

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Departamento de Microbiología
Montevideo, Uruguay

**Variables ambientales que influyen en la abundancia y
diversidad de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. en el
embalse de Salto Grande**



Licenciatura en Ciencias Biológicas
Álvaro Facundo Lepillanca Fernandez

Orientadores:

Dra. Claudia Piccini, Lic. Gabriela Martínez de la Escalera.

Departamento de Microbiología, IIBCE.

Índice

Índice.....	2
Resumen	3
Introducción	5
Generalidades de cianobacterias.....	5
- <i>Microcystis</i> y microcistinas.....	6
- <i>Dolichospermum</i> y saxitoxina.....	9
Detección de cianotoxinas.....	11
Antecedentes.....	12
Sitio de estudio.....	13
Hipótesis.....	14
Objetivos generales.....	14
Objetivos específicos	14
Metodología	15
Estrategia de la investigación	15
Muestras.....	15
Análisis de datos.....	18
Resultados	19
Caracterización ambiental.....	19
Caracterización biológica	21
Obtención de ADN.....	23
Abundancia de cianobacterias tóxicas y su relación con las características ambientales	24
Diversidad de genotipos <i>mcyJ</i>	26
Discusión.....	28
Conclusiones	33
Agradecimientos	34
Bibliografía	35

Resumen

Las floraciones de cianobacterias son eventos en los que se produce un incremento de la biomasa de algunas especies en períodos cortos o prolongados de tiempo. La importancia de éstas radica en el impacto que tienen sobre el ecosistema, alterando el ciclado de nutrientes, disminuyendo la disponibilidad de luz y la biodiversidad. Algunos géneros y especies de cianobacterias, tales como *Microcystis* y *Dolichospermum*, tienen la capacidad de producir cianotoxinas (microcistinas y saxitoxinas, respectivamente), constituyendo su presencia una amenaza potencial para la salud humana y ecosistémica. En las floraciones de cianobacterias pueden encontrarse una mezcla de diversos genotipos tóxicos y no tóxicos, las cuales varían en sus cantidades relativas dependiendo de determinadas condiciones ambientales. Trabajos anteriores demostraron que las variables ambientales más importantes en determinar la distribución de genotipos tóxicos en el Río Uruguay y Río de la Plata son la temperatura y la salinidad.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el potencial tóxico de poblaciones de cianobacterias del embalse de Salto Grande, ubicado en el río Uruguay, y conocer la diversidad de dichas poblaciones. Con el fin de evaluar el potencial tóxico de cianobacterias del embalse de Salto Grande, se utilizaron muestras de agua fijadas en lugol obtenidas en los meses de febrero, marzo, abril, junio, julio, agosto y septiembre, durante el año 2013 por la Comisión Técnico Mixta de Salto Grande. Asimismo, se contó con datos ambientales y abundancia de cianobacterias y toxinas, asociados a las muestras. Dado que las muestras se encontraban fijadas con lugol, como primer paso se puso a punto un método para extraer el ADN de las mismas. Posteriormente, se cuantificó el número de copias de genes involucrados en la síntesis de microcistinas (*mcyE*) y saxitoxinas (*sxtU*) mediante qPCR en tiempo real, dato que se utilizó como *proxy* de la abundancia de células potencialmente productoras de dichas toxinas. La presencia de *mcyE* se detectó en todos los sitios del embalse en todos los meses evaluados, se correlacionó positiva y significativamente con la concentración de microcistina-LR, y la temperatura del agua. Asimismo, la concentración de microcistina-LR se correlacionó positiva y significativamente con la concentración de clorofila-*a*, la abundancia de células de *Microcystis* spp. y de *Dolichospermum* spp. El gen *sxtU* solo fue detectado en un sitio, en una muestra de invierno y otra de verano. Una vez conocida la abundancia de organismos potencialmente tóxicos y dado que los genes para la síntesis de microcistinas fueron los más frecuentemente detectados, se evaluó la diversidad de organismos tóxicos del género *Microcystis*, empleando para ello un análisis de desnaturalización de alta resolución (HRMA) del gen *mcyJ*. Los perfiles de *melting* obtenidos se evaluaron mediante métodos de agrupamiento y se observaron dos *clusters* de genotipos *mcyJ* claramente definidos. El *cluster* 1 (genotipo invernal) se caracterizó por estar presente a bajas temperaturas (temperatura media 15,7 °C) y a mayor conductividad del agua respecto al *cluster* 2. Éste a su vez se caracterizó por dominar a

temperaturas más altas (temperatura media 21,5°C) y a baja conductividad (genotipo estival). Asimismo, el genotipo invernal presentó bajas abundancias de células de *Microcystis* y la concentración de microcistinas producidas estuvo debajo del límite de detección, mientras que el genotipo estival mostró mayor abundancia de células de *Microcystis* y alta concentración de microcistinas (96 µg L⁻¹). Los resultados obtenidos sugieren que aquellas condiciones ambientales que favorezcan altas temperaturas del agua promueven el crecimiento de floraciones de *Microcystis* spp. con potencial tóxico. Además, las poblaciones tóxicas de *Microcystis* spp. que florecen en verano son diferentes a las que se mantienen durante el invierno y confirman que la temperatura del agua es una variable crucial que controlan su abundancia y toxicidad.

Introducción

Generalidades de cianobacterias

Las cianobacterias son organismos procariotas que realizan fotosíntesis oxigénica por medio de clorofila-a y pigmentos accesorios. Es común encontrarlas en ecosistemas acuáticos (aguas continentales), pero también es posibles encontrarlas en ecosistemas semi-terrestres (helechos acuáticos) y terrestres (UNESCO, 2009). Un ejemplo son las cianobacterias del género *Nostoc*, las cuales son simbiotes de hongos formando el 10% de los líquenes conocidos. Algunas especies son capaces de tolerar condiciones extremas como aguas termales (Ward et al. 1994) o de vivir en cavernas en los desiertos (Whitton & Potts 2000).

Sin embargo, la mayor parte de las especies de cianobacterias se encuentran en ecosistemas acuáticos continentales (sistemas límnicos), habitando tanto en el bentos como en la columna de agua (Whitton & Potts, 2000). Aquellas que habitan en la columna de agua son parte del fitoplancton y juegan un rol muy importante en la producción primaria acuática (Reynolds 1984). Presentan diferentes niveles de organización: uni-celulares, coloniales y filamentosas. Algunas cianobacterias filamentosas presentan células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico (heterocitos) en las cuales se ensancha la pared y se desintegran los fotosistemas, esta función la lleva a cabo la enzima nitrogenasa que requiere de condiciones anóxicas para su función (van Den Hoek et al., 1995). Otras células se especializan en almacenar reservas en condiciones de estrés ambiental y a la vez actúan como una espora de resistencia (acinetes) (Figura 1). Para evitar la sedimentación algunas cianobacterias presentan vesículas de gas que permite regular su posición en la columna de agua (Visser & Ibelings 2005). Las cianobacterias tienen la capacidad de almacenar fósforo (Kuleav & Vagobov, 1983) y nitrógeno (Flores & Herrero, 2005). Aubriot y colaboradores (2011) encontraron que algunas cianobacterias como *Planktothrix agardhii* y *Raphidiopsis mediterránea* son fisiológicamente flexibles, optimizando rápidamente la captación de nutrientes cuando estos fluctúan o son limitantes, ofreciéndoles una ventaja frente a otras poblaciones del fitoplancton (Aubriot et al., 2011).

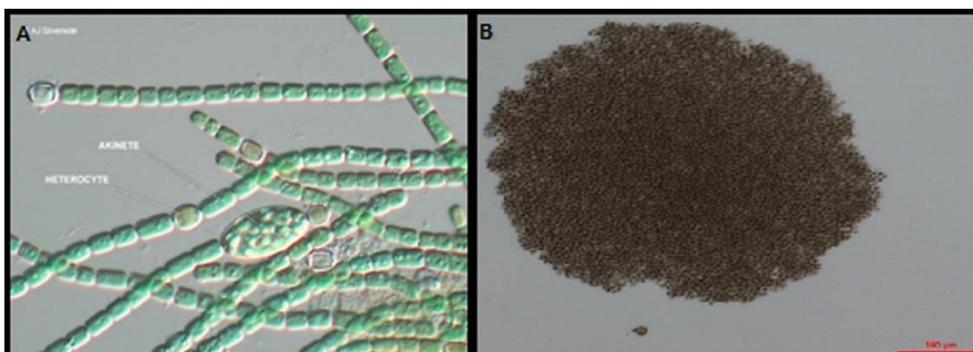


Figura 1. A- Estructuras especializadas (acinetes y heterocistos) *Dolichospermum* spp. B- Colonia de *Microcystis* spp. Imágenes tomadas de Algaebase

Floraciones y cianotoxinas

Las floraciones de cianobacterias son eventos en los que se produce un incremento de la biomasa de algunas especies en períodos cortos o prolongados de tiempo. La importancia de estos eventos radica en el impacto que tienen sobre el ecosistema acuático, ya que alteran el ciclo de los nutrientes y disminuyen la disponibilidad de luz y oxígeno, causando una disminución de la biodiversidad y deterioro de la calidad del agua (Sivonen & Jones, 1999; Havens, 2007; Karjalainen, et al., 2007). En Uruguay se han registrado floraciones de cianobacterias en diferentes ecosistemas acuáticos desde la década de los 80 (Feola, et al., 2008; Kruk, et al., 2015; Bonilla, et al., 2015). Las especies de cianobacterias formadoras de floraciones más frecuentemente encontradas son *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* y *Cylindrospermopsis raciborskii* (Bonilla, 1997; De León & Yunes, 2001; Vidal & Kruk, 2008; UNESCO, 2009; Aubriot, et al. 2011). Las floraciones son favorecidas por las actividades antropogénicas (actividad agrícola-ganadera, industrial y urbanización), tales como el uso de fertilizantes y el vertido al agua de desechos domiciliarios no procesados, entre otros (Mazzeo, et al., 2002; Chalar, 2009; Rodríguez-Gallego, 2010). Estas actividades aportan nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo) al ecosistema acuático y causan su eutrofización, favoreciendo el crecimiento de cianobacterias (De León & Yunes, 2001).

Una de las preocupaciones asociadas a la presencia de floraciones de cianobacterias es debida a la capacidad de producir toxinas (cianotoxinas) que tienen algunas especies. Se sugiere que las cianotoxinas son metabolitos secundarios, sin embargo, otros estudios sugieren que la producción podría estar acoplada a la división celular y por lo tanto ser un metabolito esencial (Orr & Jones, 1998). Las variables ambientales como la temperatura, nutrientes, conductividad, influyen sobre la producción de cianotoxinas, sin embargo hasta el momento no se conocen las posibles combinaciones de variables ambientales que estimulan la producción de toxinas (Paerl & Huisman, 2009; O'Neil, et al., 2012).

-Microcystis y microcistinas

El género *Microcystis* se caracteriza por poseer células del tipo cocoides, capaces de formar colonias envueltas por mucílago (en las cuales las células se distribuyen homogéneamente) y con presencia de vacuolas (Komárek & Kormáková, 2002). Las cianobacterias pertenecientes al género *Microcystis* tienen una amplia distribución en latitudes bajas y medias (Paerl & Otten, 2013; Harke et al., 2016), están presentes en regiones templadas frías a regiones tropicales, donde la

temperatura del agua varía de 12 a 30 °C (Li, Peng & Xiao, 2015). Las especies de *Microcystis* pueden adaptarse a una gama amplia de intensidades de luz desde la oscuridad (Zhang et al., 2011) hasta 1100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Ibelings, Kroon & Mur, 1994) e incluso ultravioleta (Sommaruga, Chen & Liu, 2009). Además, las colonias de *Microcystis* pueden regular la flotabilidad mediante vesículas de gas intracelular (Walsby et al., 1997).

La formación de colonias en *Microcystis* se considera fundamental en la ecología de estas cianobacterias, pueden reducir la herbivora del zooplancton, resistir turbulencias del agua provocadas por vientos ligeros a moderados como consecuencia de su flotabilidad (Walsby, Hayes & Boje, 1995) y brindar protección contra metales pesados (Wu et al., 2007) y sustancias tóxicas (Li et al., 2013). Las floraciones de *Microcystis* inciden a nivel ambiental y ecológico, afectando el agua potable, la producción de olores y disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto durante la descomposición (Qin et al., 2010). Algunas especies de este género son potencialmente productoras de cianotoxinas (ej: microcistinas), lo cual implica un riesgo para la salud de animales y humanos (Rastogi, Sinha & Incharoensakdi, 2014). Las floraciones tóxicas también tienen costos económicos debido a la necesidad de tratamientos de agua más estrictos, a la disminución de los ingresos por turismo y recreacionales (Hamilton et al., 2013).

Se ha descrito que en una floración de *Microcystis* spp. conviven poblaciones tóxicas (células que contienen los genes vinculados con la producción de toxinas, *mcyA-Z*) y no tóxicas (células que no contienen los genes para la síntesis), siendo la presencia de los genes involucrados en la síntesis de microcistinas el determinante de su toxicidad (Rinta-Kanto, et al., 2009).

Los primeros registros de floraciones de *Microcystis* spp. en Uruguay fueron en el embalse de Salto Grande y Río de la Plata (Quirós & Luchini, 1982, De Leon & Yunes, 2001). En la actualidad se siguen registrando floraciones en todas las estaciones del año en el embalse de Salto Grande (Bordet, et al., 2017). Asimismo, las floraciones de *Microcystis aeruginosa* fueron reportadas en otros ecosistemas uruguayos, son frecuentes en lagos someros, aguas continentales y en el Río de la Plata (Quirós & Licchini 1982; De León & Yunes 2001; Ferrari & Vidal 2006; Sienra & Ferrari 2006). Kruk et al. (2015) detectaron la presencia de floraciones de especies de *Microcystis* en el Río Uruguay tanto en verano como en invierno, sugiriendo que dadas las condiciones nutricionales adecuadas estos organismos son capaces de proliferar a bajas temperaturas.

Las microcistinas son las toxinas más frecuentes en aguas continentales, pertenecen a una familia de más de 100 variantes de heptapéptidos cíclicos estables (Vestervik et al., 2012) (Figura 2). Las microcistinas son potentes inhibidores de las proteínas eucariotas fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A) lo que lleva a la destrucción de las células hepáticas y pérdida de células de soporte (MacKintosh et al., 1990). Las proteínas PP1 y PP2A están implicadas en muchos procesos

celulares como la división celular, la síntesis de proteínas, la señalización celular, la contracción muscular, el transporte de calcio (Ware et al, 1995).

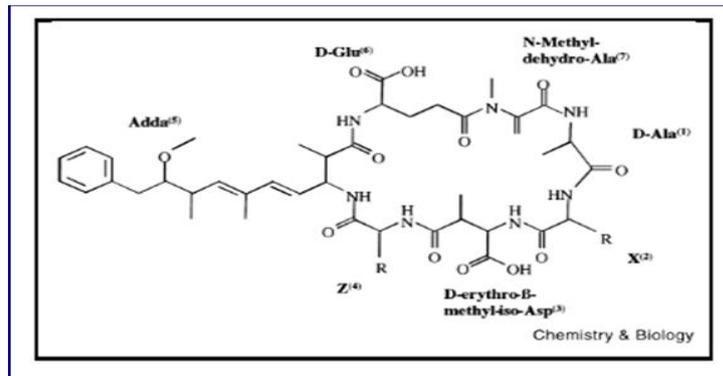


Figura 2. Estructura química general de las microcistinas, las posiciones Z y X se pueden unir diferentes grupos químicos que lleven a la producción de las diferentes variantes (Tillet et al., 2000).

La biosíntesis de las microcistinas en *Microcystis* es realizada por dos complejos enzimáticos, el complejo polikétido sintasa (KPS) en conjunto con el complejo péptido sintetasa (NRPS) (Tillett et al., 2000) que están codificados en el *cluster mcy* que contiene de 9 a 10 genes (*mcyA-J*) dependiendo de la especie (Figura 3). Para estudios de diversidad genética se propone utilizar el gen *mcyJ*. La elección de este gen estuvo basada en las evidencias que indican que no sufre recombinación (a diferencia de *mcyA,B,C*) y por lo tanto su secuencia presenta un mayor grado de conservación que la del resto de los genes del *cluster mcy*. Estas características lo convierten en candidato para estudios filogenéticos (Tanabe et al., 2004;2009, Kim, et al., 2010).

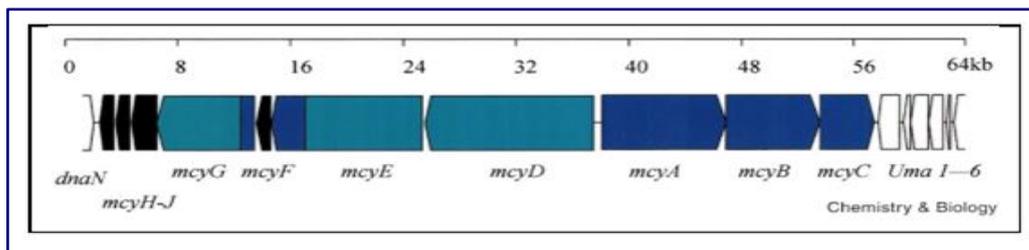


Figura 3. Cluster de microcystina de *Microcystis* spp., genes involucrados en la síntesis: *mcyA-J*. (Tillet et al., 2000).

Se ha descrito que la producción de microcistinas está influida por factores físicos-químicos tales como la concentración de nutrientes (Van de Waal et al., 2009-2014; Oh et al., 2000; Long et al., 2001; Herke & Gobler, 2013), la temperatura del agua (van derWesthuizen & Eloff, 1985; Amé & Wunderlin, 2005; Dziallas & Grossart, 2011) y la luz (Kaebernick et al., 2000; Phelan & Downing, 2011) (ver Revisión de Harke et al., 2015). Estudios basados en cultivos demostraron que la concentración de microcistinas aumentaba a temperaturas altas, entre 20 a 25 °C (van derWesthuizen y Eloff, 1985; Amé & Wunderlin, 2005). En este sentido, Dziallas y Grossart (2011)

estudiaron la influencia de la temperatura en la síntesis de microcistinas, encontrando que la producción de dichas toxinas fue mayor entre 20 y 25 °C y que la síntesis disminuía significativamente a temperaturas próximas a los 32 °C (Dziallas & Grossart., 2011). Wang y col. (2009) encontraron que la temperatura del agua, la concentración de nutrientes y el oxígeno disuelto están asociados positivamente a la producción de microcistina-LR en *Microcystis* spp. Otros estudios resaltan la importancia de la luz en la producción de microcistinas y la tasa de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* (Keabernick et al., 2000; Phelan & Downing, 2011). Cabe mencionar que los estudios basados en cultivos generalmente usan cepas unicelulares las cuales no tienen el mismo desempeño ecológico que las colonias de *Microcystis* (i.e. Kruk et al., 2017).

-*Dolichospermum* y saxitoxina

El género *Dolichospermum* está compuesto por especies de cianobacterias que previamente formaban parte del género *Anabaena* (Wacklin et al., 2009). Esta separación se basó en análisis filogenéticos utilizando el gen 16s rRNA, el cual agrupo las especies planctónicas (con presencia de vesículas de gas) de género *Anabaena*. Presentan células especializadas en la fijación de N₂ (heterocitos) y células de resistencia (acinetes), permitiendo que puedan sobrevivir en periodos de estrés ambiental (Komárek & Anagnostidis, 1989; Komárek, 2010). Son clasificados como organismos diazotróficos, sensibles a la mezcla y a la baja disponibilidad de luz, utilizando la regulación de la flotabilidad para optimizar las oportunidades de crecimiento (Reynolds et al., 2002). Sin embargo, las floraciones de *Dolichospermum* se ven beneficiadas en ecosistemas eutróficos donde el nitrógeno y el fósforo se encuentran en exceso (Heiskanen y Leppäenén, 1995; Anderson et al., 2002; Paerl et al., 2011). Los efectos combinados de la eutrofización de los cuerpos de agua y el cambio climático provocan que las floraciones de *Dolichospermum* tengan una distribución más amplia, una duración prolongada y una intensidad más fuerte (Singh et al., 2010:2013; Koreivienė y Kasperovičienė, 2011; Huber et al., 2012; O'Neil et al., 2012; Cirés et al., 2013; Slim et al., 2014). Las especies de *Dolichospermum* pueden producir varios tipos de toxinas, se estima que el 75% de las floraciones son tóxicas (Chorus y Bartram, 1999). Las toxinas producidas por las floraciones de *Dolichospermum* presentan una amenaza potencial para los animales y el ambiente (Torokne et al., 2001; Weirich y Miller, 2014).

La saxitoxina es una perhidropurina tricíclica que permite varias sustituciones químicas, con lo que se originan más de treinta compuestos análogos (Wiegand y Pflugmacher, 2005) (Figura 4). Bloquea los canales de sodio presentes en las membranas de las células nerviosas, impidiendo la conducción del impulso nervioso (Chambell&Hille, 1976; Wang et al., 2003). Es producida por diferentes organismos marinos, tales como los dinoflagelados (Catterall, 1980; Harada et al., 1982),

y por organismos dulceacuícolas como las cianobacterias (Alam et al 1973; Pomati et al., 2000). El *cluster* de *sxt* contiene 27 genes (*sxt A-Z*) involucrados en la biosíntesis de la toxina (Figura 5).

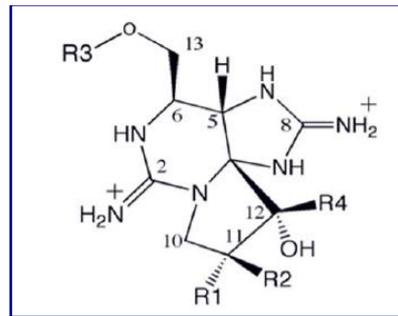


Figura 4. Estructura de general de saxitoxina y los grupos que pueden ser modificados para formar los análogos (R1,2,3,4).

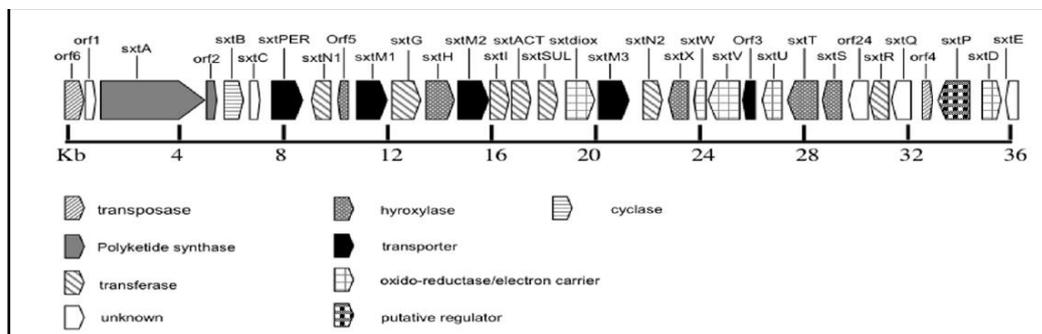


Figura 5. Estructura del *cluster* de saxitoxina para *Cyndrospermopsis raciborskii* T3 (Kellmann et al., 2008).

Se ha descrito que en *Cyndrospermopsis raciborskii* la producción de saxitoxina estaría influida por la intensidad y la calidad de luz, ya que Carneiro et al. (2009) observaron que cuando las condiciones de luz eran $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la concentración era más alta respecto a las otras condiciones evaluadas ($50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $150 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Carneiro et al., 2009). En este sentido, Beamud et al. (2016) evaluaron el efecto de la influencia de la radiación ultravioleta (UV-B) en cepas de *Cyndrospermopsis raciborskii* encontrando un aumento significativo en la concentración de saxitoxina y en la expresión del gen *sxtU* (Beamud et al., 2016). Vico et al. (2016) evaluaron el efecto de la disponibilidad de nitrato en la abundancia relativa de transcripción de dos genes (*sxtU* y *sxtI*) involucrados en diferentes pasos de la biosíntesis de saxitoxina, encontraron que la biosíntesis de saxitoxina y análogos en *Cyndrospermopsis raciborskii* no está relacionada con la disponibilidad de nitrato, sino que está relacionada con la tasa de crecimiento (Vico et al., 2016). Castro et al. (2004) estudiaron el contenido de la toxina en *Cyndrospermopsis raciborskii* a diferentes temperaturas y no encontraron diferencias significativas, por lo cual prepusieron que la saxitoxina tiene una estabilidad muy alta y que puede permanecer activa hasta 30 días después de su síntesis (Castro et al., 2004).

Detección de cianotoxinas

Existen diferentes metodologías para la detección y cuantificación de cianotoxinas. Dentro de las más utilizadas se encuentran el test de inhibición de la proteína-fosfatasa (PPI), el cual permite obtener la suma total de equivalentes de toxina; ensayos inmunológicos (ELISA), que permiten conocer las diversas variantes de toxinas dependiendo de la reactividad cruzada del anticuerpo; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que determina toxinas individuales o grupos, entre otros métodos analíticos de alta performance. Las desventajas de éstos son la reactividad cruzada que puede ocurrir en los ensayos de ELISA y PPI, y en el caso de la HPLC la desventaja radica en que la detección y precisión depende del método utilizado (UNESCO, 2009). Por otro lado, la implementación de los métodos moleculares basados en la técnica de PCR presentan una ventaja frente a los anteriores ya que son rápidos, eficaces, extremadamente sensibles y específicos y permiten el análisis de varios productos a la vez. La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una herramienta que permite realizar estudios de monitoreos cuantitativos de especies dentro de las floraciones de cianobacterias (Rentala et al., 2006; Kruk et al., 2015). La técnica de HRMA (*High Resolution Melting Analysis*) fue desarrollada para la detección de variantes en la secuencia de ADN, tiene aplicaciones en el campo de la medicina para el diagnóstico clínico (Vossen et al., 2009). También es utilizada para la detección de mutaciones y polimorfismos en poblaciones bacterianas (Hjelmsø et al., 2014; Zeyoudi et al., 2015; Hjelmsø et al., 2014; Thomsen et al., 2012; Hofinger et al., 2009; Thomsen et al., 2012). Por otro lado, se puede implementar para estudios de diversidad genética en poblaciones de cianobacterias del género *Microcystis* (Manali et al., 2017, Martínez de la Escalera, com, pers.). Esta técnica se basa en la realización de qPCR y una posterior desnaturalización a alta resolución (variando la temperatura 0,1 °C) que produce un perfil característico de *melting*. Las curvas de *melting* varían dependiendo del contenido G-C, longitud y secuencia del fragmento amplificado.

Antecedentes

Estudios anteriores de nuestro grupo de investigación mostraron que a lo largo del gradiente ambiental comprendido por el Río Uruguay y el Río de la Plata existen diferentes genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. identificados de acuerdo a las variaciones en las secuencias nucleotídicas del gen *mcyJ*. Cada genotipo identificado se asoció a un conjunto determinado de condiciones ambientales, principalmente en relación a la temperatura, salinidad y turbidez. Este hallazgo llevó a proponer la existencia de ecotipos de *Microcystis* spp. adaptados a distintas condiciones ambientales (Martínez de la Escalera, com. pers.). En este contexto, existirían distintas poblaciones de *Microcystis* adaptadas a condiciones ambientales claramente diferentes, tales como baja temperatura o alta conductividad, lo que evidencia la existencia de una gran diversidad intraespecífica que sería crucial para el éxito y proliferación de estos organismos (Martínez de la Escalera, com. pers.).

Sitio de estudio

El embalse de Salto Grande se ubica en el Departamento de Salto, 29° 43' y 31° 12' S y los meridianos 57° 06' y 57° 55' O. Comprende una obra de represamiento del río Uruguay de carácter binacional Argentino-Uruguayo. Fue creado para la generación de energía hidroeléctrica pero también es utilizado con fines domésticos, sanitarios, navegación y riego. Por su temperatura media anual mayor a 15 °C y su temperatura mínima superior a 10 °C es considerado un sistema cálido tropical (Salas & Martino, 1991). Dentro del embalse se distinguen dos zonas, una central que abarca el 70% de la superficie total y otra que incluye los cinco brazos laterales con distintas características (Quirós & Cuch, 1982; Quirós & Luchini, 1982). Los principales usos de la cuenca son: agricultura (ej: cultivo de cítricos, arroz), avicultura y ganadería. Según datos aportados por la DINAMA se estima que los desechos provenientes de Artigas y Salto de tambos son de 1111,9 ton bs año⁻¹, agroindustriales 21943,8 ton bs año⁻¹, sector porcino 1528,4 ton bs año⁻¹ y residuos de encierro de corral 7058,2 ton bs año⁻¹. Estas actividades generan un ingreso de nutrientes al cuerpo de agua principalmente nitrógeno y fósforo, que son utilizados por las cianobacterias para su crecimiento. Sin embargo, varias ciudades como Constitución y Belén en Uruguay; y Federación y Santa Ana en Argentina también vierten sus desechos al agua incrementando aún más el aporte de nutrientes. Se clasifica como un sistema eutrófico según la concentración media anual de fósforo total, en algunos veranos por su concentración de clorofila-a y abundancia de fitoplancton (Chalar et al, 1993). En los brazos del embalse se han registrado floraciones de cianobacterias: *Microcystis* spp. y *Dolichospermum* spp. (Bordet, et al., 2017).

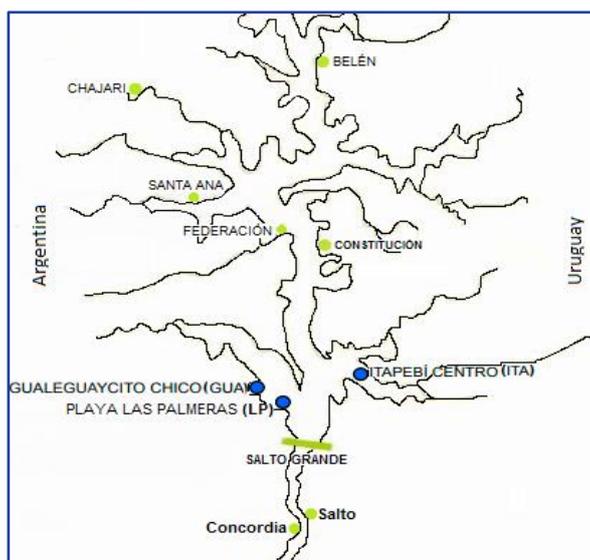


Figura 6. Embalse de Salto Grande. Los puntos azules indican los sitios de muestreo Guleguaycito y Las Palmeras en Argentina e Itaapé en Uruguay. Los puntos verdes muestran las principales ciudades de la cuenca y se muestra la localización de la represa de Salto Grande.

Hipótesis

Hipótesis 1: De acuerdo a los antecedentes del sistema de estudio, las características tróficas del embalse de Salto Grande favorecen el desarrollo de floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas. La selección de la especie dominante en cada floración dependerá de las características físicoquímicas del embalse y de las preferencias ambientales de cada especie.

Hipótesis 2: La estrategia que presentan las poblaciones o genotipos tóxicos del género *Microcystis* para prosperar en condiciones ambientales diversas involucra la existencia de una alta diversidad a escala intraespecífica.

Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el potencial tóxico de poblaciones de cianobacterias del embalse de Salto Grande, utilizando como *proxy* la presencia de genes involucrados en la biosíntesis de cianotoxinas y conocer la diversidad genética *Microcystis* spp.

Objetivos específicos

- 1) Poner a punto un método de obtención de ADN aplicable a muestras fijadas en lugol por intervalos de tiempo largos (más de un año), para detectar y cuantificar genes involucrados en la síntesis de microcistinas y saxitoxinas.
- 2) Identificar qué relaciones existen entre el ambiente y la abundancia de células tóxicas de cianobacterias productoras de microcistinas y saxitoxinas.
- 3) Conocer cómo el ambiente condiciona la diversidad de poblaciones tóxicas de *Microcystis* spp.

Metodología

Estrategia de la investigación

Para cumplir con el objetivo de la propuesta se evaluaron 19 muestras de agua pertenecientes al embalse de Salto Grande tomadas de tres estaciones de muestreo: Gualeguaycito, Las Palmeras e Itapebí (Figura 6), durante los meses de febrero, marzo, abril, junio, julio, agosto y septiembre en 2013 por la Comisión Técnico Mixta de Salto Grande (CTM). Además, para cada muestra de agua se cuenta con datos ambientales aportados por la CTM: conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$), pH, oxígeno disuelto (mg L^{-1}), temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$), concentración de fósforo total (PT($\mu\text{g L}^{-1}$)), nitrógeno total (NT(mg L^{-1})), clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$), concentración de microcistina-LR ($\mu\text{g L}^{-1}$) y abundancia de *Dolichospermum* spp. y *Microcystis* spp. (células mL^{-1}). Se realizó la extracción de ADN de las muestras fijadas en lugol. Posteriormente, se cuantificó la abundancia de células tóxicas determinando el número de copias de genes pertenecientes a los *clusters* MCY (*mcyE*) y SXT (*sxtU*), mediante qPCR a tiempo real. Por tanto, el número de copias de cada gen se usó como *proxy* de la abundancia de células tóxicas. La diversidad de cianobacterias pertenecientes al género *Microcystis* fue evaluada mediante la técnica de HRMA del gen *mcyJ*. Finalmente, fueron estudiadas las correlaciones entre las variables ambientales y biológicas, y también estas fueron evaluadas con el número de copias del gen *mcyE*. Asimismo, se estudiaron las correlaciones entre los *clusters* encontrados en el estudio de diversidad de *Microcystis* spp. y las variables ambientales y biológicas.

Muestras

Las muestras fueron tomadas a diferentes profundidades: sub-superficial (0,2 m), límite inferior de la capa eufótica (2,5 a 3,0 m), y a un metro de fondo, con una botella muestreadora tipo van Dorn (1 L). Las muestras obtenidas fueron alicuotadas en frascos plásticos de 20 mL y fijadas con lugol para su posterior análisis (conteo y análisis molecular). Las muestras para el análisis de nutrientes y clorofila-a fueron conservadas hasta su posterior análisis en el laboratorio. Las variables fisicoquímicas fueron medidas *in situ* mediante una sonda multiparamétrica Hydrolab DS5: temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxígeno disuelto (mg L^{-1}), conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$). Como los muestreos fueron mayormente durante el verano (febrero, marzo) y el invierno (junio, julio, agosto), las muestras se agruparon en verano e invierno, respectivamente. Las muestras correspondientes a abril se incluyeron en el grupo de verano, y la única muestra obtenida en el mes de septiembre se incluyó con las de invierno.

Tabla 1. Meses en los cuales se tomaron las muestras (durante el año 2013) y profundidad de los sitios evaluados en este estudio.

Sitio	Meses	Profundidad (m)
Guauguaycito	febrero, marzo, abril, junio, julio, agosto	7 a 9 m
Itapebí	abril, junio, julio, agosto	10 a 12 m
Las Palmeras	julio, agosto, septiembre	1,3 a 1,5 m

-Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó un método puesto a punto en nuestro laboratorio para muestras de agua (Martínez de la Escalera et al. 2014) con modificaciones. Se filtraron 20 mL de cada muestra empleando filtros estériles de membrana de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Millipore). Los filtros fueron colocados en tubos de lisis con 800 μL de buffer de extracción (composición del buffer de extracción: 100 mM Tris-HCl pH= 8,0, 100 mM EDTA pH=8,0, 100 mM Na-Fosfato pH=8,0, 1,5M NaCl, 1% CTAB -bromuro de hexadeciltrimetilamonio-) y una matriz de lisis de esferas de cerámica (diámetro 1,4 mm). Se homogeneizó en el equipo FastPrep (MpBiomedicals), durante 40 segundos a 6.0 m s^{-1} y luego se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 g. Se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf de 2 mL estériles, registrando su volumen. Luego fue agregado el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y centrifugado a 13.000 g durante 10 min. La fase acuosa fue recolectada y transferida a tubos eppendorf estériles registrando su volumen (este paso se realizó 2 veces). Se precipitó el ADN con 0.6 volúmenes de isopropanol y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 hora para luego centrifugar a 25.000 g por 1 hs a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 200 μL de Etanol 70% frío (-20 °C) y se centrifugó a 20.000 g por 15 min a temperatura ambiente. El pellet se dejó secar por 15 min y luego se resuspendió en agua milliQ toda la noche a 4 °C. Por último, se incubó el ADN a 37 °C por 30 min y fue confirmada su calidad por espectrofotometría para micro-volúmenes (nanodrop). El ADN se almacenó a -20 °C hasta su empleo en el qPCR.

- PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Se cuantificó la abundancia del gen *mcyE* (involucrado en la síntesis de la microcistina) y la abundancia del gen *sxtU* (involucrado en la síntesis de saxitoxina) mediante qPCR utilizando *primers* específicos (Tabla 1). En cada reacción se utilizó 10 nmol de cada primer, 2 µl del ADN muestra (aprox. 5 ng) y 7,76 µL del kit Power SYBR Green PCR (Invitrogen), BSA 0,5 µL (30 mg mL⁻¹), con un volumen final de reacción de 20 µL y se utilizó un termociclador CFX6 Real Time System (BIORAD). El ciclo de PCR para la amplificación del gen *mcyE* constó de 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C (Martínez de la Escalera, et al., 2017). El ciclo de PCR para el gen *sxtU* constó de 2 minutos a 50 °C, 15 min a 95 °C y 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C y 30 s a 72 °C. Para ambos ciclos se realizó un último paso de *melting* de 65 °C a 95 °C con incrementos de 1 °C para confirmar la especificidad del fragmento amplificado (Kruk et al., 2015). Para cuantificar de manera absoluta el número de copias de ambos genes *mcyE* y *sxtU* de las muestras se empleó un mismo clon de cada uno de los genes y se realizaron diluciones seriadas de 1E-4 a 1E-10 para generar curvas de calibración.

- HRMA (*High Resolution Melting Analysis*)

Para el análisis HRMA primeramente se obtuvieron amplicones del gen *mcyJ* (Tabla 1), también perteneciente al *cluster mcy* y luego se analizaron mediante la técnica de HRMA (Martínez de la Escalera, et al., en revisión). Para ello, se empleó el kit MeltDoctor HRM (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20 µL. Cada reacción contenía: 9.5 µL de agua, 0,5 µL de BSA (30 mg mL⁻¹), 7,76 µL de mix MeltDoctor HRM, 0,12 µL de cada *primers* (10 nmol) y 2 µL del ADN muestra (aprox. 5 ng). Se utilizó el termociclador CFX96 Real Time System (BIORAD) y el software Bio-Rad PrecisionMeltAnalysis.

Tabla 2. *Primers* utilizados para la detección y cuantificación.

Gen	Secuencia (5' -> 3')	Temp. Melting (°C)	Referencias
<i>mcyE</i> FW	AAGCAAAGCTGCTCCCGTATC	54,8	Sipari et al.2010
<i>mcyE</i> REV	CAATGGGAGCATAACGAGTCAA	55,1	Sipari et al.2010
<i>sxtU</i> FW	TGCAGTGGGAGCAGCTTTAG	57,6	Vico et al. 2016

<i>sxtU</i> REV	GATCGCCTGCTGTTGAAGTG	56,5	Vico et al. 2016
<i>mcyJ</i> FW	TAGCTAAAGCAGGGTTATCG	49,1	Kim et al. 2010
<i>mcyJ</i> REV	TCTTACTATTAACCCGCAGC	48,9	Kim et al. 2010

Análisis de datos

Mediante el test de Shapiro-Wilk (test de normalidad) se comprobó que los datos no eran normales, al no cumplirse este requisito se aplicaron test no paramétricos. Para detectar las relaciones entre las variables ambientales y biológicas se realizaron análisis de correlación de Spearman. El estudio de las diferencias significativas entre verano e invierno y entre los sitios de estudio en relación a los parámetros ambientales y biológicos fueron evaluados mediante el test de Kruskal-Wallis (KW). Por otro lado, fueron evaluados todos los factores ambientales (temperatura, conductividad, pH, fosforo total, nitrógeno total), para evaluar los más influyentes en cada sitio mediante el método de agrupamiento jerárquico *CUBT* (*Clustering Unsupervised Binary Tree*) (Fraiman, 2013). Este análisis consta de tres pasos. El primer paso, reduce la heterogeneidad de los datos dentro de nuevas submuestras. Durante el segundo paso se agregan nodos adyacentes. Finalmente, en el último paso se unen los grupos similares (Fraiman, 2013). Por último, los perfiles de *melting* obtenidos por HRMA se analizaron mediante métodos de agrupamiento jerárquico aglomerativo: *UPGMA* (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*), utilizando la distancia euclidiana. Los análisis estadísticos se realizaron empleando la plataforma libre R versión 3.4.1.

Resultados

Caracterización ambiental

Durante los muestreos de verano la máxima temperatura registrada en el agua fue 25,9 °C y la mínima 21,1 °C, mientras que en invierno la máxima fue 17,6 °C y la mínima 13,0 °C (Figura 7 a). En Gualeguaycito la temperatura varió entre 13,0 y 25,9 °C, Itapebí entre 14,9 y 17,6 °C y en Las Palmeras entre 14,9 y 17,6 °C (Figura 7 b).

En relación a la conductividad del agua, ésta fue similar en ambas estaciones de muestreo, con un rango entre 48,3 y 60,5 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en invierno y entre 57,4 y 60,5 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en verano (Figura 7 c). En Gualeguaycito, la conductividad varió entre 48,3 y 57,4 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en Itapebí entre 49,4 y 60,5 $\mu\text{S cm}^{-1}$ y en Las Palmeras entre 55,3 y 60,0 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Figura 7 d). El pH en ambas estaciones varió entre pH cercanos a la neutralidad (7,49) a pH básicos (9,42), en Gualeguaycito varió entre 7,49 y 9,42, Itapebí entre 7,45 y 8,34 y en Las Palmeras entre 7,7 y 7,94 (Figura 7e, f).

Respecto a las concentraciones de nutrientes (fósforo y nitrógeno total), no se observaron diferencias significativas entre verano e invierno y tampoco entre los sitios de muestreo, pero se observa una tendencia de que aumente la concentración de fósforo total durante el verano ($0,08 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$) respecto al invierno ($0,04 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$) y la de nitrógeno total en invierno ($0,83 \pm 0,26 \text{ mg L}^{-1}$) respecto a la presente en verano ($0,72 \pm 0,18 \text{ mg L}^{-1}$, con un valor atípico de 1.9 mg L^{-1}) (Figura 7 g, i).

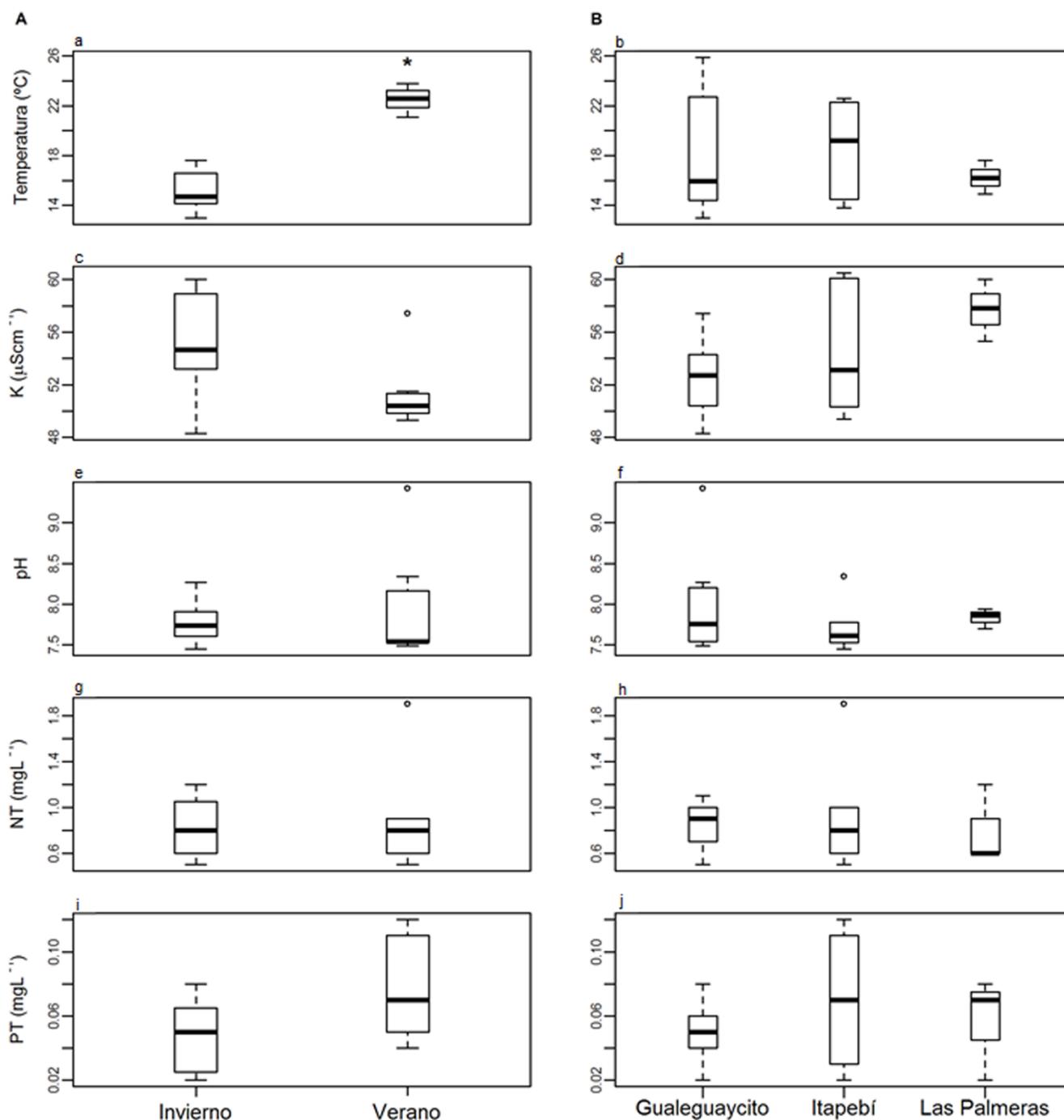


Figura 7. Variabilidad temporal (A) y espacial (B) de las variables ambientales medidas en los sitios de muestreo: Gualeguaycito, Itapebí y Las Palmeras. Temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$), pH, Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$), Nitrógeno total (mg L^{-1}), Fósforo total (mg L^{-1}). * Diferencias significativas, test de Kruskal-Wallis $p\text{-valor} < 0,05$.

El análisis de *cluster* CUBT separó los sitios según la temperatura (valor umbral de $19,35^{\circ}\text{C}$) y la conductividad del agua (valor umbral de $56,55 \mu\text{S cm}^{-1}$) (Figura 8). Como se observa en la figura, los sitios Gualeguaycito e Itapebí ($n = 6$) se agruparon en un mismo *cluster* e incluyeron muestras de agua obtenidas en el periodo estival (temperaturas mayores a $19,35^{\circ}\text{C}$). Por otro lado, cuando las temperaturas fueron menores a $19,35^{\circ}\text{C}$, los sitios se agruparon en dos *clusters* dependiendo

de la conductividad del agua. Por un lado, los sitios de Itapebí y Las Palmeras (n=4) y, por otro lado, se agruparon los sitios de Gualeguaycito, Itapebí y Las Palmeras (n=7), ambos *clusters* presentaron muestras obtenidas durante periodos fríos.

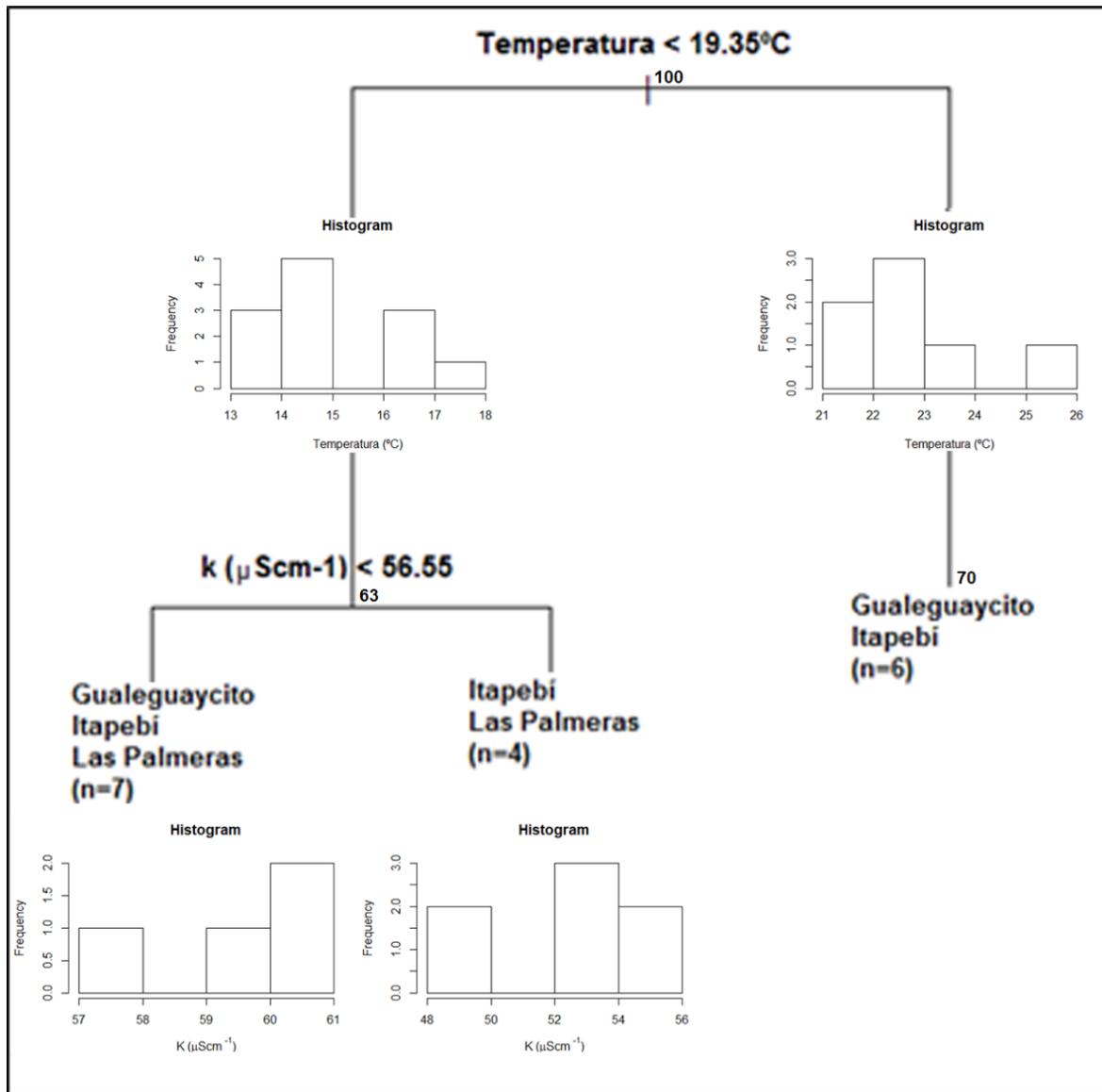


Figura 8. Análisis de *cluster* CUBT para las variables ambientales, los sitios se separaron según la temperatura y la conductividad del agua.

Caracterización biológica

La concentración de clorofila-*a* fue significativamente mayor en verano en Gualeguaycito e Itapebí (KW, $p < 0,05$) (Figura 9 a). En Gualeguaycito la concentración de clorofila-*a* varió entre 10,4 y 141,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, en Itapebí varió entre 4,2 y 138,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ y en Las Palmeras entre 5,4 y 27,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 9 b). Al evaluar la presencia y concentración de microcistina-LR, esta se detectó únicamente en verano (Gualeguaycito e Itapebí) (Figura 9 c). En Gualeguaycito, la concentración de dicha toxina varió entre 5,5 y 96 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que en Itapebí se encontró entre indetectable y 5,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 9 d). En general, se encontró una abundancia de células de *Microcystis* spp. y

Dolichospermum spp. significativamente mayor en las muestras correspondientes al verano en comparación al invierno (KW, $p < 0,05$) (Figura 9 e, g). En Gualeguaycito, la abundancia de *Microcystis* spp. varió entre 328 y 87.700 células mL^{-1} y la abundancia de *Dolichospermum* spp. varió entre 95 y 9.100 células mL^{-1} . Por otro lado, Itapebí presentó una abundancia de *Microcystis* spp., que varió entre 585 y 267.000 células mL^{-1} y *Dolichospermum* varió entre 130 y 2.000 células mL^{-1} , mientras que Las Palmeras presentó menor abundancia de *Microcystis* spp. (0-6.975 células mL^{-1}) y *Dolichospermum* spp. (130 y 2.000 células mL^{-1}) (Figura 9 f, h).

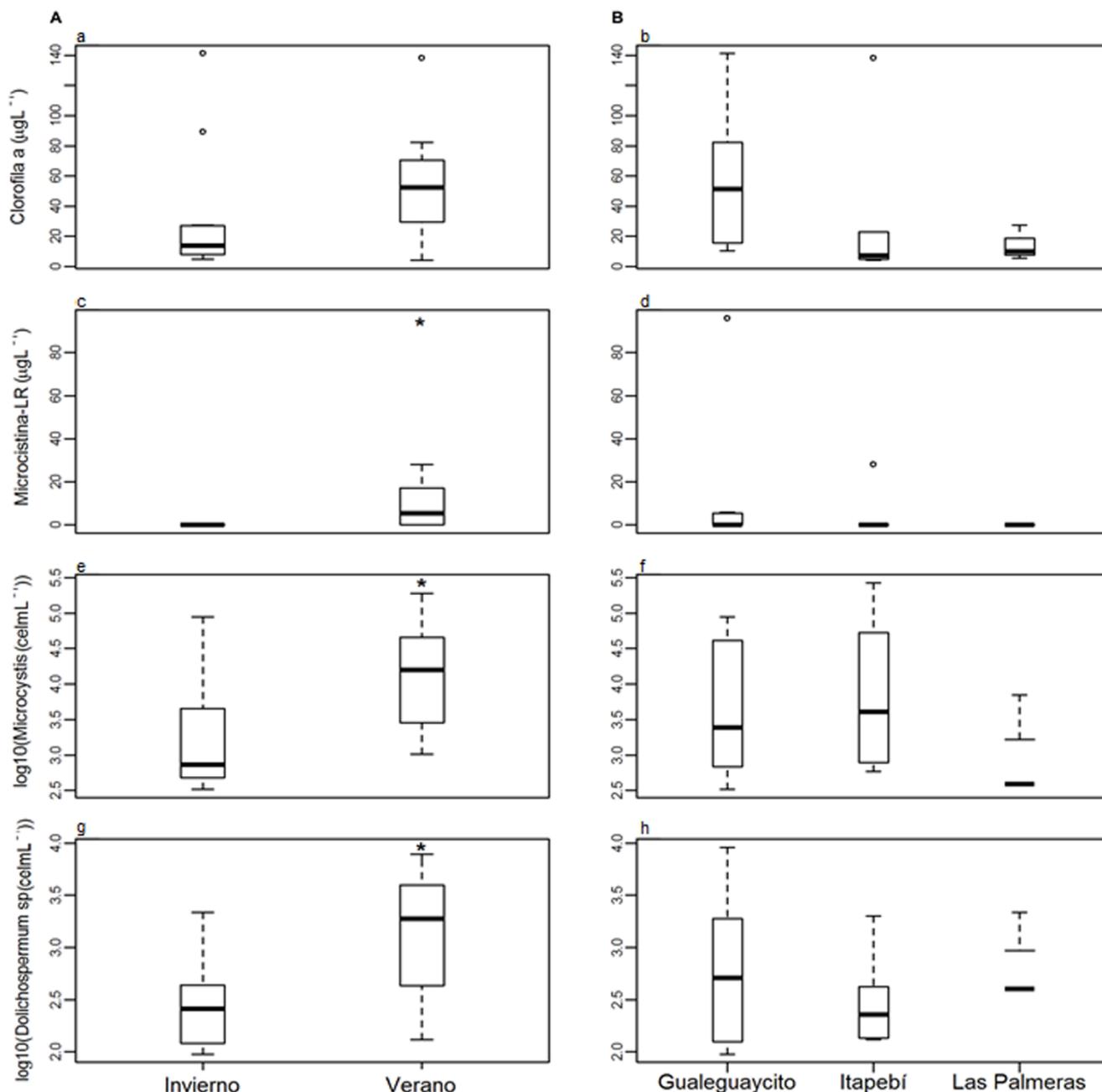


Figura 9. Variabilidad temporal (A) y espacial (B) de las variables biológicas: Gualeguaycito, Itapebí y Las Palmeras. Clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$), Microcistina-LR ($\mu\text{g L}^{-1}$), *Microcystis* spp (células mL^{-1}), *Dolichospermum* (células mL^{-1}). * Diferencias significativas, test de Kruskal-Wallis p -valor < 0,05.

Obtención de ADN

Las concentraciones de ADN obtenidas variaron entre 0,9 y 23,6 ng μl^{-1} . Sin embargo, la calidad del ADN para la mayoría de las muestras fue de pureza óptima (260/280 nm de 1,6 a 1,8), presentando contaminación con compuestos aromáticos (260/280 nm < 1,6) y húmicos (260/280 nm > 2,1) en solo algunas de ellas (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de ADN (ng μl^{-1}), relación 260/230 nm y 260/280 nm.

Muestras (mes de muestreo)	Concentración de ADN (ng μl^{-1})	260/230 nm	260/280 nm
Las Palmeras (julio)	1,2	0,63	1,91
Guaquaycito (julio)	1,3	0,05	1,02
Guaquaycito (febrero)	1,6	0,92	2,88
Guaquaycito (marzo)	0,9	0,03	2,83
Itapebí (julio)	1,1	0,02	1,09
Itapebí (abril)	1,1	0,18	3,00
Itapebí (abril)	1,3	0,11	1,60
Guaquaycito (junio)	5,3	1,09	1,49
Guaquaycito (agosto)	1,0	0,99	1,61
Itapebí (abril)	1,7	0,03	0,34
Guaquaycito (agosto)	23,6	0,10	2,06
Las Palmeras (agosto)	5,3	0,03	2,30
Guaquaycito (julio)	17,8	0,12	1,40
Itapebí (agosto)	12,7	0,37	2,02
Guaquaycito (julio)	1,8	0,10	2,09

Guauguaycito (agosto)	1,9	0,10	1,98
Guauguaycito (marzo)	5,9	0,07	1,85
Las Palmeras (septiembre)	2,8	0,04	1,99
Itapebí (junio)	3,2	0,02	2,30

Abundancia de cianobacterias tóxicas y su relación con las características ambientales

Se cuantificó la abundancia de genes involucrados en la síntesis de toxinas (microcistinas y saxitoxinas) como indicador de la abundancia de células tóxicas de *Microcystis* spp. (gen *mcyE*) y *Dolichospermum* spp. (gen *sxtU*), respectivamente (Figura 10). El valor más alto del número de copias del gen *mcyE* se detectó en verano (5.228,3 copias mL⁻¹). Sin embargo, durante el invierno también se detectaron altos valores del gen *mcyE* (2.490,9 copias mL⁻¹).

Cuando se evaluó la influencia de las variables ambientales y biológicas sobre la abundancia de células potencialmente tóxicas de cada especie analizada, se encontró que la abundancia del gen *mcyE* se correlacionó positivamente con la temperatura del agua (Spearman, rho = 0,67, p <0,05) y con la concentración de microcistina-LR (Spearman, rho = 0,45, p < 0,05). Asimismo, la concentración de microcistina-LR se correlacionó positivamente con la concentración de clorofila-a (Spearman, rho= 0,54, p<0,05), con la abundancia de células de *Microcystis* spp (Spearman, rho= 0,45, p< 0,05) y con la abundancia de *Dolichospermum* spp (Spearman, rho= 0,52, p< 0,05).

La presencia del gen *sxtU* se detectó únicamente en Itapebí, tanto en verano (742 copias mL⁻¹) como en invierno (46 copias mL⁻¹).

Por tanto, *Microcystis* fue el género más abundante y frecuente durante el periodo evaluado y las condiciones ambientales que favorecieron su desarrollo masivo y toxicidad fueron aquellas con altas temperaturas del agua (verano). Por otro lado, *Dolichospermum* spp. fue poco frecuente y su abundancia estuvo relacionada a la de *Microcystis*.

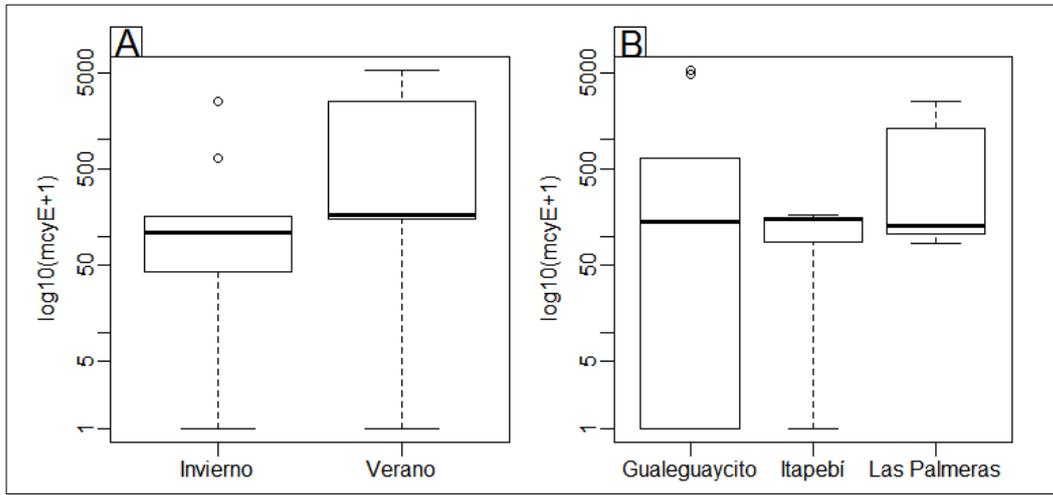


Figura 10. Variación de la abundancia del gen *mcyE* (copias mL⁻¹) en (A) invierno/ verano (B) en Gualaguaycito, Itapebí y Las Palmeras.

Diversidad de genotipos *mcyJ*

El análisis de *cluster* realizado a partir de los perfiles de *melting* de HRMA del gen *mcyJ* obtenidos para cada muestra reveló la existencia de dos grupos de genotipos tóxicos, que denominamos *cluster 1* y *cluster 2* (Figura 11).

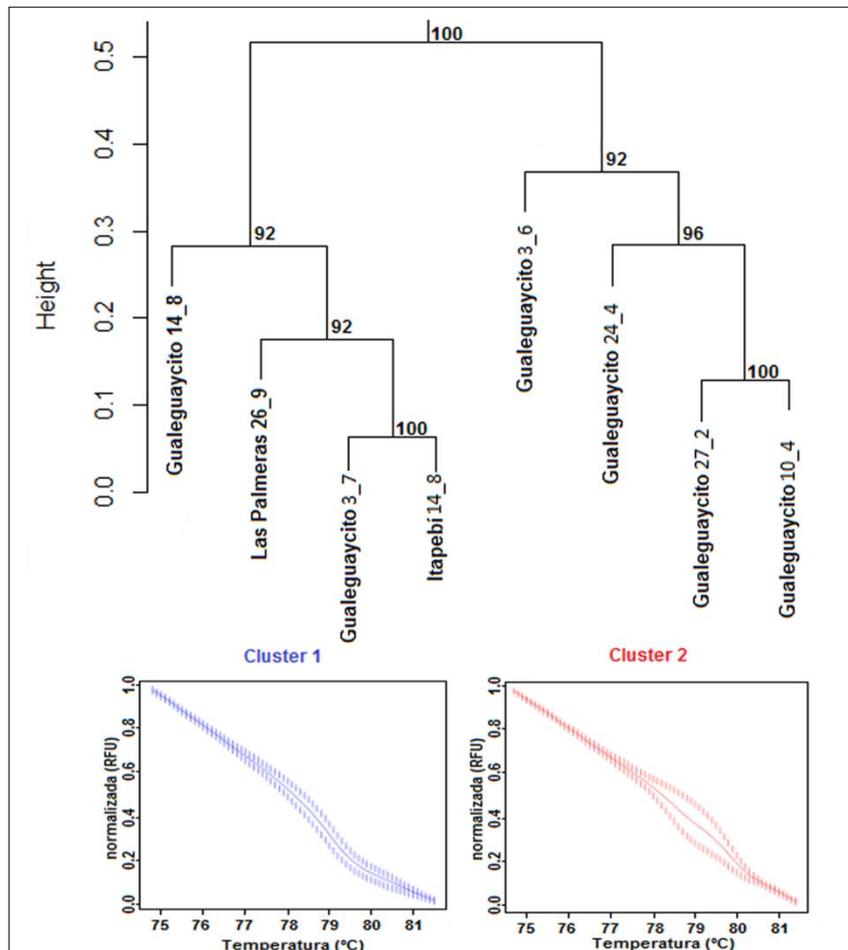


Figura 11. Dendrograma de los perfiles de *melting* agrupados utilizando la distancia euclidiana y método UPGMA.

Promedios (línea continua) y desvió estándar (líneas punteadas) de los perfiles de *melting* característicos del *cluster1* y *cluster2*.

Cuando se evaluó en qué condiciones ambientales aparecía cada *cluster* de genotipos se observó que las muestras pertenecientes al *cluster 1* aparecían a temperaturas entre 13,8 y 17,6 °C, mientras que el *cluster 2* incluía muestras obtenidas en condiciones de temperatura entre 17,0 y 25,9 °C (KW, $p < 0,05$) (Figura 12A). Asimismo, se observaron diferencias en la conductividad del agua entre ambos *clusters* aunque no fueron significativas (KW, $p < 0,1$). El *cluster 1* estaba integrado por muestras cuya conductividad se encontraba en el rango entre 48 y 57 $\mu\text{S cm}^{-1}$,

mientras que las muestras que componían el *cluster* 2 presentaron conductividades entre 52 y 60 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Figura 12B).

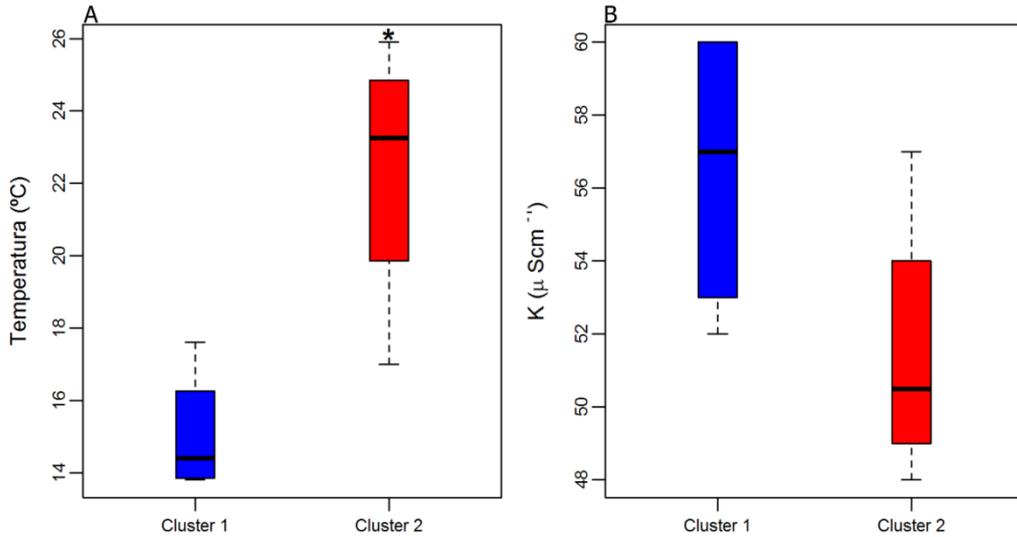


Figura 12. Cluster 1 y Cluster 2. Temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$) y Conductividad del agua ($\mu\text{S cm}^{-1}$).

* Diferencias significativas, test de Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} < 0,05$)

Asimismo, se observaron diferencias significativas en el número de células de *Microcystis* spp. entre ambos *clusters* (Figura 13A). El 1 ($0 - 2.875$ células mL^{-1}) presentó una abundancia de *Microcystis* spp. significativamente menor que el 2, que presentó una variación entre 2.100 y 87.700 células mL^{-1} . La toxicidad de las muestras (concentración de microcistina-LR) también presentó diferencias significativas entre *clusters* (KW, $p < 0,05$) (Figura 13B); el *cluster* 2 fue el único que presentó muestras tóxicas, con concentraciones de microcistina-LR de 5,5 a 96 $\mu\text{g L}^{-1}$.

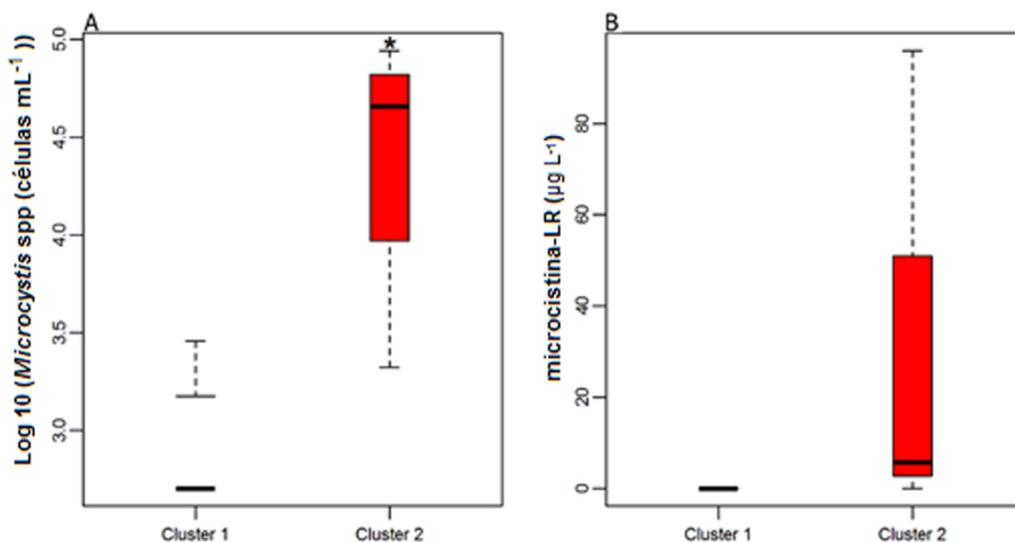


Figura 13. Cluster 1 y Cluster 2. Abundancia de *Microcystis* spp. (células mL^{-1}) y microcistina-LR ($\mu\text{g L}^{-1}$).

* Diferencias significativas, test de Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} < 0,05$).

Discusión

En este trabajo se evaluó el potencial tóxico de dos géneros de cianobacterias presentes en el embalse de Salto Grande, *Microcystis* y *Dolichospermum*, mediante qPCR a partir de muestras preservadas en lugol. Se encontró que el género tóxico más frecuente y abundante fue *Microcystis*, especialmente durante el verano, mientras que *Dolichospermum* se presentó en todos los sitios en menor abundancia que *Microcystis* y su toxina fue detectada en un único sitio en dos ocasiones (verano e invierno). Asimismo, la extracción de ADN de muestras preservadas abre un campo de estudios retrospectivos de la presencia de genes de toxinas a partir de colecciones de muestras de fitoplancton guardadas durante varios años.

La eutrofización es generalmente el factor que se considera responsable principal de las floraciones de cianobacterias (Reynolds, 2006; Schindler, et al., 2008), aunque hay evidencia que sugiere que el calentamiento global puede también promover dichos eventos (Paerl y Huisman, 2008; Kosten, et al., 2011). El embalse de Salto Grande, como se mencionó anteriormente, se clasifica como un ambiente eutrófico, en el cual se registran floraciones de cianobacterias en los brazos laterales de *Microcystis* spp. y *Dolichospermum* spp. principalmente cuando las condiciones ambientales favorecen la estabilidad y estratificación de la columna del agua, es decir, cuando la intensidad del viento es menor y aumenta la temperatura del agua (periodo estival) (Bordet et al., 2017). En este sentido, Rantala et al., (2006) estudiaron la frecuencia y composición de cianobacterias potencialmente productoras de microcistinas en 70 lagos finlandeses con diferente estado trófico. Estos autores detectaron cianobacterias de los géneros *Microcystis*, *Dolichospermum* y *Planktothrix*, y observaron que en los lagos oligotróficos solo se encontraba uno de los tres géneros potencialmente productores de microcistinas. Sin embargo, encontraron que a medida que aumentaba el estado trófico las especies coexistían en el mismo ambiente. Por otro lado, también encontraron correlaciones positivas entre el gen *mcyE* y la biomasa de fitoplancton, pH del agua, clorofila-a, concentración de microcistinas y también con los nutrientes totales (nitrógeno y fósforo). Lo que sugiere que la eutrofización lleva a la coexistencia de varias especies de cianobacterias potencialmente tóxicas (Rantala et al., 2006), probablemente debido a que ofrece las condiciones adecuadas para la existencia de múltiples especies de cianobacterias productoras de toxinas. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró relación entre la abundancia y toxicidad de las cianobacterias con los nutrientes, ya que éstos presentaron valores similares en todas las estaciones del año. A pesar de que Rangel et al. (2012), reconocieron que en varios embalses tropicales la biomasa de fitoplancton está controlada principalmente por fósforo y modulada por la hidrología, nuestros resultados coinciden con los de Forbes et al. (2008) donde

plantean que los controles de nutrientes en la producción de fitoplancton son débiles y están subordinados a factores físicos. En este sentido, los estrategias ecológicas capaces de explotar la capa superior (epilimnión) para la obtención de luz y la capa profunda (hipolimnion) para obtener nutrientes, tendrán mayor éxito sobre otros organismos del fitoplancton (Merino-Ibarra et al., 2008). Por otro lado, nuestros resultados reflejan una coexistencia entre especies del género *Microcystis* y *Dolichospermum*, con una dominancia de las cianobacterias del género *Microcystis*.

La dominancia de *Microcystis*, puede ser explicada por las características de los sitios de estudio y por los factores ambientales que favorecen la estabilidad y la estratificación de la columna de agua (Bordet, 2017). En este sentido, Cao et al (2006) observaron que cuando las intensidades de viento eran bajas, *Microcystis* prospera asociada a las altas temperaturas y buena abundancia de luz. La abundancia de *Microcystis* mostró una clara heterogeneidad vertical, predicha significativamente en términos de variaciones de temperatura y sólidos en suspensión inorgánicos, reflejando una ventaja competitiva con respecto a *Dolichospermum*, para ganar el acceso a condiciones de luz óptimas en la columna de agua estratificada (Cao et al., 2006; Bordet 2017).

Por otro lado, Chia et al (2018) estudiaron las interacciones alelopáticas de seis cepas de *Microcystis* spp. y *Dolichospermum* spp. mediante experimentos de co-cultivo bajo dos condiciones diferentes de nutrientes: a concentraciones bajas de nitrógeno (7,8 μM) y fósforo (0,05 μM); a concentraciones altas de nitrógeno (17,65 mM) y fósforo (0,23 mM). Observaron que a altas concentraciones de ambos nutrientes *Microcystis* disminuía significativamente el crecimiento de *Dolichospermum* en experimentos de co-cultivo. Asimismo, evaluaron el efecto del filtrado de cultivo de cepas de *Microcystis* spp. sobre *Dolichospermum* spp. y encontraron que en condiciones ricas en nutrientes dicho filtrado también disminuía significativamente el crecimiento de *Dolichospermum* spp. Además, las interacciones entre las cianobacterias, en combinación con las condiciones cambiantes de nutrientes alteraron las concentraciones de toxinas, como la microcistinas y la anatoxina-a, las actividades enzimáticas antioxidantes y la fijación de N_2 por *Dolichospermum* (Chia et al., 2018). De acuerdo a los antecedentes y recordando que el embalse de Salto Grande se clasifica como un ambiente eutrófico, los resultados obtenidos en el presente estudio permitirían afirmar que la presencia y alta abundancia de *Microcystis* influye significativa y negativamente sobre el crecimiento de las especies de *Dolichospermum*.

A partir de los resultados obtenidos, como la presencia del gen *mcyE* en verano e invierno y el aumento significativo de células de *Microcystis* en verano, nos propusimos estudiar la diversidad genética de *Microcystis* spp. mediante HRMA del gen *mcyJ*. En base al análisis de los perfiles de *melting* de los amplicones obtenidos se pudo detectar la presencia de dos grupos de genotipos *mcyJ* (tóxicos) diferentes cada uno caracterizado por proliferar a distintas condiciones de

temperatura y conductividad del agua (Figura 11). Asimismo, la mayor abundancia de células de *Microcystis* spp. y las mayores concentraciones de microcistina-LR se detectaron durante el verano, a temperaturas del agua entre 21 y 23 °C.

Como se mencionó anteriormente, aún no se conoce cuál es la combinación de condiciones ambientales (temperatura, nutrientes, conductividad) que estimulan la producción de toxinas por parte de las poblaciones tóxicas (O'Neil, et al., 2012; Pearl y Huisman, 2009). En este sentido, Davis et al (2009) observaron que al aumentar la temperatura en condiciones controladas donde se simulaba un ambiente eutrófico, la tasa de crecimiento de células tóxicas de *Microcystis* (cuantificadas a través de la presencia del gen *mcyD*) aumentaba significativamente en relación a la de células no tóxicas. Incluso, en algunos casos las células no tóxicas mostraban una disminución de sus tasas de crecimiento, lo que lleva a concluir que el incremento de la temperatura por encima de los valores promedio de los ecosistemas (por ej. en un escenario de aumento de temperatura por calentamiento global) llevaría a un aumento selectivo de las poblaciones tóxicas de *Microcystis* (Davis, et al., 2009; Joung, et al., 2011). En relación a esto, estudios previos de nuestro grupo demostraron que la temperatura es una de las variables que determina la abundancia de poblaciones tóxicas de *Microcystis* en el río Uruguay (Kruk, et al., 2015; Martínez de la Escalera, et al., 2017). Más aún, O'Farrell, et al., (2012) propusieron que la intensidad y frecuencia de floraciones de cianobacterias en el embalse de Salto Grande podrían ser en gran medida explicadas por el ciclo hidrológico y por la morfología del embalse, encontrándose mayores acumulaciones de biomasa en los brazos donde desembocan cursos de agua tales como Gualaguaycito e Itapebí. Es en estos sitios que presentan baja profundidad, altos tiempos de residencia del agua y acumulación de nutrientes provenientes de la cuenca donde se generan floraciones masivas de *Microcystis* spp. tóxicas, probablemente asociadas a mayores temperaturas que las que alcanza el resto del embalse.

La temperatura influye sobre los procesos bioquímicos de las células (Brown, et al., 2004) y afecta por tanto virtualmente a todos los procesos biológicos, incluyendo el metabolismo de los organismos. Además, a nivel de los ecosistemas la temperatura favorece la estabilidad de la columna de agua, por lo que en su conjunto el incremento de la temperatura induce un aumento en las tasas de crecimiento de los organismos y promueve la formación de floraciones (Paerl y Huisman, 2009). En este contexto, el hallazgo de distintos genotipos *mcyJ* de *Microcystis* spp. con diferente potencial tóxico y asociados a diferentes temperaturas sugiere que dicha variable es relevante no sólo a la hora de condicionar la abundancia de poblaciones tóxicas, sino también para inducir la expresión de los genes involucrados en la síntesis de microcistinas y en la producción de las mismas. En estudios previos, Hu et al., (2016) encontraron que la variación genotípica de

una comunidad de *Microcystis* basada en el gen *mcyA* (analizada mediante geles en gradiente desnaturalizante, DGGE) se relacionaba con distintas variantes de microcistina, implicando que la composición de la comunidad determinaría el tipo de toxina producida. Empleando la misma técnica, Kim et al., (2010) encontraron que la diversidad del gen *mcyJ* era menor en verano que en primavera y otoño. En contraste, en el embalse de Salto Grande se observó que a altas temperaturas coexisten múltiples etapas del ciclo de vida de diversos grupos morfológicos del fitoplancton, mientras que a bajas temperaturas se encontró lo opuesto (Kruk, et al., 2017). Diversos estudios han reportado resultados contrastantes al evaluar la asociación entre variables tales como nutrientes totales, disueltos y temperatura y la diversidad de *Microcystis* spp. (Pobel, et al., 2012; Hu, et al., 2016), por lo que no hay evidencia clara acerca de cuáles son las variables ambientales que influyen sobre la diversidad genética de *Microcystis*. Asimismo, existen distintas propuestas acerca del rol de la temperatura en la producción de microcistinas por estos organismos. Por ejemplo, se ha reportado que a diferentes temperaturas *M. aeruginosa* sufre cambios significativos en el patrón de microcistinas que produce, mientras que el contenido total de toxina por célula no cambia (Amé y Wunderlin, 2005). Sin embargo, Kim et al., (2005) encontraron que la misma especie producía una mayor cantidad de transcritos de genes *mcy* a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento (25 °C), mientras que a 20 y 30 °C la transcripción era menor. Estos resultados están en línea con los obtenidos en el presente trabajo, ya que se encontró mayor concentración de microcistina-LR a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento de las especies del género *Microcystis* (21-23 °C). Más aún, la existencia de genotipos *mcyJ* a temperaturas menores a 18 °C relacionados con la ausencia de microcistinas sugiere un rol importante de esta variable en la toxicidad. Tanto los hallazgos reportados en la literatura como los del presente trabajo implican que a temperaturas que optimizan la tasa de crecimiento la producción de toxinas sería máxima, sugiriendo que la síntesis de microcistinas estaría relacionada al metabolismo celular primario. Esto contradice el paradigma actual que establece que las microcistinas son metabolitos secundarios, no relevantes para el metabolismo basal de las células. En este sentido, se ha propuesto un rol de infoquímico para las microcistinas (Schatz, et al., 2007), así como se las relacionó también a la protección de los fotosistemas, a la luz (Straub, et al., 2011) y al metabolismo energético (Makower, et al., 2014). Por ejemplo, se ha propuesto recientemente que las microcistinas protegerían a las células del estrés oxidativo a través de su unión a proteínas, tales como la RuBisCo (Zilliges, et al., 2011). Esto tendría como consecuencia que las poblaciones tóxicas serían más resistentes a altas intensidades de luz.

Otra posible interpretación a los resultados obtenidos acerca de la ausencia de microcistina-LR en los genotipos de baja temperatura podría ser que el bajo número de células encontrados

condicione el ensayo de detección de toxina por HPLC, a pesar de los límites de detección de la técnica que son muy bajos.

En relación a la conductividad y su efecto sobre *Microcystis* spp., al momento se ha reportado que el aumento de la misma no tendría impacto diferencial en poblaciones tóxicas y no tóxicas (Tonk, et al., 2007; Tanabe, et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en concentraciones de sales más altas que las encontradas normalmente en sistemas de agua dulce, evaluándose por lo general salinidades estuarinas a marinas. Cabe mencionar que en el presente trabajo los cambios en la conductividad asociados a la aparición de uno u otro genotipo tóxico, si bien fueron significativos, estuvieron siempre en el rango de lo esperado para un sistema como el embalse. Asimismo, dado que se evaluaron genotipos tóxicos únicamente, el efecto de la conductividad se observó a nivel de la producción de la microcistinas y no en la selección de poblaciones no tóxicas. Una hipótesis para explicar nuestros hallazgos es que el aumento de conductividad sea consecuencia de algún otro proceso hidrológico (por ej. resuspensión debida al viento, F. Bordet comunicación personal) cuya consecuencia tenga efectos sobre el metabolismo celular, incluyendo la producción de toxinas. Sería necesario realizar estudios específicos para detectar qué otra variable se asocia a los cambios de conductividad en el sistema de estudio.

Conclusiones

A partir de muestras preservadas en lugol durante más de un año, fue posible extraer ADN de buena calidad, estudiar el potencial tóxico y la diversidad de cianobacterias del embalse de Salto Grande, abriendo un campo de estudios retrospectivos de genes de toxinas a partir de colecciones de muestras de fitoplancton guardadas durante varios años.

En este estudio se encontró que las cianobacterias pertenecientes al género *Microcystis* tóxicas, son las más abundantes y frecuentes en el embalse de Salto Grande, las cuales se ven favorecidas cuando las condiciones de temperatura del agua son altas. Por otro lado, las floraciones de cianobacterias del género *Dolichospermum* son menos frecuentes probablemente porque las condiciones del embalse no las favorecen.

Por último, se encontró que las poblaciones tóxicas de *Microcystis* que florecen en verano son genéticamente diferentes a las que se mantienen durante el invierno y que la temperatura y la conductividad del agua son variables relevantes que controlarían su abundancia y toxicidad

Agradecimientos

A mis tutoras Claudia Piccini y Gabriela Martínez de la Escalera por los conocimientos compartidos y por guiarme durante las etapas finales de mi formación y por todo el tiempo invertido y sobre todo por la paciencia durante esta trayectoria.

A la Comisión técnico Mixta de Salto Grande, sobre todo a Facundo Bordet por el apoyo y la información brindada.

A los acuáticos: Paula Vico, Nacho Alcántara, Susana Deus, Florencia Bertoglio, Álvaro Gonzalez, Eliana Nervi y al resto de compañeros del departamento de Microbiología del IIBCE: Pablo Zunino, Ana Umpiérrez, Andrea Cardozo, Belén Branchiccela, Eliana Nervi, Guillermo Añon, Joaquín Frutos, Karina Antúnez, Loreley Castelli, Lucía Trujillo, Magalí Fernández, María José González, Paula Da Cunda, Sofía Fernández, Daniela Arredondo, Fernanda Ramos, Joaquién Lozano, Natalia Viera.

A mi madre Grisselle, mi hermana Stephanie y mis abuelos por estar siempre presente y brindarme hasta lo imposible. Los quiero mucho!

A Florencia por aguantarme todo el tiempo con mis nervios pre-examen y pre-tesis. También agradecer a los padres Hugo y Angela y a Matías por la buena onda y las palabras de aliento.

A mis compañeros de Facultad: Hernan Juan, Romina Echagë por estar siempre, en las buenas y en las malas, me considero afortunado por haberlos conocido. Federico Ortiz, Bruno Pannunzio, Alejandra Borba, Mel Nuesch, Sebastian, Mauro Perez, Mauro Martinez, Juan Llopart (mi supp), Camila Ruiz, InesEtchelet, Aitor Azcarate, Antonio Bouza, Victoria Vidal.

A Lestat y Shuri, por estar siempre acompañándome y sancandome una sonrisa.

Bibliografía

- Alam, M., Ikawa, M., Sasner Jr., J.J., Sawyer, P.J.(1973). Purification of. *Aphanizomenonflos-aquae* toxin and its chemical and physiological properties. *Toxicon* 11, 65-72.
- Amé, M.V. y Wunderlin, D.A., 2005. Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystisaeruginosa* population. En: *Water, Air, and Soil Pollution*, 168, pp.235-248.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25, 704–726.
- Aubriot, L., Bonilla, S. y Falkner, G., 2011. Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuation. En: *FEMS MicrobiologyEcology*, pp.1-16.
- Beamud, G., Vico, P., Haakonsson, S., de la Escalera, G. M., Piccini, C., Brena, B. M., & Bonilla, S. (2016). Influence of UV-B radiation on the fitness and toxin expression of the cyanobacterium *Cylindrospermopsisiraciborskii*. *Hydrobiologia*, 763(1), 161-172.
- Bonilla, S. (1997). Composición y abundancia fitoplanctónica de tres embalses en cadena sobre el río Negro, Uruguay. *Iheringia, Ser. Bot.* 49: 47-61.
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B., Pérez, M., Piccini, C., Martínez de la Escalera, G., Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F. y Aubriot, L., 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. En: *INNOTEC*, 10, pp.9-22.
- Bordet, F., Fontanarrosa, M. y O'Farrell, I., 2017. Influence of light and mixing regime on bloom-forming phytoplankton in a subtropical reservoir. En: *River Research and Applications*, 33(8), pp.1315-1326. <https://doi.org/10.1002/rra.3189>.
- Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V. M. y West, G.B., 2004. Toward a metabolic
- Campbell, D.T., and B. Hille. (1976). Kinetic and pharmacological properties of the sodium channel of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 67:309–323.
- Carneiro, R. L., dos Santos, M. E. V., Pacheco, A. B. F., & Azevedo, S. M. F. D. O. E. (2009). Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsisiraciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton research*, 31(5), 481-488.
- Castro, D., Vera, D., Lagos, N., Garcí'a, C., & Vásquez, M. (2004). The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsisiraciborskii* C10. *Toxicon*, 44(5), 483-489.
- Catterall, W.A. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev PharmacolToxicol* 20, 15-43.

- Chalar, G., 2009. The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. En: *Limnologica*, 39(3), pp.200-208.
- Chalar, G., De León, L., de León, R., Fabián, D. y Gorga, J., 1993. Evaluación de la eutrofización del embalse de Salto Grande. Análisis de las relaciones entre los parámetros
- Chia, M. A., Jankowiak, J. G., Kramer, B. J., Goleski, J. A., Huang, I. S., Zimba, P. V., ... & Gobler, C. J. (2018). Succession and toxicity of *Microcystis* and *Anabaena* (*Dolichospermum*) blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. *Harmful algae*, 74, 67-77.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences Monitoring and Management. E and FN Spon, London, pp. 1–416.
- Cirés, S., Wo" rmer, L., Agha, R., Quesada, A., 2013. Overwintering populations of *AnabaenaAphanizomenon* and *Microcystis* as potential inocula for summer blooms. *J. Plankton Res.* 35, 1254–1266.
- Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J, 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. En: *HarmfulAlgae*, 8(5), pp.715–725.
- De León, L. y Yunes, J.S., 2001. First report of a Microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. En: *Environm. Toxicol.*, 16(1), pp.110-112.
- Dziallas, C., Grossart, H.-P., 2011. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. *PLoS ONE* 6 (9), e25569.
- Feola, G., Brena, B., Risso, J. y Sienra, D. y Echezarreta, M. E., 2008. *Programa de monitoreo de agua de playas y costa de Montevideo. Informe temporada estival: 2007-2008* [En línea]. Montevideo: IMM. [Consulta: 12 de junio de 2017]Disponibe en: http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/informe_monitoreo_agua_playas_costas_temporada_estival_2007-2008.pdf
- Forbes, M. G., Doyle, R. D., Scott, J. T., Stanley, J. K., Huang, H., & Brooks, B. W. (2008). Physical factors control phytoplankton production and nitrogen fixation in eight Texasreservoirs. *Ecosystems*, 11(7), 1181-1197.
- Flores, E. & Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 33, pp. 164-167.
- Fraiman R, Ghattas B, Svarc M. (2013) Interpretable clustering using unsupervised binary trees. *Adv Data Anal Classification*. pp1–21.

- Hamilton, D. P., Wood, S. A., Dietrich, D. R. & Puddick, J. (2013). Costs of harmful blooms of freshwater cyanobacteria. In *Cyanobacteria: An Economic Perspective* (eds N. K. Sharma, A. K. Rai and L. J. Stal), pp. 245–256. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Harke, M.J., Gobler, C.J., (2013). Global transcriptional responses of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to nitrogen stress, phosphorus stress, and growth on organic matter. *PLoS ONE* 8 (7), e69834.
- Harke, M. J., Steffen, M. M., Gobler, C. J., Otten, T. G., Wilhelm, S. W., Wood, S. A. & Paerl, H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae* 54, 4–20.
- Havens, K.E., 2007. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. En: Hudnell, K.H., ed. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research*. Vol. 619. New York: Springer: pp.675–732.
- Heiskanen, A.S., Leppänen, J.M., 1995. Estimation of export production in the coastal Baltic Sea: effect of resuspension and microbial decomposition on sedimentation measurements. *Hydrobiologia* 316, 211–224.
- Herada, 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.
- Hoek, C., Van den Hoek, H., Mann, D., & Jahns, H. M. (1995). *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge university press.
- Hofinger BJ, Jing HC, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2009) High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. *Theor Appl Genet* 119:851–865
- Hu, C., Rea, C., Yu, Z., Lee, J., 2016. Relative importance of *Microcystis* abundance and diversity in determining microcystin dynamics in Lake Erie coastal wetland and downstream beach water. En: *Journal of Applied Microbiology*, 120, pp.138–151. doi: 10.1111/jam.12983.
- Huber, V., Wagner, C., Gerten, D., Adrian, R., 2012. To bloom or not to bloom: contrasting responses of cyanobacteria to recent heat waves explained by critical thresholds of abiotic drivers. *Oecologia* 169, 245–256.
- Hjelmsø, M. H., Hansen, L. H., Bælum, J., Feld, L., Holben, W. E., & Jacobsen, C. S. (2014). High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. *Applied and environmental microbiology*, 80(12), 3568-3575.

- Joung, S.H., Oh, H.M., Ko, S.R., Ahn, C.Y., 2011. Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea. En: *Harmful Algae*, 10, pp.188-193.
- Kaebernick, M., Neilan, B.A., Börner, T., Dittmann, E., 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (8), 3387–3392.
- Karjalainen, M., Engström-Öst, J., Korpinen, S., Peltonen, H., Pääkkönen, J-P. y Rönkkönen, S. et al., 2007. Ecosystem consequences of cyanobacteria in the Northern Baltic Sea. En: *AMBIO*, (36), pp.195–202.
- Kellmann, R., Mihali, T. K., Jeon, Y. J., 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*, 74(13), 4044-4053.
- Kim, H.R., Kim, C.K., Ahn, T.S., Yoo, S.A. y Lee, D.H., 2005. Effects of temperature and light on microcystin synthetase gene transcription in *Microcystis aeruginosa*. En: *Key Engineering Materials*, 277-279, pp.606-611.
- Kim, S.G., Joung, S.H., Ahn, C.Y., Ko, S.R., Boo, S.M., Oh, H.M., 2010. Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir: population diversity of *Microcystis* spp. during algal bloom. En: *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74, pp.93–102.
- Komárek, J., 2010. Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. *Hydrobiologia* 639, 231–243.
- Komárek J., Anagnostidis, K., 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. *Arch. Hydrobiol./Algol. Stud.* 56, 247–345.
- Komárek & Kormáková, J., 2011. Alien cyanobacteria *Anabaenabergii* var. *limnetica* Coute´ et Preisig from Lithuania: some aspects of taxonomy, ecology and distribution. *Limnologia* 41, 325–333
- Kosten, S., Huszar, V.M.L., Becarés, E., Costa, L.S., van Donk, E., Hansson, L.A., Jeppesen, E., Kruk, C., Lacerot, G., Mazzeo, N., de Meester, L., Moss, B., Lürling, M., Nöges, T., Romo, S. y Scheffer, M., 2011. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. En: *Global Change Biology*, 18, pp.118–126.
- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martinez de la Escalera Siri, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., Alcántara, I., Vico, P. y Miguez, D., 2015. Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. En: *INNOTEC*, 10, pp.23-39.

Kulaev, I.S. & Vagabov, V.M. (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 24, pp.83-171.

Li, M., Peng, Q. & Xiao, M. (2015). Using interval maxima regression (IMR) to determine environmental optima controlling *Microcystis* spp. growth in Lake Taihu. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 774–784.

Li, M., Zhu, W., Dai, X. & Li, X. (2013). Effects of linear alkylbenzene sulfonate on extracellular polysaccharide content and cells per particle of *Microcystisaeruginosa* and *Scenedesmusobliquus*. *Fresenius Environmental Bulletin* 22, 1189–1194.

Long, B.M., Jones, G.J., Orr, P.T., 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystisaeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1), 278–283.

Mackintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P. & Codd, G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*, 264:187–192.

Makower, K., Schuurmans, J.M., Groth, D., Zilliges, Y., Matthijs, H.C.P., Dittmann, E., 2014. Transcriptomics aided dissection of the intracellular and the extracellular role of microcystin in *M. aeruginosa* PCC 7806. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), pp.544-554.

Manali, K. M., Arunraj, R., Kumar, T., & Ramya, M. (2017). Detection of microcystin producing cyanobacteria in Spirulina dietary supplements using multiplex HRM quantitative PCR. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1279-1286.

Martínez de la Escalera, G., Antoniadis, D., Bonilla, S., Piccini, C., 2014. Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic cyanobacteria in subtropical freshwater ecosystems. En: *Molecular Ecology*, 23, pp.5791–5802.

Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A.M., Badih, G., Piccini, C., en revisión. Environmentally-driven genetic differences within *Microcystis aeruginosa* complex determined by high resolution melting analysis and functional regression trees. En revisión.

Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I. y Piccini, C., 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. En: *HarmfulAlgae*, 62, pp.73-83.

Mazzeo, N., Clemente, J., García-Rodríguez, F., Gorga, J., Kruk, C., Larrea, D., Meerhoff, M., Quintans, F., Rodríguez-Gallego, L. y Scasso, F., 2002. Eutrofización: causas, consecuencias y manejo. En: Domínguez, A. y Prieto, R.G., eds.. *Perfil ambiental del Uruguay*. Montevideo: Nordan-Comunidad. pp.39-56.

Merino-Ibarra, M., Monroy-Ríos, E., Vilaclara, G., Castillo, F. S., Gallegos, M. E., & Ramírez-Zierold, J. (2008). Physical and chemical limnology of a wind-swept tropical highland reservoir. *Aquatic Ecology*, 42(3), 335-345.

- O'Farrell, I., Bordet, F., Chaparro, G., 2012. Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies. En: *Hydrobiologia*, 698, pp.175-190.
- Oh, H.-M., Lee, S.J., Jang, M.-H., Yoon, B.-D., 2000. Microcystin production by *Microcystisaeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (1), 176–179.
- O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A. y Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. En: *Harmful Algae*, 14, pp.313–334.
- Orr PT., Jones G. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystisaeruginosa* cultures, *Limnology and Oceanography*, 43, 1604-1614.
- Paerl, H. W. & Otten, T. G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology* 65, 995–1010.
- Paerl, H. y Huisman, J., 2008. Blooms like it hot. En: *Science*, 320, pp.57–58.
- Paerl, H.W. y Huisman, J., 2009. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. En: *Environ. Microbiol. Rep.*, 1, pp.27–37.
- Paerl, H.W., Hall, N.S., Calandrino, E.S., 2011a. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci. Tot. Environ.* 409, 739–1745.
- Pearson, L.A., Neilan, B.A., 2008. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr. Opin. Biotech* 19, 281–288.
- Phelan, R.R., Downing, T.G., 2011. A growth advantage for microcystin production by *Microcystis pcc7806* under high light. *J. Phycol.* 47 (6), 1241–1246.
- Pobel, D., Godon, J.J., Humbert, J.F., Robin, J., 2012. High-frequency monitoring of the genetic diversity and the potential toxicity of a *Microcystisaeruginosa* bloom in a French shallow lake. En: *FEMS Microbiology Ecology*, 79, pp.132–141. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01203.x
- Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, Giovannardi S, Onodera H, et al. (2000) The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology* 36: 553–562.
- Qin, B., Zhu, G., Gao, G., Zhang, Y., Li, W., Paerl, H. W. & Carmichael, W. W. (2010). A drinking water crisis in Lake Taihu, China: linkage to climatic variability and lake management. *Environmental Management* 45, 105–112.

- Quirós, R. y Cuch, 1982. Características limnológicas del embalse de Salto Grande II: Distribución y Dinámica de nutrientes. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. En: *Ecología Argentina*, 8, pp.111-142.
- Quirós, R. y Luchini, L., 1982. Características limnológicas del embalse de Salto Grande, III: Fitoplancton y su relación con parámetros ambientales. En: *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 13, pp.49-66.
- Rangel, L. M., Silva, L. H. S., Rosa, P., Roland, F., & Huszar, V. L. M. (2012). Phytoplankton is mainly controlled by hydrology and phosphorus concentrations in tropical hydroelectric reservoirs. *Hydrobiologia*, 693, 13–28
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., Sivonen, K., 2006. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6101–6110.
- Rastogi, R. P., Sinha, R. P. & Incharoensakdi, A. (2014). The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 13, 215–249.
- Reynolds, C.S., 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge, Cambridge University Press: 390pp.
- Reynolds, C.S., 2006. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S., 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.* 24, 417–428.
- Rinta-Kanto, J.M., Konopko, E.A., DeBruyn, J.M., Bourbonniere, R.A., Boyer, G.L. y Wilhelm, S.W., 2009. Lake Erie *Microcystis*: relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. En: *Harmful Algae*, 8, pp.665–673.
- Rinta-Kanto, J.M., Ouellette, A.J.A., Boyer, G.L., Twiss, M.R., Bridgeman, T.B., Wilhelm, S.W., 2005. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environ. Sci. Technol.* 39 (11), 4198–4205.
- Rodríguez-Gallego, L., 2010. *Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay: impacto y optimización de los usos del suelo*. Montevideo: Facultad de Ciencias, UDELAR. (Tesis de Doctorado).
- Salas, H. y Martino, P., 1991. A simplified phosphorous trophic state model for warm-water tropical state. En: *Water Research*, 25(3), pp.341-350.
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., Dittmann, E. y Kaplan, A., 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. En: *Environmental Microbiology*, 9, pp.965-970.

Schindler, D.W., Hecky, R.E., Findlay, D. L., Stainton, M.P., Parker, B.R., Paterson, M.J., Beaty, K.G., Lyng, M. y Kasian, S.E.M., 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 32, pp.11254–11258.

Singh, H., Fernandes, T., Apte, S.K., 2010. Unusual radioresistance of nitrogen-fixing cultures of *Anabaena* strains. *J. Biosci.* 35, 427–434.

Singh, N.K., Dhar, D.W., 2013. Cyanotoxins, related health hazards on animals and their management: a review. *Ind. J. Ani. Sci.* 83, 1111–1127

Sipari, H., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Oksanen, I., Sivonen, K., 2010. Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase e gene expression. En: *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, pp.3797–3805.

Sivonen, K. y Jones, G., 1999. Cyanobacterialtoxins. En: Chorus, I. y Bartram, J., eds. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Londres: E & FN Spon. pp.41–111.

Slim, K., Fadel, A., Atoui, A., Lemaire, B.J., Vinc, on-Leite, B., Tassin, B., 2014. Global warming as a driving factor for cyanobacterial blooms in Lake Karaoun, Lebanon. *Desalin. Water Treat.* 52, 2094–2101.

Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., de Marsac, N.T., Humbert, J.F., 2011. A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. En: *PLoS ONE*, 6(1), pp.e16208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016208>.

Tanabe, Y., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (2004). Evidence for Recombination in the Microcystin Synthetase (mcy) Genes of Toxic Cyanobacteria *Microcystis* spp. *Journal of molecular evolution*, 58(6), 633-641.

Tanabe Y, Sano T, Kasai F, Watanabe MM., 2009. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystisaeruginosa*. *BMC Evolutionary Biology* 9:115. doi: 10.1186/1471-2148-9-115

Tanabe, Y., Hodoki, Y., Sano, T., Tada, K., Watanabe, M.M., 2018. Adaptation of the freshwater bloom-forming cyanobacterium *Microcystisaeruginosa* to brackish water is driven by recent horizontal transfer of sucrose genes. En: *Frontiers in Microbiology*, 9, 1150.

Thomsen, N., Ali, R. G., Ahmed, J. N., & Arkell, R. M. (2012). High resolution melt analysis (HRMA); a viable alternative to agarose gel electrophoresis for mouse genotyping. *PloS one*, 7(9), e45252.

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Von Dohren, H., Borner, T. y Neilan, B.A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. En: *Chemistry & Biology*, 7, pp.753-764.

- Tonk, L., Bosch, K., Visser, P., M. y Huisman, J., 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystisaeruginosa*. En: *Aquatic Microbial Ecology*, 46(2), pp.117-123.
- Torokne, A., Palovics, A., Bankine, M., 2001. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria—experimental evidence. *Environ. Toxicol.* 16, 512–516
- UNESCO y Bonilla, Sylvia, ed., 2009. *Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Montevideo: UNESCO. (Documento Técnico PHI-LAC, N° 16)
- Van de Waal, D., Verspagen, H., Lurling, M., Van Donk, E., Visser, P., Huisman, J., (2009). The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: an experimental te
- Van de Waal, B., Smith, H., Declerck, J., Stam, M., Elser, J. (2014). Stoichiometric regulation of phytoplankton toxins. *Ecol. Lett.* 17 (6), 736–742.
- Vestervik, P. S., Misiorek, J. O., Spoo, L. E., Toivola, D. M., & Meriluoto, J. A. (2012). Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 cells. *Toxins*, 4(11), 1008-1023.
- Vico, P., L. Aubriot, F. Martigani, N. Rigamonti, S. Bonilla & C. Piccini, 2016. Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogs in *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 56: 37–43.
- Vidal, L. y Kruk, C., 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to latitude 34°53` S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. En: *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3, pp.142-151.
- Visser, P., Ibelings, L. (2005). The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*: features explaining its success and measures of its control. J. Huisman, H.C.P.P. Matthijs, and M. Visser (Eds.) Dordrecht, Springer:109-142.
- Vossen R, Emmelien A, Roos A, den Dunnen JT. 2009. High Resolution Melting Analysis (HRMA)—more than just sequence variant screening. *Hum Mutat* 30:860–866.
- Wacklin, P., Hoffmann, L. & Komárek, J. (2009). Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 9(1): 59-64.
- Walsby, A. E., Hayes, P. K. & Boje, R. (1995). The gas vesicles, buoyancy and vertical distribution of cyanobacteria in the Baltic Sea. *European Journal of Phycology* 30, 87–94.
- Walsby, A.E., Hayes, P.K., Boje, R., Stal, L.J., 1997. The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *New Phytol.* 136 (3), 407–417

- Wang, H., Gruden, C.L., Bridgeman, T.B., Chaffin, J.D., 2009. Detection and quantification of *Microcystis* spp. and microcystin-LR in western Lake Erie during the summer of 2007. *Water Sci. Technol.* 60, 1837–1846.
- Wang, J.; Salata, J.J. & Bennett, P.B. (2003). Saxitoxin is a gating modifier of hERG K⁺ Channels. *Journal of General Physiology*, 121: 583-598.
- Ward, D.M., Ferris, M.J., Nold, S.C., Bateson, M.M., Kopczynski, E.D., and Ruff-Roberts, A.L. (1994) Species diversity in hot spring microbial mats as revealed by both molecular and enrichment culture approaches— relationship between biodiversity and community structure. In *NATO ASI Series Vol. G35: Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, edited by L.J. Stal and P. Caumette, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 33–44.
- Ware S, Hemming BA (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311:17-29.
- Weirich, C.A., Miller, T.R., 2014. Freshwater harmful algal blooms: toxins and children's health. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 44, 2–24.
- Whitton, B. & M. Potts (2000). *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 669pp.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicol. Appl. Pharm.* 203, 201–218.
- Wu, Z., Gan, N., Huang, Q. & Song, L. (2007). Response of *Microcystis* to copper stress - do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance? *Environmental Pollution* 147, 324–330.
- Zhang, M., Shi, X., Yu, Y. & Kong, F. (2011). The acclimative changes in photochemistry after colony formation of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Phycology* 47, 524–532.
- Zeyoudi, M., Altenaiji, E., Ozer, L. Y., Ahmed, I., Yousef, A. F., & Hasan, S. W. (2015). Impact of continuous and intermittent supply of electric field on the function and microbial community of wastewater treatment electro-bioreactors. *Electrochimica Acta*, 181, 271-279.
- Zilliges, Y., Kehr, J.-C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., Kaplan, A., Börner, T. & Dittmann, E., 2011. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *En: PloS one*, 6(3), e17615.