.2. Flexibilidad fenotípica**

Las cianobacterias pueden responder a los cambios ambientales mediante adaptaciones fisiológicas y morfológicas (Stomp et al. 2008). Esta estrategia, conocida como flexibilidad fenotípica, puede mejorar la adecuación (*fitness*) del organismo en el nuevo ambiente (Agrawal 2001). Miner et al. (2005) definieron flexibilidad fenotípica como la producción de múltiples fenotipos a partir de un solo genotipo, dependiendo de las condiciones ambientales. Estas respuestas plásticas incluyen cambios en el comportamiento, fisiología, morfología, crecimiento o historia de vida. Cuando las condiciones ambientales cambian en una escala de tiempo corta, los individuos que muestran una transformación continua y reversible en comportamiento, fisiología y morfología, pueden incurrir en una adaptación selectiva (Padilla & Adolph 1996, Kingsolver et al. 1998, Willmer et al. 2000)

Muchos estudios han investigado la flexibilidad fenotípica en ambientes fluctuantes (Chesson et al. 2004; Egas et al. 2004; Abrams 2006 a; 2006 b; Gélinas et al. 2007; Van der Stap et al. 2007), pero el tiempo de adaptación fenotípica ha recibido poca atención (Miner et al. 2005). En un estudio sobre adaptación cromática en cianobacterias Stomp et al. (2008) muestra cómo el tiempo de exposición y de respuesta adaptativa puede afectar el crecimiento de estos organismos en ambientes fluctuantes. La ventaja de la flexibilidad fenotípica decrece al aumentar la variabilidad ambiental y el tiempo de respuesta del ajuste fenotípico (Padilla & Adolph 1996, Gabriel 2005, 2006).

Estudios previos muestran que el fitoplancton dominado por cianobacterias es capaz de regular la incorporación de fosfato cuando ocurren fluctuaciones ambientales del recurso en forma de pulsos consecutivos de concentración del nutriente (Aubriot et al. 2011). Este comportamiento adaptativo es una respuesta a fluctuaciones de fosfato a corto plazo (minutos) y resulta en una mayor optimización de la asimilación del nutriente y en un mayor crecimiento (Falkner et al. 2006, Aubriot et al. 2011). Esta propiedad adaptable sería un factor clave en la estimulación del crecimiento de cianobacterias y ha sido estudiada en cianobacterias unicelulares y filamentosas en cultivos (*Synechococcus leopoliensis* y *Anabaena variabilis*; (Wagner et al. 1995, Falkner et al. 2006) y en fitoplancton dominado por *Planktothrix agardhii* y *Raphidiopsis mediterránea* (Aubriot et al. 2000, Aubriot et al. 2011), esta última considerada un estado no heterocístico del ciclo de vida de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Moustaka-Gouni et al. 2009).

### **2.3. Problemática de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii***

Recientemente, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju (1972) (Cyanobacteria, Orden Nostocales) captó la atención científica debido a su comportamiento invasor y su capacidad de producir potentes toxinas (hepato y neurotoxinas) (Padisák 1997, Wiedner et al. 2007). Esta cianobacteria presenta filamentos isopolares, solitarios, rectos o en espiral, cilíndricos o ligeramente más estrechos en las extremidades (Komárková 1998). Esta cianobacteria de origen

tropical usualmente crece por encima de los 20 °C pero ha comenzado a extender su distribución geográfica hacia regiones subtropicales y templadas (Padisák 1997, Hamilton et al. 2005, Stuken et al. 2006). Los factores que promueven su expansión geográfica son tema de controversia. Las investigaciones hasta ahora llevadas a cabo sobre su comportamiento expansivo en América del Sur son escasas, limitándose al estudio de algunas cepas brasileras y uruguayas (Ferreira 2007, Piccini et al. 2011). En nuestro país, *C. raciborskii* ha sido encontrada en diversos lagos someros de Maldonado y Canelones destinados a la potabilización de agua (Vidal & Kruk 2008, Fabre 2011).

Debido a que *C. raciborskii* puede recurrir a la fijación de nitrógeno atmosférico, el fosfato sería el nutriente que generalmente limite a su crecimiento. Además, en los lagos de Uruguay se ha encontrado que la presencia de esta especie no estaría relacionada con la deficiencia por nitrógeno disuelto en el agua (Fabre et al. 2010). Uno de los factores que podría explicar las floraciones de esta especie es su capacidad de tolerar la escasez de fosfato, por la acumulación de importantes reservas en forma de gránulos de polifosfato y alta afinidad por el nutriente (Istvánovics et al. 2000).

Estudios de la ecología evolutiva de *Cylindrospermopsis raciborskii* sugieren la existencia de diversos ecotipos que toleran diferentes condiciones ambientales locales, lo que podría haber favorecido la expansión de la especie en diferentes latitudes (Piccini et al. 2011). Otro escenario posible está asociado al aumento de temperatura como consecuencia del cambio climático (Gugger et al. 2005, Wiedner et al. 2007). Según Briand et al. (2004) la gran flexibilidad fisiológica de esta cianobacteria le permite tener éxito en un amplio rango de condiciones ambientales ya que es capaz de crecer exitosamente y dominar el fitoplancton bajo entradas episódicas de fosfato (Posselt et al. 2009).

Actualmente se desconoce si *Cylindrospermopsis raciborskii* posee la capacidad de adaptarse fisiológicamente a los cambios en la disponibilidad del fosfato. El resultado de esta adaptación fisiológica a corta escala temporal sería una ventaja para adecuarse a condiciones sub-óptimas de la concentración de fosfato en el ambiente. Asimismo, no hay información suficiente acerca de los parámetros de crecimiento (tasa máxima de crecimiento, tolerancia al estrés nutricional) de los

aislamientos nativos de *C. raciborskii* en relación a la disponibilidad de nutrientes. Piccini et al. (2011) observaron diferencias significativas en las respuestas de crecimiento y morfología en dos cepas de nuestro país en experimentos de deficiencia por fosfato. Según los autores la existencia de ecotipos con distintas afinidades por concentraciones bajas o altas de fosfato le permitiría a *C. raciborskii* tener éxito en un amplio rango de lagos con distintos estados tróficos. Fabre (2011) investigó la flexibilidad fisiológica de una cepa nativa de esta especie en la aclimatación a distintas intensidades de luz. La cepa optimizó su crecimiento a las nuevas condiciones en escalas de tiempo relativamente cortas (días, semanas), lo que se reflejó en mayores tasas de crecimiento y cambios morfológicos (Fabre 2011).

Este trabajo propone que el éxito de *C. raciborskii* en ambientes limitados por fosfato se debería a su flexibilidad fisiológica a las fluctuaciones en la disponibilidad del nutriente, lo que le permitiría la optimización del crecimiento y podría explicar algunas características de su comportamiento invasor.

El conocimiento de los mecanismos ecofisiológicos que regulan el crecimiento de cianobacterias y su adaptación al estrés nutricional son elementos claves para la implementación de medidas de mitigación pertinentes. En particular, la importancia de analizar las características fisiológicas de la especie invasora *C. raciborskii* de nuestros sistemas acuáticos naturales es fundamental para poder prevenir efectos indeseados y desconocidos.

### **3. HIPÓTESIS**

#### **3.1. Hipótesis 1**

La colonización de ambientes tan diversos por *C. raciborskii* podría explicarse por su rápida adecuación a las fluctuaciones ambientales debido a una gran flexibilidad fisiológica. Un trabajo reciente mostró que esta especie posee la capacidad de aclimatarse a distintos ambientes lumínicos debido a la flexibilidad fisiológica (Fabre 2011). Otras cianobacterias filamentosas también poseen la propiedad de

adaptarse a fluctuaciones de fosfato, por lo que también se espera observar en esta especie una optimización del crecimiento cuando ocurran fluctuaciones ambientales de fosfato en forma de pulsos consecutivos. Estos antecedentes permiten plantear la siguiente hipótesis:

*Cylindrospermopsis raciborskii* posee la capacidad de adaptarse fisiológicamente a cambios en la disponibilidad de fosfato en una corta escala temporal, manifestado en una mayor tasa de crecimiento.

### **3.2. Hipótesis 2**

Piccini et al. (2011) encontraron diferencias en el perfil genético, morfología, crecimiento, preferencias lumínicas y de fosfato en cepas de *C. raciborskii*. Esta variabilidad fenotípica y genética apoyaría la existencia de múltiples ecotipos de la especie cuyo éxito estaría sujeto a las condiciones ambientales locales. En base a estos antecedentes se plantea la hipótesis 2:

Las diferencias en las respuestas del crecimiento de distintas cepas de *C. raciborskii* a la disponibilidad de fosfato apoya la existencia de diferentes ecotipos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el crecimiento de una cepa de *C. raciborskii* aislada de ecosistemas acuáticos de Uruguay (MVCC19) y de EEUU (CCMP1973), en relación a la disponibilidad de fosfato.

## **4.2. Objetivos específicos**

1. Caracterizar la tasa de crecimiento de ambas cepas de *C. raciborskii* a distintos suministros de fosfato.
2. Determinar si existe adaptabilidad fisiológica a distintos patrones del suministro de fosfato.
3. Determinar la tolerancia al estrés por este recurso en ambas cepas.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Cultivo de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii***

#### **5.1.1. Condiciones de crecimiento**

Se cultivaron dos cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju (1972) (Orden Nostocales): MVCC19 (de aquí en adelante AS) perteneciente al cepario de la Sección Limnología, aislada de un lago artificial eutrófico Lago Javier (34° 51' S, 56° 02' W, área: 10 ha, profundidad máxima: 9.8 m, Fósforo total: 1.97  $\mu\text{M}$ ; Vidal & Kruk, 2008) y CCMP1973 (de aquí en adelante AN) de Florida (adquirida en el Centro Nacional de Cultivos de Fitoplancton Marino Provasoli-Guillard, EEUU). Ambas cepas se cultivaron en medio BG11 modificado ( $\text{CuSO}_4$  a 25% de la receta original, Stanier et al. 1971); libre de nitrógeno. Los cultivos se burbujearon con aire humedecido por burbujeo en agua Milli-Q esterilizada y prefiltrada a través de filtros de algodón estériles. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 25°C y a una intensidad lumínica de 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con un fotoperíodo de 16:8 h (luz: oscuridad).

#### **5.1.2. Condiciones de deficiencia por fosfato y cultivos semi-continuos**

Para evaluar el crecimiento en relación a la disponibilidad del fosfato fue necesario inducir previamente la deficiencia por este recurso en ambos aislamientos. Para ello se cultivaron 300 ml de cultivo de cada aislamiento, MVCC19 y CCMP1973, en régimen semi-continuo mediante diluciones sucesivas con medio fresco BG11-N.

Para iniciar la deficiencia por fosfato, se realizó una remoción de 150 ml de cultivo y éste fue sustituido con igual volumen de medio BG11 libre de fosfato y nitrógeno (-N -P). La deficiencia por fosfato se confirmó cuando el fosfato en el medio pasó a ser analíticamente indetectable y una vez alcanzado el estado estacionario de crecimiento ( $\mu_{t2}-\mu_{t1} = 0$ ). Para mantener las condiciones de deficiencia por fosfato se realizaron diluciones con medio fresco con frecuencia bisemanal (régimen semi-continuo) adicionando una concentración limitada de fosfato (10  $\mu$ M fosfato). La frecuencia de diluciones se fijó previamente a que el cultivo alcanzara la fase estacionaria de crecimiento para evitar el colapso del mismo.

## **5.2. Determinación de la tasa de crecimiento**

La tasa de crecimiento se determinó a partir del indicador indirecto de biomasa: densidad óptica (DO<sub>750</sub>: absorbancia a 750 nm, Thermo Evolution 60).

La tasa de crecimiento  $\mu$  se calculó mediante la fórmula:

$$\mu = 2.3026 (\log N_f - \log N_0) / T_f - T_0$$

donde  $N_f$  corresponde a la DO<sub>750</sub> en el tiempo  $T_f$ , y  $N_0$  a la DO<sub>750</sub> en el tiempo  $T_0$ , siendo  $T_0 < T_f$  (en días). El factor 2.3026 surge de la transformación del ln a log<sub>10</sub> de la función  $-dN_f/N_0 = \mu dT$ .

Se calculó la tasa de crecimiento diariamente y se utilizó la tasa máxima encontrada. Se determinó la tasa de crecimiento promedio de tres réplicas para cada patrón de fosfato en ambas cepas.

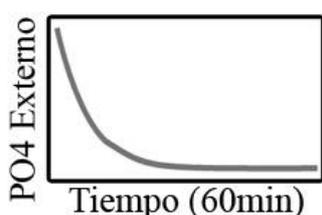
## **5.3. Diseño Experimental**

### **5.3.1. Tratamientos con patrones de suministro de fosfato**

Posteriormente a que los cultivos alcanzaran la deficiencia por fosfato, se realizaron los experimentos de pulsos de fosfato utilizando cinco concentraciones (0,5, 1, 2, 5 y 10  $\mu$ M). Cada concentración se dividió en dos tratamientos con patrones distintos de suministro: pulso único y secuencia de pulsos. Para ello, se

realizó una dilución de 250 ml del cultivo en 750 ml de medio fresco BG11-N-P. Dicho cultivo diluido fue separado en cinco botellas (200 ml por botella). Cada botella recibió una concentración inicial diferente de fosfato: 0,5, 1, 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Se hicieron dos series de cinco botellas donde se utilizaron dos patrones de suministro de fosfato: en una serie se suministraron las concentraciones de fosfato indicadas en una única vez (pulsos únicos) y en la otra serie en secuencia de pulsos (10 pulsos) (Fig. 1).

1. Pulso único



2. Secuencia de pulsos

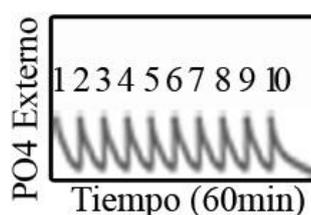


Figura 1. Esquema que ilustra los patrones de suministro de fosfato utilizados en los experimentos: pulso único y secuencia de pulsos de fosfato.

En la serie de secuencia de pulsos la concentración de fosfato inicial se suministró de forma fraccionada (1/10) en el lapso de 54 minutos (un pulso de fosfato cada 6 minutos). Luego, cada alícuota fue separada en tres réplicas para su inmediata incubación (Tabla I) para evaluar la tasa de crecimiento resultante. Durante los experimentos se utilizaron las mismas condiciones de luz y temperatura mencionadas anteriormente.

Tabla I. Diseño de los tratamientos que se realizaron con cada aislamiento de *C. raciborskii* (MVCC19 y CCMP1973).

Tratamiento (3 réplicas)	Pulso único 1 x $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{M}$ )	Pulsos cortos 10 x $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{M}$ ) $\Delta t = 6 \text{ min}$
1	0,5	0,05
2	1	0,1
3	2	0,2
4	5	0,5
5	10	1

Se midió diariamente la densidad óptica a 750 nm ( $DO_{750}$ ) de los cultivos para ambos aislamientos, hasta que estos alcanzaron la fase de muerte ( $\mu_{t2} < \mu_{t1}$ ). Se determinó la fase exponencial, estacionaria y de senescencia en cada tratamiento para ambos aislamientos.

#### **5.4. Determinación de la tolerancia al estrés por fosfato**

Se estableció la tolerancia al estrés por fosfato en cada tratamiento mediante la determinación de la fase de senescencia, considerándose ésta como la pendiente negativa después de obtener la biomasa máxima.

#### **5.5. Determinación de la morfología**

Se tomaron muestras al inicio y durante la fase exponencial de crecimiento para cada tratamiento y cada aislamiento. Las muestras se fijaron con formol al 1 % y posteriormente se midió el largo y ancho de los filamentos con microscopio óptico al 100X en 20 filamentos por replica. Se calculó el volumen específico ( $\mu\text{m}^3$ ), superficie ( $\mu\text{m}^2$ ) y la relación superficie/volumen ( $S/V$ ,  $\mu\text{m}^{-1}$ ) de los filamentos de ambos aislamientos a partir de figuras geométricas en base a las medidas morfológicas de 20 organismos por replica (Hillebrand et al. 1999).

#### **5.6. Análisis de datos**

Se realizaron ANOVAs de dos vías para determinar diferencias significativas entre las tasas de crecimiento, volumen específico y relación superficie volumen; patrones de fosfato (factor 1) y las concentraciones (factor 2) usando SigmaPlot 11. También se realizó ésta prueba para determinar diferencias entre las cepas, para la cual los factores utilizados fueron los patrones de fosfato y las cepas. La comparación de los valores de volumen específico promedio entre patrones de fosfato, para la cepa norteamericana, y la relación superficie/volumen promedio, para la cepa sudamericana, se realizaron con el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis debido a que estos no cumplieron con los supuestos de normalidad y

homogeneidad de varianza, aún aplicando transformaciones sencillas (Statistica 8.0). Para evaluar las diferencias entre los distintos patrones de fosfato para cada concentración se realizó la prueba t de Student en ambas cepas, usando SigmaPlot 11.

Se determinó el índice de cambio de las tasas de crecimiento de cada aislamiento como el cociente entre la tasa de crecimiento obtenida con la secuencia de pulsos sobre la tasa de crecimiento correspondiente al pulso único ( $\mu$  secuencia de pulsos/ $\mu$  pulso único)-1.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Crecimiento del aislamiento sudamericano frente a diferentes patrones de fosfato**

AS presentó una tasa de crecimiento promedio significativamente mayor cuando el fosfato se suministró en una secuencia de pulsos. Esta fue de  $0,302 \pm 0,075 \text{ d}^{-1}$  y de  $0,239 \pm 0,054 \text{ d}^{-1}$  para el patrón de pulso único (Fig. 2 AS, Tabla II). Las diferencias observadas entre los patrones de fosfato no dependieron de la concentración agregada (Tabla II). No se observaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento para las concentraciones agregadas (pruebas de t:  $p > 0,05$ , a  $10 \mu\text{M}$  MW:  $p > 0,05$ )

La tasa de crecimiento máxima se observó en la secuencia de pulsos a  $10 \mu\text{M}$  de fosfato ( $0,405 \pm 0,014 \text{ d}^{-1}$ ) mientras que para el patrón de pulso único la tasa máxima se determinó a  $2 \mu\text{M}$  de fosfato ( $0,296 \pm 0,041 \text{ d}^{-1}$ ) (Fig. 2 AS).

Se observó una fase lag de 2 días antes del crecimiento exponencial para el patrón de pulso único (Fig. 3 AS<sub>1</sub>). Sin embargo, se observó un día de fase lag para la secuencia de pulsos (Fig. 3 AS<sub>2</sub>), con una disminución de la biomasa (DO<sub>750</sub>) al inicio de la incubación. Para el patrón de pulso único, los cultivos comenzaron la senescencia a partir del día 3 en la mayoría de las concentraciones aplicadas, mientras que a  $2 \mu\text{M}$  de fosfato la biomasa disminuyó a partir del día 4. Para la secuencia de pulsos, la senescencia fue a partir del día 4 (día 5 para  $2 \mu\text{M}$  de

fosfato), excepto en el tratamiento de 10  $\mu\text{M}$  en el cual no se observó senescencia para este patrón.

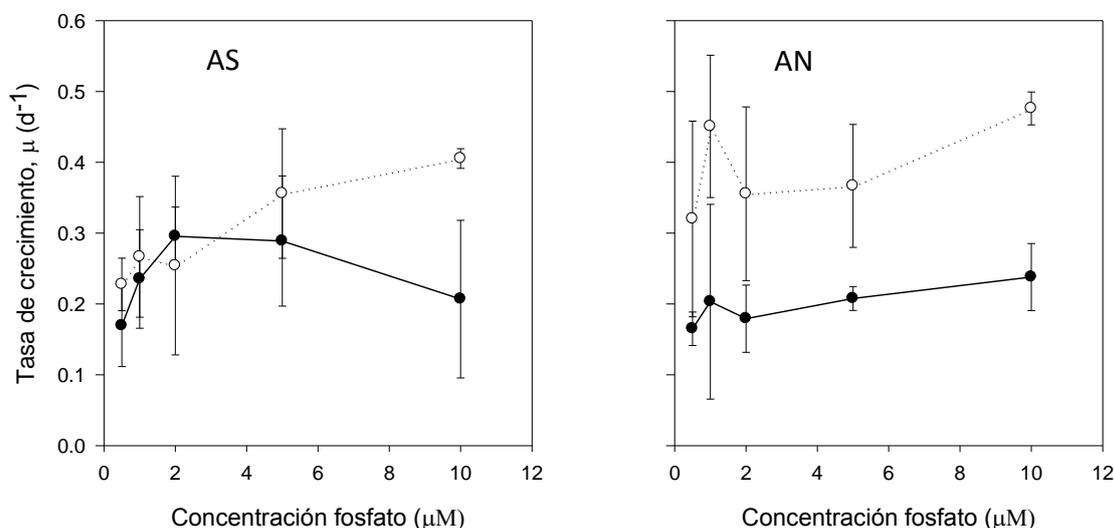


Fig. 2. Tasa de crecimiento en función de la concentración de fosfato agregada para ambos patrones de pulsos en el aislamiento sudamericano (A) y en el norteamericano (B). En círculos negros: pulso único y en círculos blancos: secuencia de pulsos.

Tabla II: Resultados de los ANOVAs de dos vías (patrón y concentración, alfa: 0,05) para la tasa de crecimiento de la cepa norteamericana (AN) y de la cepa sudamericana (AS). Se indica el parámetro F y los grados de libertad, \*: diferencias significativas.

Factores	F (grados de libertad)	p
AN-Patrón	37,009 (1)	< 0,001*
AN-Concentración	1,771 (4)	0,174
AN-PatrónXConcentración	0,0003 (4)	0,306
AS-Patrón	5,122 (1)	0,035*
AS-Concentración	2,492 (4)	0,076
AS-PatrónXConcentración	1,975 (4)	0,137

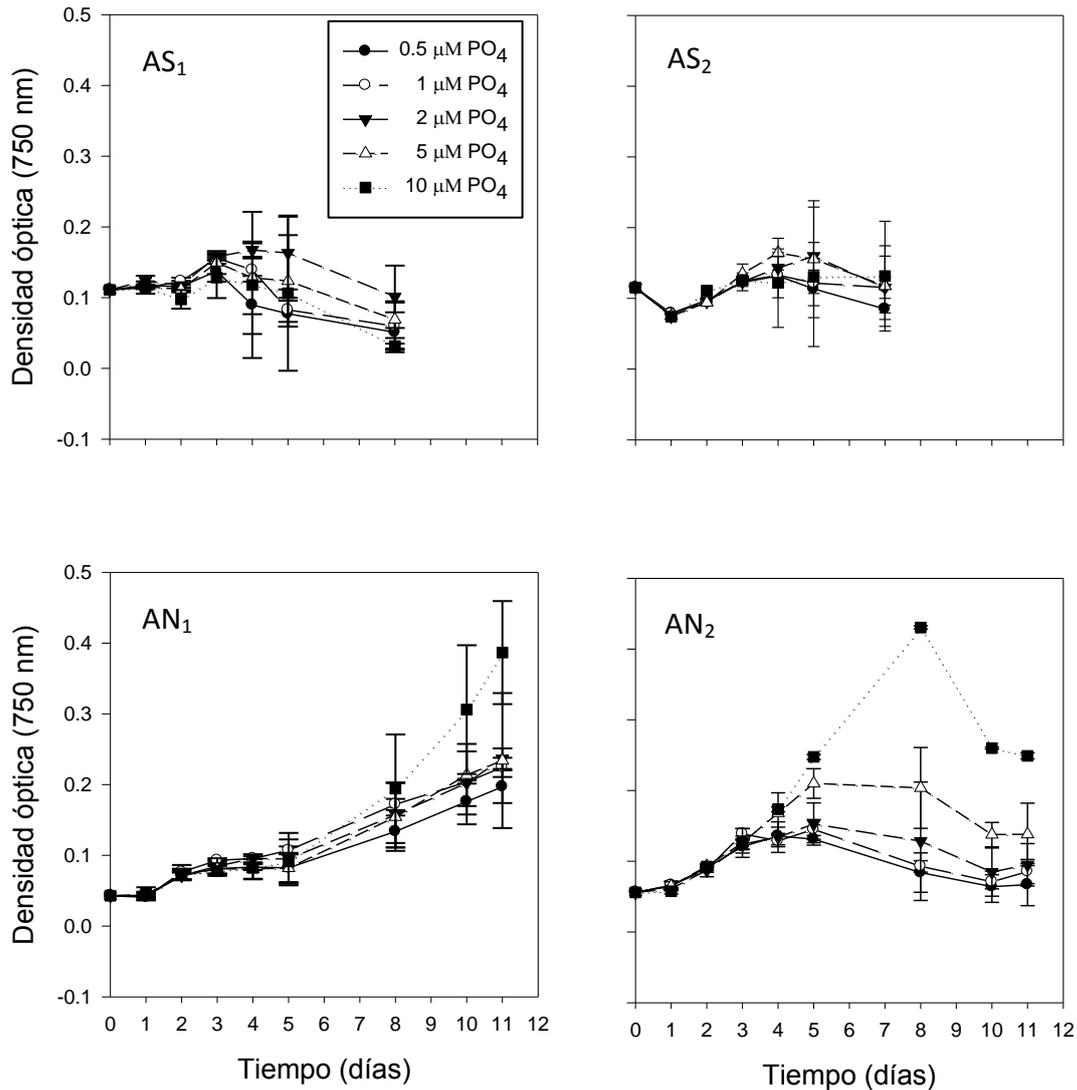


Fig.3. Densidad óptica a 750 nm en función del tiempo en días para el aislamiento sudamericano (AS) y norteamericano (AN). Los subíndices indican el patrón de pulso de fosfato; 1: pulso único, 2: secuencia de pulsos. En círculos negros a 0,5 μM, círculos blancos: 1 μM, triángulo negro: 2 μM, triángulo blanco: 5 μM y cuadrado negro: 10 μM de fosfato.

## 6.2. Crecimiento del aislamiento norteamericano frente a diferentes patrones de fosfato

AN presentó una tasa de crecimiento promedio significativamente mayor para la secuencia de pulsos (Fig. 2 AN, Tabla II), al igual que AS. Esta fue de  $0,394 \pm 0,066$   $d^{-1}$  para la secuencia de pulsos y de  $0,201 \pm 0,032$   $d^{-1}$  para pulso único.

Para ambos patrones de pulsos de fosfato la tasa máxima de crecimiento se determinó a 10  $\mu\text{M}$  de fosfato (Fig. 2 AN). La tasa de crecimiento a esta concentración fue significativamente superior en la secuencia de pulsos (prueba de t:  $p < 0,001$ ) (Fig. 2 AN;  $0,476 \pm 0,023 \text{ d}^{-1}$  y de  $0,249 \pm 0,038 \text{ d}^{-1}$  pulso único). También se observaron diferencias significativas entre los patrones de fosfato a 5  $\mu\text{M}$  (prueba de t:  $p < 0,05$ ) donde la tasa de crecimiento para la secuencia de pulsos fue de  $0,367 \pm 0,087 \text{ d}^{-1}$  y de  $0,208 \pm 0,017 \text{ d}^{-1}$  para el pulso único.

Se observó una fase lag de 1 día para ambos patrones de pulsos (Fig. 3 AN). Sin embargo, la fase exponencial para la secuencia de pulsos (Fig. 3 AN<sub>2</sub>) comenzó el día 2, mientras que para el pulso único (Fig. 3 AN<sub>1</sub>) el inicio de ésta fase se observó el día 5. La fase estacionaria fue alcanzada primero en la secuencia de pulsos, en el día 5 para todas las concentraciones, excepto a 10  $\mu\text{M}$  de fosfato que continuó creciendo hasta el día 8. Para el patrón de pulso único (Fig. 3 AN<sub>1</sub>) no se observó senescencia en los cultivos, ya que no se registró un descenso en la DO<sub>750</sub> mientras perduró el experimento (11 días). En el patrón de secuencia de pulsos (Fig. 2 AN<sub>2</sub>) se observó la senescencia a partir del día 4 en el tratamiento de 0,5  $\mu\text{M}$  de fosfato, a partir del día 5 en los tratamientos de 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$  y a partir del día 8 para el tratamiento de 10  $\mu\text{M}$ .

### **6.3. Comparación del efecto del patrón de pulsos de fosfato en la tasa de crecimiento de ambos aislamientos**

La mayor diferencia entre patrones de pulsos se observó a 1  $\mu\text{M}$  para AN y a 10  $\mu\text{M}$  de fosfato para AS. En el único caso que se observó que la tasa de crecimiento fue mayor o igual fue en el pulso único a 2  $\mu\text{M}$  de fosfato para AS (Fig.4). El AN presentó una mayor tasa promedio que el AS para el tratamiento de secuencia de pulsos, mientras que para el patrón de pulso único ésta fue mayor en AS (Fig.2). La tasa de crecimiento a 2  $\mu\text{M}$  de fosfato fue significativamente superior en AS para el pulso único (prueba de t:  $p < 0,05$ ). Ésta fue de  $0,296 \pm 0,041 \text{ d}^{-1}$  para AS y  $0,179 \pm 0,047 \text{ d}^{-1}$  para AN. Para la secuencia de pulsos no se observaron diferencias significativas entre aislamientos. Ambas cepas tuvieron respuestas

significativamente distintas de acuerdo al patrón de pulsos de fosfato otorgado (Tabla III).

La tasa máxima de crecimiento para la mayoría de las concentraciones de fosfato fue alcanzada entre los días 2 y 3 en ambos aislamientos para los dos patrones de pulsos, excepto en AN, a 0,5, 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de fosfato para el patrón de pulso único, donde la tasa máxima de crecimiento se registró entre los días 5 y 8.

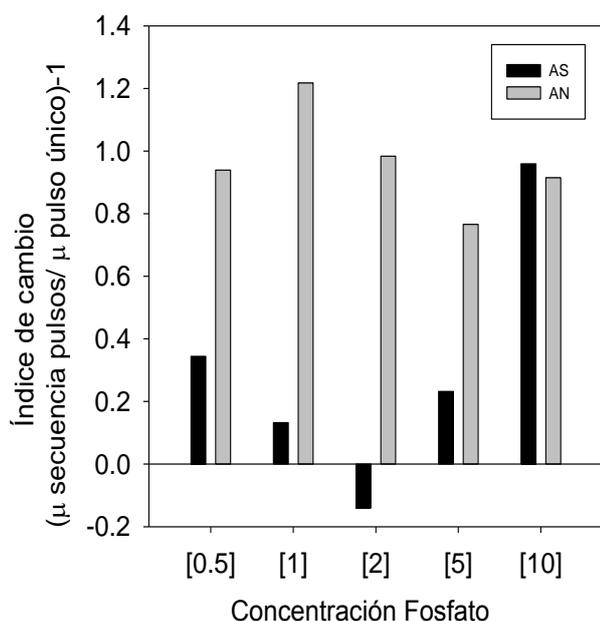


Fig. 4. Índice de cambio en las tasas de crecimiento de cada cepa de acuerdo al pulso de fosfato aplicado relación (secuencia pulsos/pulso único)-1, para cada concentración de fosfato aplicada.

Tabla III. Resultados del ANOVA de 2 vías (cepa y patrón, alfa: 0,05) para las tasas de crecimiento. Se indica el parámetro F y los grados de libertad. \*: diferencias significativas.

<b>Factores</b>	<b>F (grados de libertad)</b>	<b>p</b>
Cepa	1,382 (1)	0,241
Patrón	31,647 (1)	< 0,001*
Cepa X Patrón	8,221 (1)	0,006*

#### **6.4. Respuesta morfológica en el aislamiento sudamericano frente a diferentes patrones de fosfato**

Los valores promedio del volumen específico no fueron significativamente diferentes entre los patrones de pulsos (ANOVA:  $F = 0,140$ ,  $p = 0,712$ ). Estos fueron de  $690,55 \pm 48,49 \mu\text{m}^3$  para el patrón de pulso único (Fig. 4 AS<sub>1</sub>) y de  $713,14 \pm 48,49 \mu\text{m}^3$  para la secuencia de pulsos, (Fig. 4 AS<sub>2</sub>). No se observaron diferencias significativas entre patrones a ninguna de las concentraciones agregadas (prueba de t:  $p > 0,05$ ). El máximo valor para esta variable se observó a  $2 \mu\text{M}$  de fosfato y el mínimo a  $0,5 \mu\text{M}$ , en el patrón de pulso único. En la secuencia de pulsos, el tamaño más grande y el más chico se registró a las mismas concentraciones que para el pulso único ( $2 \mu\text{M}$  y  $0,5 \mu\text{M}$  de fosfato, respectivamente).

La relación S/V promedio de los filamentos fue significativamente superior en el patrón de pulso único (Fig. 6 AS;  $1,79 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$  y de  $1,73 \pm 0,07 \mu\text{m}^{-1}$ , pulso único y secuencia de pulsos, respectivamente, KW:  $p < 0,05$ ). Sin embargo, la máxima relación S/V se observó a  $0,5 \mu\text{M}$  de fosfato, en la secuencia de pulsos (Fig. 6 AS<sub>2</sub>;  $1,82 \pm 0,29 \mu\text{m}^{-1}$ ). En éste patrón también se observó la mínima relación S/V, a  $5 \mu\text{M}$  de fosfato (Fig. 6 AS<sub>2</sub>;  $1,66 \pm 0,29 \mu\text{m}^{-1}$ ), siendo significativamente superior en el pulso único (prueba de t:  $p < 0,05$ , Fig. 6 AS<sub>1</sub>;  $1,82 \pm 0,27 \mu\text{m}^{-1}$ ). El valor más bajo en el pulso único se observó a  $2 \mu\text{M}$  (Fig. 6 AS<sub>1</sub>;  $1,75 \pm 0,29$ ).

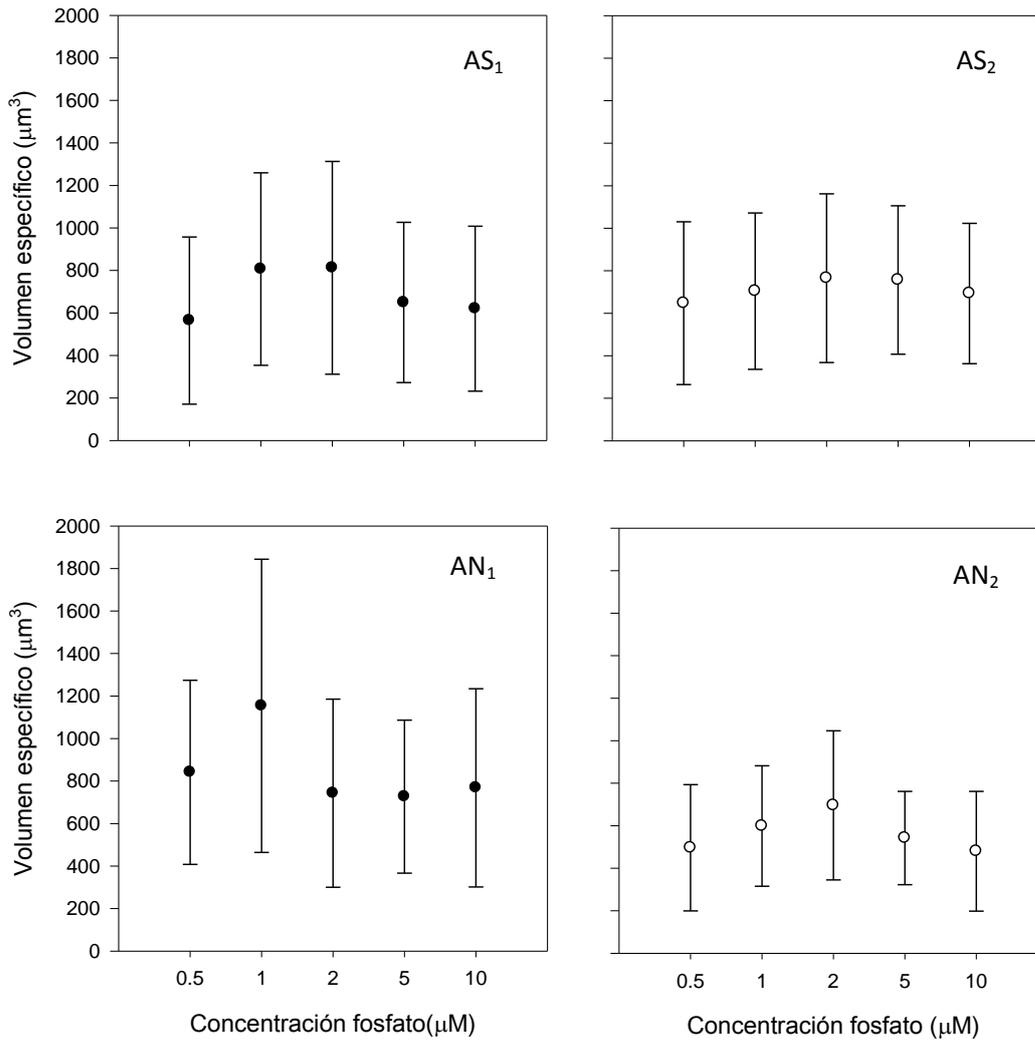


Fig. 5. Volumen específico en función de la concentración de fosfato para el aislamiento sudamericano (AS) y el norteamericano (AN). Las líneas verticales indican el desvío estándar. Los subíndices indican el patrón de pulso de fosfato; 1: pulso único (círculos negros), 2: secuencia de pulsos (círculos blancos).

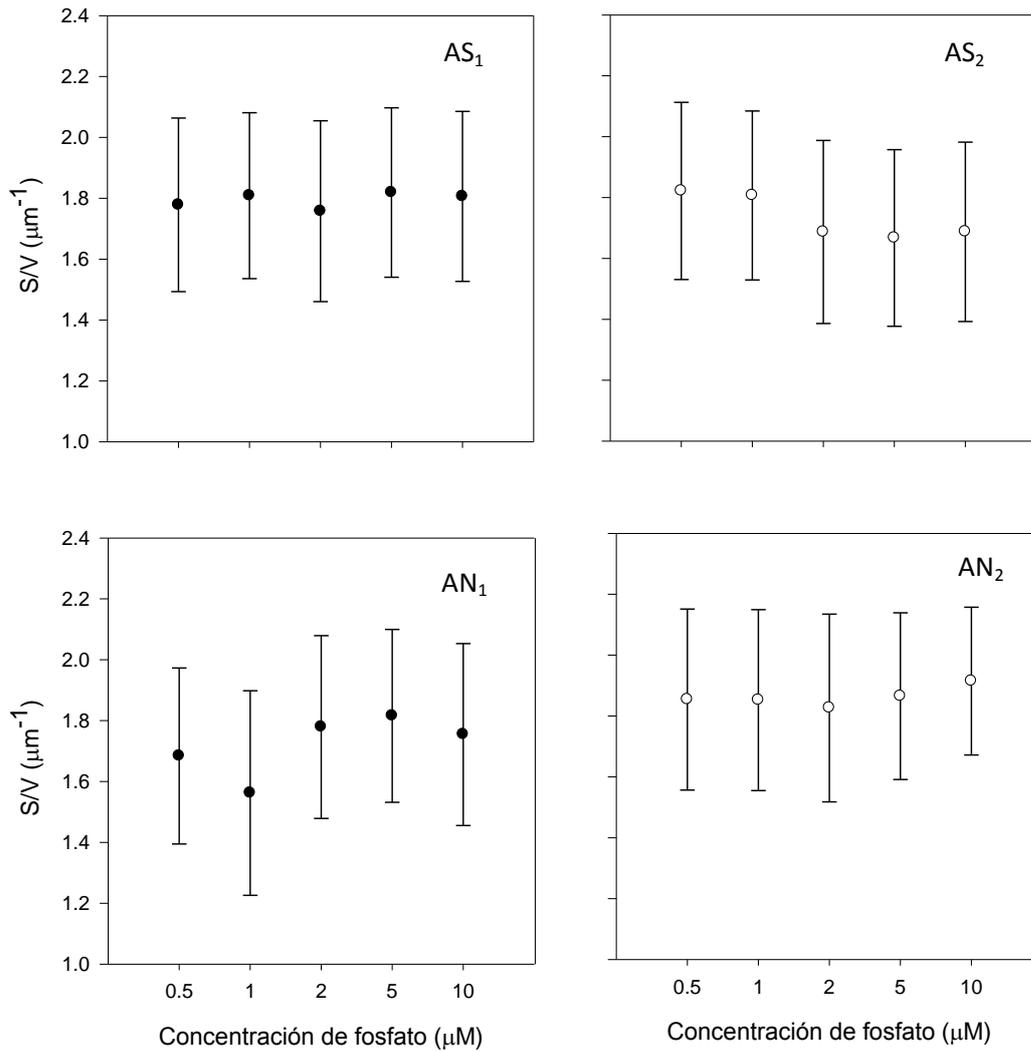


Fig. 6. Relación superficie/volumen en función de la concentración de fosfato para el aislamiento sudamericano (AS) y el norteamericano (AN). Las líneas verticales indican el desvío estándar. Los subíndices indican el patrón de pulso de fosfato; 1: pulso único (círculos negros), 2: secuencia de pulsos (círculos blancos).

### 6.5. Respuesta morfológica en el aislamiento norteamericano frente a diferentes patrones de fosfato

El valor promedio del volumen específico para el AN fue significativamente superior en el pulso único ( $846,60 \pm 177,33 \mu\text{m}^3$ , y de  $562,57 \pm 87,62 \mu\text{m}^3$ , pulso único y secuencia de pulsos, respectivamente, KW:  $p < 0,05$ ). El máximo valor de volumen específico se encontró a  $1 \mu\text{M}$  de fosfato en el pulso único (Fig. 5 AN<sub>1</sub>;  $1153,94 \pm 689,71 \mu\text{m}^3$ ), siendo significativamente superior al volumen encontrado

en la secuencia de pulsos (Fig. 5 AS<sub>2</sub>; 598,70 ± 283,36 μm<sup>3</sup>). El volumen específico más bajo se registró a 10 μM de fosfato en la secuencia de pulsos (Fig. 5 AN<sub>2</sub>; 479,78 ± 281,86 μm<sup>3</sup>). A 0,5 y 5 μM de fosfato también se observaron diferencias significativas entre los pulsos (Tabla IV); en ambos casos el volumen específico fue mayor en el pulso único. En la secuencia de pulsos el mayor volumen específico se registró a 2 μM de fosfato (Fig. 5 AN<sub>2</sub>; 695,79 ± 350,67 μm<sup>3</sup>). En el pulso único, el volumen específico más bajo se observó a 5 μM de fosfato (Fig. 5 AN<sub>1</sub>; 726,58 ± 360,09 μm<sup>3</sup>).

Se observó una diferencia significativa entre pulsos en la relación superficie/volumen promedio (Tabla V). Esta fue de 1,71 ± 0,1 μm<sup>-1</sup> para el pulso único y 1,86 ± 0,03 μm<sup>-1</sup> para la secuencia de pulsos (Fig. 6. AN). Las diferencias observadas entre los patrones dependen de la concentración agregada (Tabla V). La máxima relación S/V se registró a 10 μM de fosfato en la secuencia de pulsos (Fig. 6 AN<sub>2</sub>; 1,91 ± 0,24 μm<sup>-1</sup>) y el valor más bajo se observó en el pulso único a 1 μM (Fig. 6 AN<sub>1</sub>; 1,56 ± 0,33 μm<sup>-1</sup>). Los valores para esta variable morfométrica a 0,5 y 1 μM de fosfato fueron significativamente superiores en la secuencia de pulsos (Tabla IV). Para el pulso único, la mayor relación S/V se observó a 5 μM de fosfato (Fig. 6 AN<sub>1</sub>; 1,81 ± 0,28 μm<sup>-1</sup>) y para la secuencia de pulsos la menor relación S/V se registró a 2 μM (Fig. 6 AN 2; 1,83 ± 0,30 μm<sup>-1</sup>).

Tabla IV. Prueba de t entre patrones de fosfato a cada concentración agregada; pulso único versus secuencia de pulsos, para la variable volumen específico, en el aislamiento norteamericano. ns: no significativo.

	<b>Volumen</b>	<b>Relación S/V</b>
0.5 μM	0,005	0,003
1 μM	0,018	0,002
2 μM	ns	ns
5 μM	0,022	ns
10 μM	ns	ns

Tabla V. Resultado del ANOVA de 2 vías (patrón y concentración) para la relación superficie/volumen en el aislamiento norteamericano. \*: diferencias significativas

<b>Factores</b>	<b>F (grados de libertad)</b>	<b>p</b>
Patrón	30,149 (1)	<0,001*
Concentración	3,517 (4)	0,025*
Patrón X Concentración	2,972 (4)	0,045*

### **6.6. Comparación en las respuestas de crecimiento y morfología de los aislamientos**

Se observaron diferencias en las respuestas de los aislamientos según el patrón de fosfato en las dos variables morfológicas; volumen específico y relación S/V (ANOVA:  $F = 14,546$ ,  $p < 0,001$ ,  $F = 16,267$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente). Mientras que AS presenta mayor volumen específico promedio en la secuencia de pulsos, en AN esto se observa en el patrón de pulso único. Lo contrario sucede con la relación S/V, siendo superior en AS en el pulso único y en AN en la secuencia de pulsos. En AN el volumen específico disminuyó significativamente a 0,5, 1 y 5  $\mu\text{M}$  de fosfato cuando se aplicó el patrón secuencia de pulsos (Tabla IV), mientras que en AS no se observaron diferencias significativas entre los patrones a ninguna concentración.

La relación S/V a 0,5 y 1  $\mu\text{M}$  de fosfato en AN aumentó significativamente para el patrón secuencia de pulsos (Tabla IV), mientras que AS lo hizo a 5  $\mu\text{M}$  de fosfato pero para el patrón de pulso único. Se observan diferencias entre aislamientos, en cuanto a los valores máximos y mínimos de tasa de crecimiento y ambas variables morfológicas. La tasa de crecimiento de AS fue menor cuando se registró el valor más bajo de volumen específico y la mayor relación S/V. Sin embargo, en esas mismas condiciones, AN alcanzó la mayor tasa de crecimiento (Tabla VI).

Tabla VI. Valores máximos (▲) y mínimos (▼) absolutos de tasa de crecimiento ( $\mu$ ), volumen específico (V) y relación superficie volumen (S/V) encontrados en el aislamiento sudamericano (AS) y el norteamericano (AN). Se indica en que patrón y concentración de fosfato ( $\mu\text{M}$ ) se registraron.

Cepa	[P] ( $\mu\text{M}$ )	Pulso único			Secuencia de pulsos		
		$\mu$	V	S/V	$\mu$	V	S/V
AS	0,5	▼	▼				▲
AS	1						
AS	2		▲				▼
AS	5						
AS	10				▲		
AN	0,5	▼					
AN	1		▲				▼
AN	2						
AN	5						
AN	10				▲	▼	▲

## 7. DISCUSIÓN

Los resultados permitieron demostrar la flexibilidad fisiológica de *Cylindrospermopsis raciborskii* para optimizar el crecimiento de acuerdo al patrón de disponibilidad de fosfato. Ambos aislamientos mostraron tasas de crecimiento diferentes a la misma concentración de fosfato agregada. La tasa de crecimiento fue mayor cuando el fosfato se suministró en una secuencia de pulsos. Este aumento en la tasa de crecimiento es el resultado de un proceso fisiológico adaptativo de corta escala temporal de los sistemas de incorporación de fosfato (Aubriot et al. 2011). En este trabajo se aplicó una secuencia de pulsos que provocó un tiempo de exposición al fosfato igual o mayor a 54 minutos. La respuesta flexible del organismo depende de dos aspectos principales: el tiempo de exposición al factor ambiental y el tiempo que necesita para modificar su fenotipo (tiempo de reacción) (Walters 2005, Stomp et al. 2008). El efecto de optimización del crecimiento en la secuencia de pulsos estaría relacionado con el mayor tiempo de exposición al fosfato externo provocado en este tratamiento, lo que permitió la rápida optimización energética en la obtención y asimilación del recurso (Aubriot et al. 2011). Stomp et al. (2008) encontraron que el tiempo de exposición y el tiempo de respuesta en cianobacterias durante la adaptación cromática puede ser decisivo para las especies en ambientes fluctuantes. Por otro lado, Aubriot et al. (2011) mostraron recientemente que fitoplancton dominado por cianobacterias es capaz de adaptar la incorporación de fosfato cinética durante cortas fluctuaciones de fosfato. En un estudio previo con la cianobacteria filamentosa *Anabaena variabilis* se observó una respuesta adaptativa a una secuencia temporal de pulsos de fosfato en el lapso de 80 minutos donde un pulso persistente del nutriente provoca un estado adaptado con nuevas propiedades cinéticas y mantenidas en el tiempo (Falkner et al. 2006). Estas respuestas resultan en una mayor optimización de la asimilación del fosfato, lo que sería un factor clave en la estimulación del crecimiento de cianobacterias (Aubriot 2008). Las respuestas adaptables de los organismos muestran que los modelos clásicos de la tasa de crecimiento en función de las concentraciones externas de recursos (Monod 1950), o cuotas celulares

(Droop 1973), no reflejan la complejidad del crecimiento frente a las condiciones ambientales variables del recurso.

Las cianobacterias poseen una gran flexibilidad fenotípica para adecuarse a los cambios en el ambiente (Stomp 2008). En *C. raciborskii* se observó una gran flexibilidad en caracteres fenotípicos involucrados en la captación y aprovechamiento de la luz (Fabre 2011). Esta capacidad le permite aclimatarse y optimizar su crecimiento en ambientes con distintas intensidades lumínicas. Esto evidencia la importancia de la aclimatación de los organismos para mejorar su aptitud en el hábitat (Fabre 2011). También se han descrito algunos caracteres flexibles, como por ejemplo morfológicos, frente a distintas concentraciones de nitrógeno, según la fuente de nitrógeno disponible o la deficiencia por fósforo (Hawkins et al. 2001, Shafik et al. 2001). En este estudio la tasa de crecimiento promedio de ambas cepas fue superior cuando el fosfato se suministró en el patrón de secuencia de pulsos. Esto indicaría la capacidad de la especie de adaptarse fisiológicamente en una escala temporal de minutos y así optimizar su crecimiento. Esto le permitiría hacer un uso eficiente de las entradas transitorias de fosfato en ambientes fluctuantes, lo que redundaría en un aumento de su aptitud en el ambiente y sería una ventaja frente a otras especies.

En un estudio de campo Posselt et al. (2009) observaron que las adiciones diarias de fosfato *in situ* pueden causar aumento de la biomasa y dominancia de *C. raciborskii*. En estudios de laboratorio, se observó que *C. raciborskii* es capaz de incorporar y acumular fosfato rápidamente debido a su gran afinidad por el nutriente y la alta capacidad de almacenamiento (Isvánovics et al. 2000). Otros estudios han correlacionado la concentración de fosfato con la cuota celular de *C. raciborskii* que sugieren que ésta puede excluir a otros organismos del fitoplancton por competencia por fosfato (Padisak et al. 1997, Antenucci et al. 2005, Burford and O'Donohue 2006). Ambos estudios de laboratorio y de campo confirman que *C. raciborskii* tiene una ventaja sobre otro fitoplancton debido a su habilidad de usar entradas episódicas de fosfato. Esta gran eficiencia en la obtención del recurso limitante, sumado a la flexibilidad fenotípica para optimizar su crecimiento, le confieren una importante capacidad de crecimiento y colonización de ambientes en condiciones sub-óptimas.

Si bien ambos aislamientos respondieron con tasas de crecimiento superiores en la secuencia de pulsos, se observaron diferencias en la respuesta entre los aislamientos. Estas diferencias en la metabolización y utilización del recurso apoyaría la hipótesis de múltiples ecotipos de la especie. En un estudio reciente Piccini et al. (2011) muestra como el AS (MVCC19) difiere con otro aislamiento (MVCC14) de la misma región geográfica en cuanto a morfología, fisiología (luz e incorporación de fosfato) y genotipo sugiriendo la existencia ecotipos. En ese estudio también se observó una clara diferencia filogenética en *C. raciborskii* de distintos continentes que apoya la división temprana de las poblaciones de la especie. Dyble et al. (2002) encontraron poblaciones de *C. raciborskii* morfológica y genéticamente mezcladas en lagos de Florida (USA), indicando la presencia de diferentes ecotipos como el resultado de una rápida evolución molecular o una invasión reciente de nuevas cepas. Saker y Neilan (2001) distinguen diferentes ecotipos de *C. raciborskii* mediante sus tasas de crecimiento y producción de cylindrospermopsina bajo condiciones de deficiencia por nitrógeno. Asimismo, Chonudomkul et al. (2004) encontraron diferencias en la tolerancia a la temperatura entre ecotipos. Los mecanismos que propician la prevalencia de un ecotipo sobre otro no son claros, pero deberían involucrar adaptaciones fisiológicas (Carlson 2009), así como la existencia de ecotipos con distinta adecuación ambiental y por ende con distintas respuestas ante los cambios ambientales.

En este estudio, las diferencias significativas observadas en las tasas máximas de crecimiento de ambos aislamientos para el pulso único podrían reflejar el origen y la adecuación al ambiente al cual pertenecen. En AS la tasa máxima de crecimiento en el patrón de pulso único se registró a una concentración de fosfato baja (2  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, AN lo hizo para concentraciones mayores (10  $\mu\text{M}$ ) en el mismo patrón de fosfato. Esto podría indicar un menor requerimiento de contenido interno del nutriente por célula en AS o cuota celular de fosfato (Droop, 1973). Istvanovics et al. (2000) observaron que *C. raciborskii* es capaz de mantener una baja cuota celular de fosfato en comparación a otras cianobacterias, lo que le permite producir más biomasa por unidad de fosfato. Esto también podría deberse a que este ecotipo se encuentra dominando lagos más templados y se encuentra adaptado a las condiciones locales no tan óptimas para su crecimiento. Sin

embargo, AS es capaz de adaptar su crecimiento a las concentraciones más altas (5 y 10 $\mu$ M) en la secuencia de pulsos, mostrando un amplio rango de respuesta a los cambios ambientales del nutriente. Por otro lado, AN fue aún más sensible a los cambios en la disponibilidad de fosfato para todas las concentraciones, mostrando una mayor plasticidad fisiológica que le podría conferir ventajas en un mayor rango de ambientes. En un estudio en lagos de Florida se observó que la incorporación de fosfato favorece a *C. raciborskii* en lagos con grandes fluctuaciones del nutriente (Dobberfuhl 2003). AN también mostró una mayor tolerancia al estrés por la deficiencia de fosfato en ambos patrones de pulsos. Se podría inferir entonces que AS es oportunista en cuanto a la utilización de fosfato, creciendo rápido, a bajas concentraciones y con una menor persistencia temporal. Estudios comparativos entre las cianobacterias *Anabaena sp. vs Aphanizomenon* mostraron como éstas pueden utilizar varias estrategias en cuanto a la utilización de nitrógeno y fósforo para maximizar su crecimiento (De Nobel et al. 1997). *Anabaena sp.* domina cuando hay exceso de fosfato, mientras que *Aphanizomenon* lo hace cuando el nutriente se suministra en pulsos.

Briand et al. (2004) realizaron una serie de experimentos para identificar las características fisiológicas que explicarían la expansión de *C. raciborskii* hacia latitudes más templadas. Estos autores proponen que el éxito de *Cylindrospermopsis* en latitudes medias puede ser debido a la capacidad de tolerar un amplio rango de condiciones climáticas y al calentamiento global. Según nuestro trabajo el éxito de *C. raciborskii* también podría deberse a la alta flexibilidad fenotípica de la especie a las fluctuaciones en la disponibilidad de fosfato a corto plazo lo que podría explicar su comportamiento invasivo.

En la morfología también se observó que AN es más plástica a los cambios en la disponibilidad de fosfato. Se observaron diferencias significativas entre pulsos para ambas variables morfométricas, medidas tanto a bajas como a altas concentraciones de fosfato. Sin embargo, en AS, solo se registraron diferencias significativas en la relación S/V a concentraciones altas (5  $\mu$ M). AS parece ser más flexible a la disponibilidad de fosfato a altas concentraciones del nutriente. Esto sugiere diferencias intraespecíficas en la adecuación ambiental. Estas diferencias en la morfología también podrían deberse a que los aislamientos pertenecen a

distintas regiones geográficas. Sin embargo, en un análisis taxonómico comparativo de distintas poblaciones de *C. raciborskii* provenientes de distintas latitudes Vidal & Kruk (2008) no encontraron ninguna asociación entre los distintos morfotipos y su origen geográfico. Por lo tanto este estudio sugiere que los cambios morfológicos se deben a la flexibilidad fenotípica de la especie ante las condiciones ambientales.

No se observó una tendencia entre los aislamientos en cuanto a las respuestas combinadas de crecimiento y morfología. Cuando los aislamientos alcanzaron el menor tamaño y la mayor relación S/V, en AS se registró el menor crecimiento y en AN el mayor. Esto concuerda con Nielsen et al. (2006) que no encontraron relación entre el crecimiento y la morfología en cianobacterias multicelulares. Además, según Saker et al. (1999) el tamaño celular y la forma no estarían sujetos a un control genético estricto sino que podrían reflejar su condición ambiental.

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se demostró la flexibilidad fisiológica de *Cylindrospermopsis raciborskii* para optimizar el crecimiento de acuerdo a la disponibilidad de fosfato. La especie mostró una gran flexibilidad fenotípica reflejada en la capacidad de adaptarse fisiológicamente a cambios en la disponibilidad de fosfato a una corta escala temporal (minutos). Este resultado apoya la hipótesis 1.

La respuesta diferencial dependió de la forma en que recibieron el nutriente (pulsos únicos o secuencia de pulsos), independientemente de la concentración absoluta de fosfato aplicada. Los aislamientos mostraron distintas tasas de crecimiento cuando fueron sometidos a la misma concentración de fosfato agregado. AN fue sensible a todas las concentraciones, mientras que AS fue más sensible en las concentraciones altas (5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ). La mayor tasa de crecimiento en ambos aislamientos ocurrió cuando fueron expuestas a un patrón de secuencia de pulsos. Este tratamiento produjo un mayor tiempo de exposición al fosfato aplicado y por lo tanto permitió la optimización del crecimiento (Aubriot et al. 2011). Estos fenómenos de adaptabilidad fisiológica frente a la disponibilidad de nutrientes han sido poco estudiados en cianobacterias y podrían revelar aspectos relevantes de su éxito como organismos invasores de ambientes no tan óptimos para su crecimiento.

Las ventajas para el crecimiento fitoplanctónico pueden depender de la regulación final de las reservas, asociado a una posible menor condensación de polisfosfato y por lo tanto a una mejor disponibilidad de las reservas intracelulares del nutriente para el inicio del crecimiento (Aubriot 2008). Futuros estudios deberían incluir una evaluación primaria de la formación de los gránulos de polisfosfato, para determinar variaciones en la densidad de los mismos como consecuencia de las respuestas a los distintos pulsos del nutriente.

Las diferencias entre aislamientos observadas en las respuestas de crecimiento y morfología en cuanto a la disponibilidad de fosfato sugieren la existencia de diferentes ecotipos (hipótesis 2). La existencia de ecotipos con distintas afinidades por concentraciones altas o bajas de fosfato le permitiría a esta especie tener éxito en ambientes fluctuantes y en un amplio rango de lagos con distintos estados tróficos (Dokulil & Teubner, 2000, Piccini et al. 2011).

Sin embargo, en presencia de otros organismos se generan interacciones que pueden provocar cambios fenotípicos recíprocos en las especies interactuantes (Agrawal 2001). Según Aubriot et al. (2011) el comportamiento adaptativo observado en el fitoplancton en cuanto a la disponibilidad de fosfato brinda una perspectiva alternativa para explicar la coexistencia de muchas especies de fitoplancton. Así, la adaptabilidad de *Cylindrospermopsis raciborskii* podría minimizar las diferencias interespecíficas en la obtención del nutriente limitante y permitir la coexistencia con otros organismos. Investigaciones recientes sugieren que las comunidades dominadas por *C. raciborskii* son más diversas que las dominadas por otras filamentosas (Bonilla et al. en prep.). Sin embargo, se requieren futuros estudios sobre la adaptabilidad en la incorporación de fosfato de la especie en cultivos que incluyan otros organismos y en condiciones naturales.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres su esfuerzo, su apoyo incondicional y su confianza.

Le agradezco especialmente a mi tutor Luis, por su ayuda, dedicación y buena onda. Gracias a mi cotutora Sylvia, por su buena disposición, su interés y sus aportes.

A los compañeros de la Sección Limnología. A mis amigas, mis hermanos y a Gastón, por su interés y comprensión.

Finalmente, este trabajo fue financiado por ANII y proyecto FCE2007\_353 y PR\_FCE\_2009\_1\_2330.

## REFERENCIAS

- Abrams, P. A. 2006 *a*. Adaptive change in the resource-exploitation traits in a generalist consumer: the evolution and coexistence of generalist and specialists. *Evolution*, 60: 427-439.
- Abrams, P. A. 2006 *b*. The prerequisites for and likelihood of generalist-specialist-coexistence. *American Naturalist*, 167:329-342.
- Agrawal, A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science*, 294: 321-326.
- Antenucci, J. P., Ghadouani, A., Burford, M. A. & Romero, J. R. 2005. The long-term effect of artificial destratification on phytoplankton species composition in a subtropical reservoir. *Freshwater Biology*, 50: 1081-93.
- Aubriot, L., Bonilla, S. & Falkner, G. 2011. Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. *FEMS Microbiology Ecology*, 77: 1-16.
- Aubriot, L., 2008. Flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones en el suministro del nutriente. Tesis Doctorado, PEDECIBA-UDELAR. Montevideo, 130pp.
- Aubriot, L., Wagner, F. & Falkner, G. 2000. The phosphate uptake behaviour of phytoplankton communities in eutrophic lakes reflects alterations in the phosphate supply. *European Journal of Phycology*, 35: 255-262
- Bonilla, S. & Conde, D. 2000. El fitoplancton como descriptor sensible de cambios ambientales en las Lagunas costeras de la Reserva Bañados del Este. *Probides/UNESCO. Serie Documento de Trabajo*, 31: 63-74.
- Bonilla, S., Pérez M. C. & De León L. 1995. Chyanophyceae planctónicas del Lago Ton-Ton, Canelones, Uruguay. *Hoehnea*, 21: 185-192.
- Briand, J., Leboulanger, C., Humbert, J., Bernard, C. & Dufour, P. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology*, 40: 231-238.
- Burford, M. A. & O'Donohue M. J. 2006. A comparison of phytoplankton community assemblages in artificially and naturally mixed subtropical water reservoir. *Freshwater Biology*, 51: 973-982.

- Bourelly, P. 1985. Les algues d'eau douce. III. Editions N.Boubée et Cie, Paris. 606 pp.
- Carlson, C. A., Morris, R., Parsons, R., Treusch, A. H., Giovannoni, S. J. & Vergin, K. 2009. Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 3: 283-295.
- Chesson, P., Gebauer, R. L. E., Schwinning, S., Huntly, N., Wiegand, K., Ernest, M. S. K., Sher, A., Novoplansky, A. & Weltzin, J. F. 2004. Resource pulses, species interactions, and diversity maintenance in arid and semi-arid environments. *Oecologia*, 141: 236-253.
- 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: 345-355.
- Codd, G., Bell, S. & Brooks, W. 1989. Cyanobacterial toxins in water. *Water Science and Technology*, 21: 1-13.
- De León, L. & Yunes, J. S. 2001. First report of Microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environmental Toxicology*, 16: 110-112.
- De Nobel, W. T., Huisman, J., Snoep, J. L. & Mur, L. R. 1997. Competition for phosphorus between the N-fixing cyanobacteria *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *FEMS Microbiology Ecology*, 24: 259-67.
- Dobberfuhl, D. R. 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* in three Central Florida Lakes: Population Dynamics, Controls and Management Implications. *Lake and Reservoir Management*, 19: 341-348.
- Droop, M. R. 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology*, 17: 267-265.
- Dyble, J., Paerl, H. W. & Neilan, B. 2002. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographical origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2567-2571.

- Egas, M., Dieckmann, U. & Sabelis, M. W. 2004. Evolution restricts the coexistence of specialist and generalist: the role of trade off structure. *American Naturalist*, 163: 518-531.
- Fabre, A., Carballo, C., Hernández, E., Piriz, P., Bergamino, L., Mello, L., González, S., Pérez, G., León, J., 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: 112-125.
- Fabre, A. 2011. Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* en un gradiente lumínico. Tesis de Grado. UDELAR. Montevideo, 37pp.
- Falconer, I. & Humpage A. 1996. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycology*, 35: 74-79.
- Falconer, I. 1996. Potencial impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycology*, 35: 6-11.
- Falkner, G., Falkner, R. & Schawab, A. J. 1989. Bioenergetic characterization of transient state phosphate uptake by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology*, 152: 353-361.
- Falkner, G., Wagner, F. & Falkner, R. 1994. On the relation between phosphate uptake and growth of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Comptes Rendus de l'Académie des science*, 317: 535-541.
- Falkner, G., Priewasser, M. & Falkner, R. 2006. Information Processing by Cyanobacteria During Adaptation to Environmental Phosphate Fluctuations. *Plant Signaling & Behavior*, 1: 212-220.
- Ferber, L., Levine, S., Lini, A. & Livingston, G. 2004. Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshwater Biology*, 49: 690-708.
- Ferreira, R. M. 2007. Efeitos da limitacao de fósforo na eficiencia fotossintetica, na morfología e no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Tesis de Maestria. Universidade Federal de Juiz de Fora, 57pp.
- Gabriel, W. 2005. How stress selects for reversible phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 873-883.

- Gabriel, W. 2006. Selective advantage of irreversible and reversible phenotypic plasticity. *Archiv für Hydrobiologie*, 167: 1-20.
- Gélinas, M., Pinel-Alloul, B., and Slusarczyk, M. 2007. Alternative antipredator responses of two coexisting *Daphnia* species to negative size selection by YOY perch. *Journal of Plankton Research*, 29: 775-789.
- Graham, L. E. & Wilcox, L. W. 2000. *Algae*. Prentice Hall, Upper Saddle River. 640pp.
- 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. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 1097-1100.
- Hamilton, P. B., Ley, L. M., Dean, S. & Pick, F. R. 2005. The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. *Phycologia*, 44: 17-25.
- Hawkins, P., Putt, E., Falconer, I. & Humpage, A. 2001. Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture. *Environmental Toxicology*, 16: 460-467.
- Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U. & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalga. *Phycologia*, 35: 403-424.
- Hudson, J. J., Taylor, W. D. & Schindler, D. W. 2000. Phosphate concentrations in lakes. *Nature*, 406: 54-56.
- Istvánovics, V., Shafik, H. M., Presing, M. & Juhos, S. 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology*, 43:257-275.
- Kahl, L. A. & Schofield, O. 2008. Effects of phytoplankton physiology on export flux. *Marine Ecology Progress Series*, 354: 3-19.
- Kingsolver, J. G. & Huey, R. B. 1998. Evolutionary analyses of morphological and physiological plasticity in thermally variable environments. *American Zoology*, 38: 545-560.
- Komarkova, J. 1998. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In T Azevedo (ed.). *Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reuniao Ibero Americana de Ficologia e VII Reuniao Brasileira de Ficologia*, Sao Paulo, Brasil, 1: 327:340.

- Kruk, C. & De León, L. 2002. Asociaciones de fitoplancton en lagos y embalses del Uruguay: validación y aplicación a la gestión de sistemas acuáticos. En Fernández-Cirelli, A. & Chalar G. (Eds.) El agua en Iberoamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica. CYTED XVII y CETA: 143-155.
- Kruk, C., Vidal, L. & Hein, V. 2003. Floraciones de microalgas en sistemas continentales del Uruguay. I Encuentro de Ecología del Uruguay, Montevideo, Libro de Resúmenes. Facultad de Ciencias.
- Miner, B. G., Sultan, S. E., Morgan, S. G., Padilla, D. K. & Relyea, R. A. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 685-692.
- Monod, J. 1950. La technique de culture continué. Théorie et applications, *Annales de L'Institut Pasteur, Paris*, 79: 390-410.
- Moustaka-Gouni, M., Kormas, K. A., Vardaka, E., Katsiapi, M. & Gkelis, S. 2009. *Raphidiopsis mediterranea* Skuja represents non-heterocytous life-cycle stages of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynnska) Seenayya et Subba Raju in Lake Kastoria (Greece), its type locality: Evidence by morphological and phylogenetic analysis. *Harmful Algae*, 8: 864-872.
- Nielsen, S. L. 2006. Size-dependent growth rates in eukaryotic and prokaryotic algae exemplified by green algae and cyanobacteria: comparisons between unicells and colonial growth forms. *Journal of Plankton Research*, 28: 489-498.
- Oliver, R. & Ganf, G. 2000. Freshwater blooms. En: *The Ecology of Cyanobacteria*. Whiton B. & Potts. M. Eds., Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 149-194.
- Padilla, D. K., & Adolph, S. C. 1996. Plastic inducible morphologies are not always adaptative: the importance of time delays in a stochastic environment. *Evolutionary Ecology*, 10:105-117.
- Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv für Hydrobiologie-Supplement*, 4: 563-93.
- Paerl, H. W & Huisman, J. 2008. Blooms like it hot. *Science*, 320: 57-58.

- Pérez, M. C., Bonilla, S., De León, L., Smarda & Komárek, J. 1999. A bloom of *Nodularia báltica/spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. *Algological Studies*, 93: 91-101.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Gianni, A., Figueredo, C. C., Vidal, L., Kruk, C. & Bonilla, S. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, en prensa. DOI: 10.1016/j.hal.2011.04.016 (SCI 2099: 2.500).
- Posselt, A. J. & Burford, M. A. 2009. Pulses of phosphate promote dominance of the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. *Journal of Phycology*, 45: 540-546.
- Reynold, C. S. & Walsby, A. E. 1975. Water-blooms. *Biology Review*, 50: 437-481.
- Reynolds, C. S. 1987. Cyanobacterial water-blooms. Callow JA (ed.) *Advances in Botanical Research*. Academic Press London, 13: 67-143.
- Saker, M. L. & Neilan, B. A. 2001. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Applied Microbiology*, 67: 1839-1845.
- Saker, M. L. & Eaglesham, G. K. 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon*, 37: 1065-1077.
- Schindler, D. 1977. The evolution of phosphorous limitation in lakes. *Science*, 195: 260-262.
- Schindler, D. 2006. Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *Limnology and Oceanography*, 51: 356-363.
- Shafik, H., Heroder, S., Présing, M. & Vörös, L. 2001. Factors affecting growth and cell composition of cyanoprokariote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wołoszyńska) Seenayya et Subba Raju. *Algological Studies*, 103: 75-93.
- Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35: 171-205.
- Stomp, M., Van Dijk, M., Van Overzee, H., Wortel, M., Sigon, C., Egas, M., Hoogveld, H., Gons, H., & Huisman, J. 2008. The timescale of phenotypic plasticity and its

- impact on competition in fluctuating environments. *The American Naturalist*, 172: 169-185.
- Stuken, A., Rucker, J., Endrulant, 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 ophanizomenoides*. *Phycologia*, 45:696-703.
- Van der Stap, I., Vos, M. & Mooij, W. M. 2007. Inducible defenses and rotifer food chain dynamics. *Hydrobiologia*, 593:103-110.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Vidal, L. & Kruk, C. 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguay eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3: 142-151.
- Walters, R. 2005. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 56: 435-447.
- Wiedner, C., Rucker, J., Brüggemann, R & Nixdorf, B. 2007. Climate changes affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*, 152: 473-484.
- Willmer, P., Stone, G. & Johnston, I. 2005. *Environmental Physiology of Animals*. 2<sup>nd</sup> edn. Oxford, UK: Blackwell Science.