



Dinámica y condicionantes ambientales de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el río Uruguay y Río de la Plata

Lic. Gabriela Martínez de la Escalera

Programa de posgrado PEDECIBA, Área Biología, sub-área Microbiología
Universidad de la República

Montevideo – Uruguay
Diciembre de 2019

Dinámica y condicionantes ambientales de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el río Uruguay y Río de la Plata

Lic. Gabriela Martínez de la Escalera

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrado PEDECIBA, Área Biología, sub-área Microbiología, Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Tesis realizada en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y en el Centro Universitario Regional Este (CURE), sede Rocha.

Orientador de Tesis

Dra. Claudia Piccini

Departamento de Microbiología.
Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable, Ministerio de
Educación y Cultura.

Co-orientador de Tesis

Dra. Carla Kruk

Sección Limnología, Facultad de
Ciencias, Universidad de la República.
Centro Universitario Regional Este
(CURE), sede Rocha, Universidad de la
República.

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dra. Karina Antúnez

Departamento de Microbiología. Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
Ministerio de Educación y Cultura.

Dra. Carolina Crisci

PDU Modelización y Análisis de Recursos Naturales.
Centro Universitario Regional Este (CURE), sede
Rocha, Universidad de la República.

Dra. Leda Giannuzzi

Centro de Investigación y desarrollo en criotecnología
de alimentos.
Cátedra de Toxicología. Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata.

Montevideo – Uruguay

Diciembre de 2019

> # "...cuántos caminos habrá que encontrar,
cuántas respuestas habrá,
tantas preguntas que van a insistir,
tantas que están por venir..."

La Gran Muñeca, 2017

Resumen

Las floraciones de cianobacterias en ecosistemas acuáticos son un problema ambiental a nivel nacional y mundial. Ciertas especies de cianobacterias producen toxinas (cianotoxinas) que provocan intoxicaciones letales, agudas y crónicas en animales y humanos. Entre las cianotoxinas más frecuentes se encuentran las microcistinas producidas principalmente por organismos del Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA). El CMA desarrolla densas floraciones tóxicas en ríos, estuarios, lagos y lagunas de nuestra región. Se ha descrito que dentro de una misma floración del CMA se pueden encontrar poblaciones con capacidad de producir la toxina (genotipos tóxicos) y sin esta capacidad (genotipos no tóxicos). Las poblaciones con genotipo tóxico son aquellas que presentan el *cluster* genético involucrado en la síntesis de microcistinas, integrado por dos operones, *mcyA-C* y *mcyD-J*. El conocimiento acerca de cómo las variaciones en el ambiente afectan la abundancia y toxicidad del CMA es escaso y a menudo contradictorio, por lo que resulta fundamental conocer de manera detallada la respuesta del CMA tóxico al cambio ambiental. El objetivo general de esta tesis fue evaluar cuáles son las variables ambientales que modulan la dinámica, diversidad y toxicidad del CMA en el gradiente ambiental río Uruguay-Río de la Plata. Para ello, se combinaron estudios de campo, modelos estadísticos y experimentos controlados de laboratorio. Los estudios de campo permitieron determinar que la distribución de las poblaciones con genotipo tóxico está modulada principalmente por la temperatura y conductividad del agua, detectándose su mayor abundancia en verano en el embalse de Salto Grande. Posteriormente, se evaluó si la proliferación del CMA en condiciones ambientales tan dispares como las encontradas en el gradiente río-estuario se debe a la existencia de varias poblaciones con diferente nicho ecológico (diversidad intra-CMA). Dicho estudio permitió identificar seis ecotipos (poblaciones genotípica y ecológicamente coherentes) a lo largo del gradiente, sugiriendo que el mecanismo que garantiza el éxito del CMA es la generación de ecotipos con distintas preferencias ambientales. Se determinó asimismo que en el embalse de Salto Grande la abundancia de genotipos tóxicos (*mcy*) y la transcripción de genes *mcy* fue mayor que aguas arriba o aguas abajo, independientemente de la estacionalidad, siendo ambas variables negativamente afectadas por la turbidez y conductividad. Sin embargo, tanto la estructura del CMA como la de su fracción tóxica sí se vieron afectadas por la estacionalidad, identificándose dos genotipos tóxicos diferentes: uno presente en verano y otro en invierno. Estos hallazgos sugieren que dentro del embalse las condiciones ambientales promueven la dominancia de ecotipos del CMA con alto potencial tóxico, tanto durante las estaciones cálidas como en los meses más fríos. Para confirmar los hallazgos de campo, se realizaron experimentos con comunidades naturales del CMA bajo condiciones controladas de temperatura y salinidad, evaluándose su diversidad, toxicidad y dinámica de genotipos tóxicos. Los resultados confirmaron que el aumento de la salinidad a valores estuarino-marinos induce cambios en la estructura comunitaria, disminuyendo la proporción de genotipos tóxicos en la comunidad. Además, las poblaciones que toleran

altas salinidades expresan genes *mcy* en niveles bajos y producen diferentes variantes de microcistinas a distintas salinidades. Temperaturas lejanas a la óptima de crecimiento para estos organismos (mayores o menores) también afectaron a la estructura comunitaria del CMA tóxico, incrementando su proporción y promoviendo la diversificación de las microcistinas producidas. En base a los hallazgos proponemos que, si bien las poblaciones tóxicas del CMA crecen de manera óptima en agua dulce, también toleran salinidades estuarinas y marinas, pudiendo no solo sobrevivir sino también estar activas en el estuario. A su vez, las condiciones ambientales del embalse promueven la dominancia de ecotipos tóxicos que, al ser arrastrados aguas abajo (por ej. en condiciones de alto caudal) se enfrentan a filtros ambientales (temperatura y salinidad) que seleccionan aquellos ecotipos adaptados a las condiciones locales. Asimismo, la toxicidad de dichos ecotipos incrementa con la salinidad y con temperaturas extremas del agua, promoviendo la síntesis de distintas variantes de microcistina. En conjunto, el conocimiento generado en esta tesis contribuye al monitoreo y gestión del riesgo en dos sistemas acuáticos sumamente relevantes para la región.

Abstract

Cyanobacterial blooms in aquatic ecosystems are a national and global environmental problem. The main concern regarding the presence of cyanobacteria blooms is the ability of some species to produce toxins (cyanotoxins) that can affect humans and animals. Among cyanotoxins, microcystins, produced by organisms of the *Microcystis aeruginosa* complex (MAC), are the most frequently reported. MAC form superficial and dense blooms in rivers (such as Uruguay river), estuaries (Río de la Plata), lakes and lagoons in our geographic region. It has been described that MAC blooms often contain both, microcystin-producing (toxic genotype) and non-producing (nontoxic genotype) populations, but the environmental conditions favouring the dominance of toxic genotypes as well as the expression and presence of microcystin variants in the water are still elusive. Therefore, it is essential to analyse the effects of environmental changes on the response of MAC genotypes. The aim of this thesis was to evaluate which are the environmental variables that modulate the dynamics, diversity and toxicity of the MAC in the Uruguay river-Río de la Plata. To accomplish that, we developed a strategy involving field studies, statistical models and laboratory experiments. Based on one-year field studies, the abundance and distribution of toxic genotypes, as determined by qPCR of genes involved in the synthesis of toxins (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* and *mcyJ*), was mainly affected by water temperature and conductivity. Also, the highest amount of cells having toxic genotype was found in Salto Grande reservoir during summer, and these numbers decreased towards the estuary. In order to study the mechanisms that enable MAC to proliferate in both fresh and estuarine water, MAC diversity was assessed using HRMA (high resolution melting analysis) of the *mcyJ* gene and the resulting melting curves were analysed by regression algorithms and functional classification trees (*f*CART). This combined analysis allowed to identify six groups of genotypes phenotypically and ecologically coherent, associated to specific environmental conditions that were defined as MAC ecotypes. This finding suggests that the generation of ecotypes with different environmental preferences (especially regarding temperature, turbidity and conductivity) would be the mechanism that guarantees the success of the MAC throughout the studied gradient. As MAC toxic populations showed to be more abundant and persistent through the year in Salto Grande reservoir, the next step was to make a site-specific study about MAC toxic potential (*mcy* transcription), its spatial-temporal dynamics and diversity (massive sequencing of the phycocyanin intergenic spacer). Not only the abundance of toxic populations, but also the amount of *mcy* transcripts were higher inside the reservoir than upstream or downstream, and both were negatively affected by water conductivity and turbidity. Nonetheless, MAC community structure (toxic and non-toxic) and the diversity of the toxic fraction were only affected by temperature. Moreover, two different toxic genotypes were identified, one present during summer and the other one during winter. Taken together, these findings suggest that environmental conditions in the reservoir promote the dominance of MAC toxic genotypes with high toxic potential

throughout warm and cold season. In order to confirm the findings from the field studies, experiments were conducted with natural MAC communities under temperature and salinity controlled conditions. MAC diversity, proportion of toxic genotypes, transcription of *mcy* genes and microcystin production were assessed. The obtained results confirmed that the increase in salinity changes the community structure and decrease the toxic genotypes proportion in MAC community. Thus, populations able to tolerate high salinities have a low *mcy* expression levels but increase the synthesis of a number of microcystin variants, depending on the salinity at which they are subjected. Also, water temperature higher or lower than the optimum for these organisms increased the proportion of toxic populations able to synthesize different variants of microcystins (LR, RR, YR, WR). Hence, salinity and temperature values that are "extreme" for MAC optima trigger the production of different microcystin variants. Based on the novel information provided by this thesis, we propose a conceptual model for MAC dynamics and toxicity in the gradient imposed by Uruguay River and Rio de la Plata where toxic populations having an optimal grow in freshwater are able to tolerate conditions of estuarine or marine salinity, being able not only to survive but also to be metabolically active. The environmental conditions in the reservoir would promote the dominance of MAC toxic ecotypes, which in cases of high flow can be dragged downstream where environmental filters (mostly temperature and salinity) would select ecotypes fit to these conditions. In addition, ecotypes toxicity would increase along with salinity and temperature extremes, promoting the synthesis of different microcystin variants. Altogether, these findings make a contribution to MAC ecology knowledge that are useful for the monitoring and risk management of two aquatic systems that are extremely relevant for the region. They imply that toxins can be present both in freshwater and in the estuary and that toxic populations produce microcystin variants that are not usually monitored in our country; this can occur in summer or winter, emphasizing the need for continuous monitoring of these organisms.

Lista de siglas

ADN, ácido desoxirribonucleico
ADNc, ADN complementario
AIC, criterio de información de Akaike
ANII, Agencia Nacional de Investigación e Innovación
ARN, ácido ribonucleico
BSA, albúmina de suero bovino
BV-Ciano, Biovolumen de cianobacterias totales
BV-CMA, Biovolumen del Comlpejo *Microcystis aeruginosa*
BV-Fito, Biovolumen del fitoplancton
CART, árboles de clasificación y regresión
CARU, Comisión Administradora del Río Uruguay
CMA, Comlpejo *Microcystis aeruginosa*
CTAB, bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CURE, Centro Universitario Regional del Este
DGGE, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
EDTA, ácido etilendiaminotetraacético
ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
fCART, árboles de clasificación y regresión funcional
FCE, Fondo Clemente Estable
FT, Fósforo total
GLM, modelos lineales generalizados
GLS, mínimos cuadrados generalizados
HPLC, cromatografía líquida de alta afinidad
HRMA, *High Resolution Melting Analysis*
IIBCE, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
ITS, espaciador intergénico ribosomal
K, conductividad
LC-MS, cromatografía líquida-espectrometría de masas
LRT, likelihood-ratio test
MC, microcistina
MC-LR, microcistina variante LR
MC-RR, microcistina variante RR
MC-WR, microcistina variante WR
MC-YR, microcistina variante YR
NaCl, cloruro de sodio
NRPS, péptido sintetadas no ribosomales
NT, Nitrógeno total
OTU, Unidad Taxonómica Operacional

PC-IGS, espaciador intergénico del operón de ficocianina

PCR, Reacción en cadena de la polimerasa

PKS, poliketido sintasa

qPCR, Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo

QUIIME, *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

RF, *Random Forest*

RFU, Unidad relativa de fluorescencia

RT, Retro-transcripción

SNP, polimorfismo de un solo nucleótido

TAE, Buffer Tris, acetato y EDTA

T_m, Temperatura de *melting*

UdelaR, Universidad de la República

UPGMA, *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*

Tabla de contenidos

Resumen	IV
Abstract	VI
Lista de siglas	VIII
Introducción general	1
1. Cianobacterias.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Floraciones de cianobacterias.....	2
1.3. Cianotoxinas.....	4
2. Complejo <i>Microcystis aeruginosa</i> (CMA).....	6
2.1. Género <i>Microcystis</i>	6
2.2. Microcistinas.....	7
2.3. Biosíntesis de microcistinas.....	7
2.4. Factores que modulan la microcistina.....	10
3. Detección y cuantificación del CMA y microcistinas.....	11
3.1. Monitoreo tradicional de cianobacterias y toxinas.....	11
3.2. Técnicas moleculares para la cuantificación de cianobacterias tóxicas y análisis de diversidad genotípica.....	11
3.2.1. Genes candidatos para la aplicación de técnicas moleculares.....	13
4. Problema a abordar.....	14
Hipótesis y predicciones	16
Objetivo general	18
Objetivos específicos.....	18
Estructura de la tesis	19
Capítulo 1: Dinámica espacio-temporal de genotipos tóxicos del complejo <i>Microcystis aeruginosa</i> en el gradiente ambiental río Uruguay-Río de la Plata	21
1.1. Resumen.....	22
1.2. Introducción.....	23
1.3. Objetivo.....	25
1.4. Estrategia de investigación.....	25
1.5. Metodología.....	26
1.5.1. Sitio de estudio.....	26
1.5.2. Muestreo.....	26
1.5.3. Extracción de ADN.....	28
1.5.4. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	29
1.5.5. Curva de calibración y cuantificación del número de copias del gen.....	29
1.5.6. Análisis de datos.....	30
1.6. Resultados.....	31
1.6.1. Caracterización ambiental.....	31
1.6.2. Variabilidad espacial y temporal de los genes <i>mcy</i>	34
1.6.3. Relación entre genotipos tóxicos y variables ambientales.....	35
1.6.4. Relación entre genotipos tóxicos y otros indicadores del CMA.....	38
1.7. Discusión.....	39
1.7.1. CMA y variables meteorológicas.....	39
1.7.2. CMA y temperatura.....	40
1.7.3. CMA y salinidad.....	41
1.7.4. CMA y turbidez.....	41
1.7.5. CMA y nutrientes.....	42

1.7.6. Producción de toxinas por el CMA.....	42
1.8. Conclusiones.....	44
Capítulo 2: Efecto del ambiente sobre la estructura de las comunidades del Complejo <i>Microcystis aeruginosa</i>	45
2.1. Resumen.....	46
2.2. Introducción.....	47
2.3. Objetivo.....	50
2.4. Estrategia de investigación.....	50
2.5. Métodos.....	51
2.5.1. Muestreo.....	51
2.5.2. Extracción de ADN.....	51
2.5.3. <i>High Resolution Melting Analysis</i> (HRMA) de amplicones de <i>mcyJ</i>	52
2.5.4. CART funcional.....	52
2.5.5. Identificación de ecotipos tóxicos.....	53
2.6. Resultados.....	56
2.6.1. Perfiles de <i>melting</i> obtenidos a partir del HRMA.....	56
2.6.2. Relaciones entre las comunidades de genotipos tóxicos y el ambiente.....	56
2.6.3. Ecotipos tóxicos y rasgos fenotípicos.....	60
2.7. Discusión.....	61
2.8. Conclusiones.....	65
Capítulo 3: Efecto de los embalses en la proliferación y toxicidad del complejo <i>Micricystis aeruginosa</i>: Salto Grande (río Uruguay)	67
3.1. Resumen.....	68
3.2. Introducción.....	69
3.3. Objetivo.....	71
3.4. Estrategia de investigación.....	71
3.5. Metodología.....	72
3.5.1. Muestreo.....	72
3.5.2. Extracción de ácidos nucleicos.....	74
3.5.3. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	74
3.5.4. Curva de calibración y cuantificación de copias del gen.....	75
3.5.5. Análisis de la diversidad del CMA.....	75
3.5.6. Análisis de datos.....	76
3.6. Resultados.....	78
3.6.1. Caracterización ecosistémica.....	78
3.6.2. Variabilidad espacial y temporal de la abundancia de los genes mcy	82
3.6.3. Poblaciones portadoras de genotipos tóxicos: variables ambientales y otros indicadores de cianobacterias.....	84
3.6.4. Transcripción de genes <i>mcy</i> variación espacial y temporal.....	85
3.6.5. Transcripción de los genes <i>mcy</i> : variables ambientales y otros indicadores de cianobacterias.....	87
3.6.6. Ecotipos tóxicos del CMA.....	89
3.6.7. Variación estacional y temporal de la proporción de genotipos tóxicos.....	90
3.6.8. Diversidad del CMA (tóxicas y no tóxicas).....	91
3.7. Discusión.....	94
3.8. Conclusiones.....	99
Capítulo 4: Efectos de la salinidad y temperatura sobre la toxicidad del complejo <i>Microcystis aeruginosa</i>: una aproximación experimental	101
4.1. Resumen.....	102
4.2. Introducción.....	104
4.3. Objetivo.....	108

4.4. Estrategia de investigación.....	108
4.5. Metodología.....	109
4.5.1. Diseño experimental.....	109
4.5.2. Condiciones generales	110
4.5.3. Inóculo	110
4.5.4. Muestreo de los experimentos	111
4.5.5. Extracción de ácidos nucleicos.....	111
4.5.6. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	112
4.5.7. Análisis de la variabilidad del gen <i>mcyJ</i>	113
4.5.8. Cuantificación de toxinas.....	114
4.5.9. Análisis de datos.....	114
4.6. Resultados: efecto de la salinidad.....	115
4.6.1. Dinámica temporal de la abundancia de poblaciones tóxicas.....	115
4.6.2. Dinámica de la transcripción de genes <i>mcy</i>	116
4.6.3. Actividad del CMA: abundancia de transcritos del espaciador PC-IGS.....	118
4.6.4. Diversidad de poblaciones tóxicas del CMA.....	118
4.6.5. Variación de la proporción de genotipos tóxicos / no tóxicos.....	121
4.6.6. Producción de toxinas	121
4.6.7. Relación entre las diferentes variables analizadas.....	124
4.7. Discusión: efecto de la salinidad.....	124
4.7.1. Efecto de la salinidad en la abundancia de poblaciones tóxicas.....	124
4.7.2. Efectos de la salinidad sobre la estructura comunitaria de la fracción tóxica del CMA.....	126
4.7.3. Efectos de la salinidad sobre la transcripción.....	127
4.7.4. Efecto de la salinidad sobre las variantes de microcistinas (MCs)	128
4.8. Resultados: efecto de la temperatura.....	131
4.8.1. Dinámica temporal de la abundancia de poblaciones tóxicas.....	131
4.8.2. Dinámica de la transcripción de genes <i>mcy</i>	131
4.8.3. Actividad del CMA: estudio de la abundancia de transcritos del espaciador PC-IGS.....	133
4.8.4. Diversidad de genotipos tóxicos.....	133
4.8.5. Variación de la proporción de genotipos tóxicos / no tóxicos.....	136
4.8.6. Concentración de microcistinas	136
4.8.7. Relación entre variables.....	139
4.9. Discusión: efecto de la temperatura.....	139
4.9.1. Efecto de la temperatura sobre la abundancia de poblaciones tóxicas.....	139
4.9.2. Efectos de la temperatura sobre la estructura comunitaria de la fracción tóxica del CMA.....	141
4.9.3. Efectos de la temperatura sobre la transcripción.....	142
4.9.4. Efectos de la temperatura sobre las variantes de microcistinas (MCs)	143
4.10. Discusión general del Capítulo 4.....	146
4.11. Conclusiones generales del Capítulo 4.....	147
Conclusiones finales y modelo conceptual sobre la dinámica del CMA en el río Uruguay y el Río de la Plata.....	148
Perspectivas.....	153
Referencias bibliográficas.....	155
Apéndices.....	174
Apéndice 1: Metodologías específicas.....	175
Apéndice 2: Información complementaria.....	184
Apéndice 3: Scrips de R.....	212
Apéndice 4: Actividades académicas realizadas durante el doctorado.....	225
Apéndice 5: Publicación del Capítulo 1.....	234

Introducción general

1. *Cianobacterias*

1.1. Generalidades

Las cianobacterias son microorganismos procariotas fotosintéticos oxigénicos que viven en una amplia variedad de ambientes, desde terrestres hasta aguas dulces y marinas (Whitton, 2012). Su registro fósil se remonta a más de 3.500 millones de años, lo que los convierte en los fósiles más antiguos conocidos en el mundo (Schopf, 2012). Durante la Era Proterozoica (hace 2500 - 570 millones de años), cuando la atmósfera consistía principalmente en metano, dióxido de carbono, vapor de agua y bajas concentraciones de nitrógeno, las cianobacterias se volvieron abundantes y se diseminaron hacia diferentes ambientes (Schopf & Walter, 1982). Como resultado del aumento de su fotosíntesis se generó un aumento de oxígeno en la atmósfera, lo que permitió la posterior evolución y diversificación de organismos aerobios (Kasting & Siefert, 2002; Tomitani *et al.*, 2006).

Las cianobacterias son un filo diverso que incluye formas unicelulares y coloniales, incluyendo filamentos (Saker, 2009). Algunas especies tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) mediante células especializadas denominadas heterocitos, lo que les otorga una ventaja para sobrevivir en ambientes pobres en dicho nutriente. Además presentan una gran vaina de sustancia mucilaginosa alrededor de las células, la cual las protege de una serie de factores de estrés como por ejemplo la deshidratación. Las cianobacterias que viven en sistemas acuáticos tienen la capacidad de regular su posición en la columna de agua mediante la presencia de vesículas de gas. Gracias a estos organelos pueden cambiar su exposición a la luz, reduciendo la mortandad por sedimentación y accediendo a capas profundas de la columna de agua con mayor disponibilidad de nutrientes (Oliver & Ganf, 2000). Como si esto fuera poco, varias especies de cianobacterias presentan estructuras de resistencia (acinetes) que se forman durante periodos de estrés ambiental. De esta manera, las especies que tienen acinetes pueden permanecer durante años en estado latente en el sedimento de los lagos y germinar

cuando las condiciones son favorables para su crecimiento (Adams *et al.*, 1981; Kaplan-Levy *et al.*, 2010).

En los ecosistemas acuáticos, las cianobacterias forman parte del fitoplancton, comunidad de microorganismos fotosintéticos que vive en suspensión en la columna de agua. Esta comunidad genera cerca de la mitad de la producción primaria y del oxígeno de la tierra (Falkowski *et al.*, 2003; Arrigo, 2005), por lo que tiene fuerte influencia en los ciclos biogeoquímicos y en el clima global (Falkowski *et al.*, 2003; Arrigo, 2005; Litchman & Klausmeier, 2008). Asimismo, son fundamentales para el mantenimiento de las tramas tróficas y de la biodiversidad acuática.

En la actualidad, las cianobacterias son ubicuas y por lo tanto se encuentran en una diversidad de ambientes acuáticos desde marinos hasta de agua dulce, incluyendo ambientes extremos desde glaciares hasta fuentes termales (Whitton *et al.*, 2012) y como simbiontes de hongos, bacterias heterótrofas, corales, entre otros (Usher *et al.*, 2007). En las últimas décadas, en ambientes acuáticos eutrofizados, estos microorganismos se han convertido en una gran preocupación a nivel mundial debido sus frecuentes proliferaciones que producen cambios drásticos en el ecosistema (Huisman *et al.*, 2005; Bonilla 2009; Chorus, 2012).

1.2. Floraciones de cianobacterias

El agua es un recurso esencial para el desarrollo y supervivencia de las poblaciones humanas. Sin embargo, este recurso está siendo cada vez más afectado en todo el mundo, comprometiendo el agua como recurso para múltiples usos potenciales. La pérdida de su calidad acarrea problemas ambientales, de salud y económicos en todo el mundo, incluyendo Uruguay (Kruk *et al.*, 2019).

Uno de los eventos que más afecta la calidad del agua es el incremento en la frecuencia e intensidad de las floraciones. Estas se definen como un crecimiento abrupto y masivo de una o pocas especies de cianobacterias (Reynolds, 1984; Huisman *et al.*, 2005; Paerl & Huisman, 2008; Vidal & Britos, 2012), llegando a abundancias tan altas que en algunas situaciones se tornan visibles a simple vista y son reconocidas como manchas verdes en el agua (**Figura 1**). Oliver & Ganf (2000) definen como floración a eventos de presencia de

cianobacterias con una abundancia mayor a 2×10^4 células/ml. Las floraciones se pueden formar en períodos de horas a días y pueden desaparecer en un plazo similar. Sin embargo, algunas permanecen por periodos mas largos, por ejemplo todo un verano, durante todo el año, o incluso de forma permanente dependiendo del sistema acuático en el que ocurran (Scasso *et al.*, 2001; Kruk *et al.*, 2002). Las floraciones disminuyen la transparencia e indirectamente la concentración de oxígeno en el agua, generando olor y sabor desagradables, disminuyendo la biodiversidad y afectando severamente gran parte de los usos que hacemos los humanos de los ecosistemas acuáticos (Huisman *et al.*, 2005; Bonilla, 2009; Chorus, 2012).

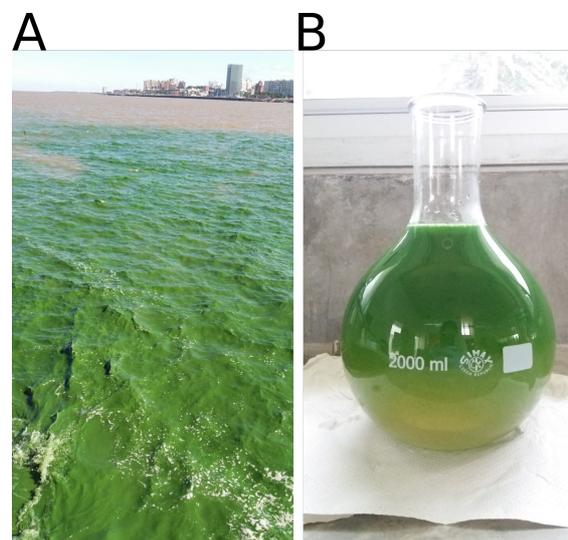


Figura 1. Floración de organismos del género *Microcystis*, **(A)** foto de la Playa Ramírez, Montevideo, 2019. **(B)** colonias de *Microcystis* en una muestra de agua superficial del embalse de Salto Grande, Salto, 2016.

En los ecosistemas continentales, una de las principales causas del aumento de la frecuencia e intensidad de las floraciones de cianobacterias es la eutrofización (Reynolds, 1984; Mazzeo *et al.*, 2002; Aubriot *et al.*, 2004; Bonilla *et al.*, 2006; Chalar, 2006; Rodríguez-Gallego *et al.*, 2007; Paerl & Huisman, 2008). La eutrofización es el enriquecimiento de nutrientes en un ecosistema acuático (Lampert & Sommers, 2007) y, si bien la eutrofización es un proceso natural, las actividades humanas lo aceleran gracias a la entrada de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) por el vertido de desechos no procesados

a los cuerpos de agua y desde las cuencas de drenaje principalmente como resultado de las actividades agropecuarias con uso intensivo de fertilizantes. Son importantes también las modificaciones físicas como el aumento del tiempo de residencia del agua debido al represamiento y la canalización, y la destrucción de la vegetación ribereña (Conde *et al.*, 2002; Conde & Rodríguez-Gallego, 2002). Esto genera inconvenientes sanitarios y sociales, así como importantes pérdidas económicas (Conde & Rodríguez-Gallego, 2002; DINAMA, 2009; OSE, 2009; Chorus, 2012; Kruk *et al.*, 2019).

En Uruguay, la eutrofización de los ecosistemas de agua dulce ha aumentado en los últimos años como consecuencia de la creciente producción agrícola e intensificación de la producción ganadera y la urbanización. Las primeras floraciones de cianobacterias en Uruguay se detectaron en 1982 y desde entonces se han vuelto un fenómeno frecuente en distintos ecosistemas acuáticos de nuestro país, como ser ríos (río Uruguay, Río Negro), estuarios (Río de la Plata), lagos y lagunas (Bonilla *et al.*, 1995, 2006; Pérez *et al.*, 1999; Bonilla & Conde, 2000; De Leon & Yunes, 2001; Kruk & De León, 2002; Kruk *et al.*, 2003; Vidal & Kruk, 2008).

La situación más adversa es la ocurrencia de floraciones de cianobacterias productoras de toxinas (cianotoxinas). Estas toxinas afectan a quienes consumen el agua o se bañan en ella, contaminan cultivos a través del riego, bioacumulándose en los tejidos de animales y afectando de forma aguda o crónica al ser humano (Chorus & Bartram, 1999; Huisman *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011; Sedan *et al.*, 2015). Existen varias especies de cianobacterias que pueden desarrollar floraciones potencialmente tóxicas, entre ellas las más frecuentes son especies del género *Microcystis* (Witton & Potts, 2000). El primer registro de floraciones de cianobacterias en cuerpos de agua de nuestro país fue de *Microcystis aeruginosa*, especie que puede producir toxinas (Quirós & Luchini, 1982).

1.3. Cianotoxinas

Las cianotoxinas se han descrito como metabolitos secundarios que se almacenan intracelularmente (Carmichael, 1992). Sin embargo, se ha postulado que la producción de cianotoxinas podría estar acoplada a la división celular y por lo tanto podrían ser un metabolito esencial o primario (Orr & Jones, 1998). Las cianotoxinas se pueden clasificar de acuerdo a los síntomas que producen en humanos y otros vertebrados en: hepatotoxinas

(daño a nivel del hígado) y neurotoxinas (daño a nivel del sistema nervioso) y dermatoxinas (daño a nivel de la piel) (Gademann & Portmann, 2008). En la **Tabla 1** se presentan distintas cianotoxinas y sus productores más frecuentes en ambientes de agua dulce y estuarina.

Tabla 1. Toxinas producidas por cianobacterias y los géneros involucrados en su producción y que son frecuentes formadores de floraciones en agua dulce y estuarina.

Toxina	Género productor
Microcistina	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Nostoc</i>
Nodularina	<i>Nodularia</i>
Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Woronichinia</i>
Anatoxina-a(S)	<i>Anabaena</i>
Saxitoxina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i>
Cilindrospermopsina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Raphidiopsis</i>

No hay consenso sobre las causas que estimulan la producción de toxinas. Sin embargo, se ha descrito que su expresión estaría relacionada con factores ambientales como temperatura, irradiancia, nutrientes, salinidad, CO₂ y pH, o que podrían ser moléculas de comunicación química entre ellas (Sivonen & Jones, 1999; Bar-Yosef *et al.*, 2010; Kaplan *et al.*, 2012; Harke *et al.*, 2016). Por tanto, la presencia de cianotoxinas en una floración es altamente variable según la especie, la cepa, la estructura comunitaria y las condiciones ambientales actuales y pasadas a las que esté sometida una población.

2. Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA)

2.1. Género *Microcystis*

Las especies del género *Microcystis* se desarrollan en un rango similar de condiciones ambientales y comparten diversas características, incluyendo la formación de floraciones superficiales y la potencial producción de cianotoxinas (Reynolds *et al.*, 2002; Kruk *et al.*, 2010). Estos organismos son coloniales y pueden presentar entre unas pocas a decenas de miles de células esféricas u ovaladas con diámetros de entre 3 y 5 micras que se mantienen unidas por mucílago (Komárek & Komárkova, 2002). Las células presentan vesículas de gas que conjuntamente con la presencia de mucílago les permite regular su posición en la columna de agua. Dentro del género *Microcystis* existen varias especies que se identifican por pequeñas diferencias en su morfología, denominadas también morfo-especies, como por ejemplo: *M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. firma*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. natans*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. smithii*, *M. viridis* y *M. wesenbergii* (Komárek & Komárkova, 2002). Sin embargo, una misma especie puede exhibir diferentes características morfológicas en respuesta a estímulos ambientales o fisiológicos, o durante su ciclo de vida, y distintas especies pueden convergen a una misma morfología en condiciones ambientales similares (Yang *et al.*, 2006). Esto, sumado a sus similares respuestas a los cambios ambientales dificulta su análisis a nivel de especie (Otsuka *et al.*, 1999; Otsuka *et al.*, 2001; Kruk *et al.*, 2010). Además, basados en estudios genómicos Pérez-Carrascal *et al.* (2019) han propuesto recientemente que la especie denominada *M. aeruginosa* constituye un grupo parafilético, distribuido en diversos clados y no sería por tanto una especie coherente desde el punto de vista filogenético.

Teniendo en cuenta lo anterior se define al complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA), que comprende a todas las especies del género *Microcystis* que se unificaron en base a las secuencias del operón de ficocianina y el espaciador transcripto intergénico (ITS) (Otsuka *et al.*, 1999, Otsuka *et al.*, 2001). Las especies del CMA son las más frecuentes en nuestra región, desarrollando importantes floraciones superficiales en diversos ecosistemas del Uruguay (O'Farrell *et al.*, 2012; Bonilla *et al.*, 2015; Kruk *et al.*, 2015). Estos organismos son típicos de ambientes dulceacuícolas de aguas quietas como lagos profundos y embalses, pero pueden desarrollarse en condiciones estuarinas y tolerar salinidades características de ambientes marinos (Tonk *et al.*, 2007). Su crecimiento se ve especialmente favorecido en ambientes con altas concentraciones de nutrientes, columna de agua estable y alta

radiación solar, ya que no son fotoinhibidas porque presentan moléculas que las protegen de la radiación UV (Reynolds *et al.*, 1981; Sandgren, 1988; Vidal, 2002).

2.2. Microcistinas

Las especies del CMA pueden producir microcistinas (cianotoxina), metabolitos que resultan tóxicos para seres humanos y animales (Huisman *et al.*, 2005). Las microcistinas también son producidas por otros géneros (*Dolychospermum*, *Aphanocapsa*) siendo una de las toxinas más frecuente. Los síntomas del consumo oral de microcistina incluyen diarrea, vómitos y debilidad general (DeVries *et al.*, 1993; Briand *et al.*, 2003). Generan necrosis hepática en pocas horas o días cuando son administradas en altas dosis, mientras que a dosis bajas el efecto es crónico y acumulativo. La exposición continua a las microcistinas también podría causar la promoción de tumores en el hígado (Sivonen & Jones, 1999). El mecanismo de acción de las microcistinas es a través de la inhibición de la serin/treonin fosfatasa 1 y 2A en eucariotas y actúan como promotores de tumores (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). La toxina se une covalentemente a la proteína fosfatasa, especialmente en hepatocitos y genera daño en la estructura y función celular del hígado, aunque también puede afectar a otros tejidos (Sivonen *et al.*, 1990; Harada & Tsuji, 1996; Sivonen & Jones, 1999).

Dentro del CMA, e inclusive dentro de una misma floración, se pueden encontrar poblaciones con genotipos que tienen la capacidad de producir microcistinas (genotipos tóxicos) y poblaciones con genotipos sin esta capacidad (genotipos no tóxicos) (Kurmayer & Kutzenberger, 2003). Mediante aproximaciones experimentales se ha demostrado que los genotipos tóxicos predominan en altas temperaturas, altas concentraciones de radicales libres de oxígeno, altos o bajos niveles de nitrato y fosfato, así como también bajos niveles de CO₂ (Vézic *et al.*, 2002; Kardinaal *et al.*, 2007a; b; Briand *et al.*, 2009, 2012; Dziallas & Grossart, 2011; Fujii *et al.*, 2011; Renaud *et al.*, 2011; Van de Waal *et al.*, 2011).

2.3. Biosíntesis de microcistinas

Las microcistinas son heptapetidos cíclicos con más de 100 variantes (Puddick *et al.*, 2014). Todas las microcistinas comparten una estructura básica común, el aminoácido Adda está presente en todas las variantes mientras que en las posiciones X y Z los L-aminoácidos son

variables, además pueden ocurrir modificaciones en todos los residuos aminoacídicos, generando de esta forma las diferentes variantes de la toxina (**Figura 2**). Entre todas estas variantes de microcistinas (MC), la MC-LR es la variante más estudiado, la cual contiene leucina (L) y arginina (R) en las posiciones X y Z, respectivamente, seguido de MC-RR (con dos argininas (R) en las posiciones X y Z). Otras variantes como la MC-YR y MC-WR contienen tirosina (Y) y triptofano (W) en la posición X, respectivamente y arginina (R) en la posición Z.

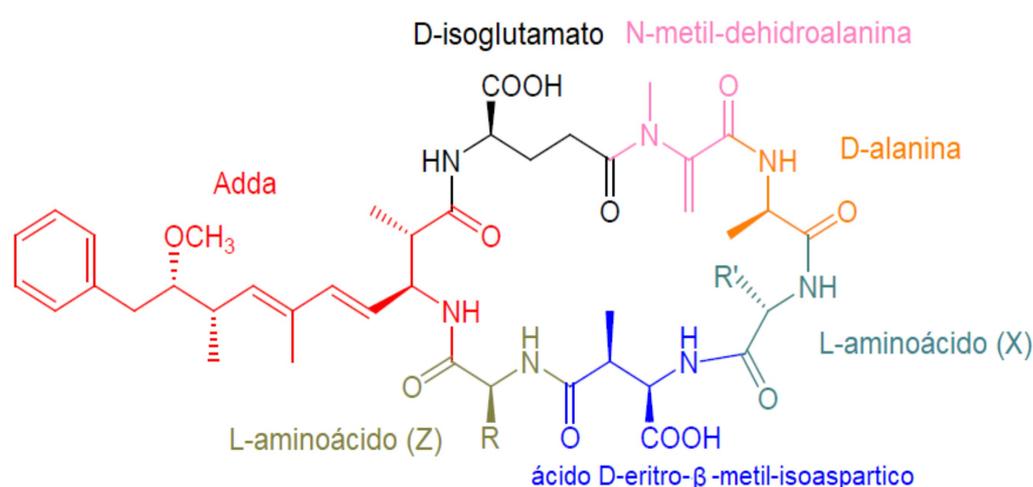


Figura 2. Estructura química de la microcistina.

La biosíntesis de las microcistinas se realiza de manera no ribosomal por un complejo enzimático, el cual está codificado por el *cluster* genético *mcy* de 55 kb (Fischbach & Walsh, 2006) (**Figura 3**). Este *cluster* contiene 10 genes (*mcyA-J*) y consiste en péptido sintetasas (NRPS), poliquétido sintetasas (PKS) y enzimas modificadoras adicionales (Tillett *et al.*, 2000) (**Figura 3**). Cada módulo de NRPS contiene dominios funcionales específicos para la activación y tioesterificación del aminoácido sustrato y para la elongación del péptido creciente (Tillett *et al.*, 2000). Los dominios PKS de *McyG*, *D* y *E* sintetizan Adda, la modificación por la O-metiltransferasa de *McyJ* y la aminotransferasa de *McyE* completa la formación del grupo Adda (**Figura 4**). Posteriormente, los siguientes seis aminoácidos son reconocidos, activados e incorporados a la cadena peptídica por la secuencia modular

NRPS de McyG, A, B y C. McyI y F son necesarios para la formación del ácido D-eritro- β -metil-aspartico antes de su incorporación (Dittmann *et al.*, 2013) (**Figura 4**). Finalmente, el dominio tioesterasa de McyC libera el heptapéptido completo (**Figura 4**). Una vez producida la molécula, ésta tiende a permanecer en el interior celular y su exportación está estrechamente relacionada al gen *mcyH* sin el cual no puede ser exportada (Pearson *et al.*, 2004).

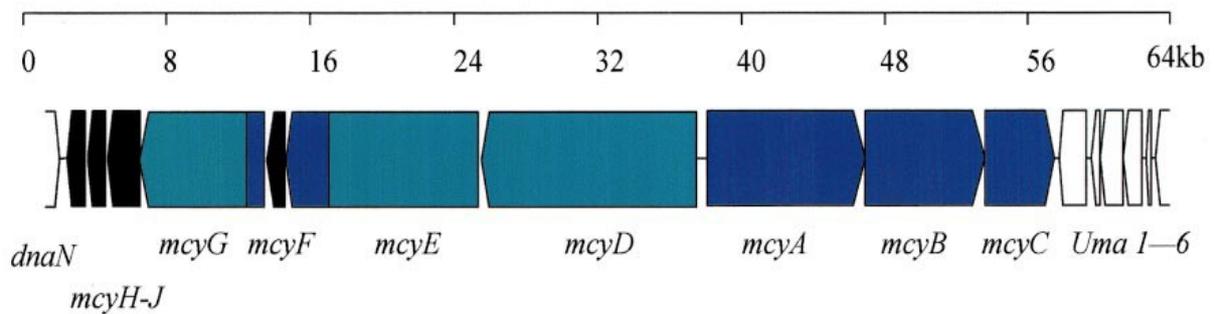


Figura 3. Organización del *cluster* genético para la biosíntesis de microcistina. Se indica la dirección de la transcripción y los tamaños relativos de los genes. Las regiones que contienen genes homólogos a las péptido sintetasa no ribosómicas o las poliquetido sintasa no ribosómicas se indican en azul oscuro y azul claro, respectivamente. Los genes adicionales de la supuesta función de *tailoring* de microcistina se indican en negro. Los genes que se muestran en blanco no participan de la síntesis de microcistina. Tomado de Tillet *et al.*, 2000.

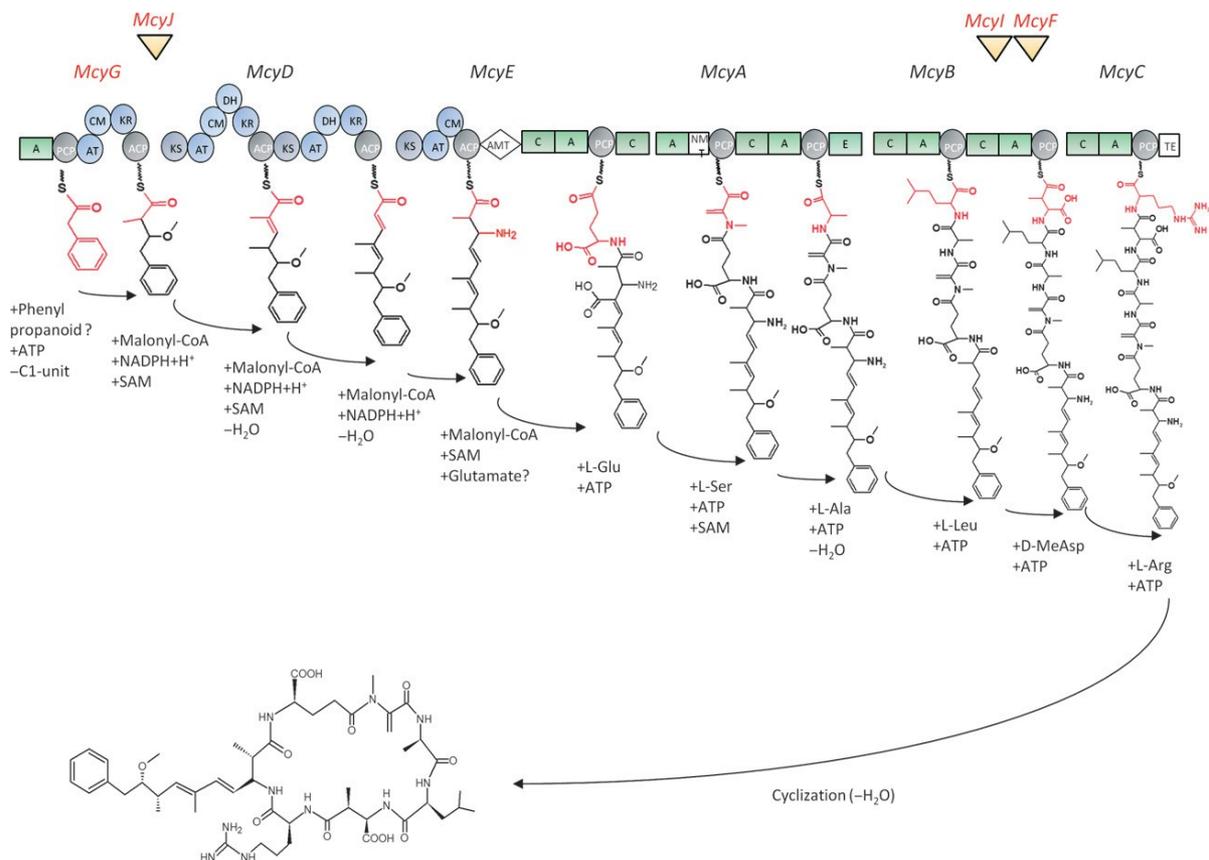


Figura 4. Representación esquemática de la ruta biosintética de microcistina. Los nombres de las enzimas que se caracterizaron bioquímicamente se resaltan en rojo. Otras reacciones propuestas se basan en predicciones bioinformáticas. Los aminoácidos y ácido carboxílico incorporadas o modificadas por proteínas individuales están resaltadas en rojo. Dominios de PKS: KS: cetoacil sintasa, AT: aciltransferasa, DH: deshidratasa, KR: quetoreductasa, ACP: proteína portadora de acilo, CM: C-metiltransferasa, AMT: glutamato-semialdehído aminotransferasa; Dominios de NRPS: A: dominio de adenilación, C: dominio de condensación, E: dominio de epimerización, NMT: N-metiltransferasa, PCP: proteína portadora de peptidilo, TE: dominio tioesterasa. Tomado de Dittman *et al.* (2013).

2.4. Factores que modulan la microcistina

No todas las poblaciones del CMA son capaces de producir esta toxina, ya sea debido a mutaciones puntuales o la ausencia completa o parcial del *cluster mcy* por eventos de delección (Kurmayer & Kutzenberger, 2003). La coexistencia de genotipos tóxicos y no tóxicos plantea la interrogante del rol ecológico de la producción de las microcistinas. Aunque se han realizado diversos estudios experimentales y de campo, no hay consenso sobre cuáles son las condiciones ambientales que influyen en la dominancia de genotipos tóxicos y no están claros los mecanismos que llevan a esta dominancia.

3. Detección y cuantificación del CMA y microcistinas

3.1. Monitoreo tradicional de cianobacterias y toxinas

La preocupación a nivel mundial sobre las floraciones de cianobacterias ha creado la necesidad de generar medidas de manejo acompañadas de monitoreos adecuados y rápidos. La información generada debe ser útil para conocer de forma temprana la ocurrencia y predecir la intensidad de las floraciones, así como para desarrollar planes de manejo y evitar o disminuir sus efectos negativos.

La presencia y abundancia de cianobacterias incluidas aquellas del CMA son tradicionalmente monitoreada mediante microscopía o de forma indirecta mediante la concentración de clorofila-a. Estas metodologías no permiten detectar la presencia de toxinas, por ello, una vez detectada la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas se deben aplicar ensayos para confirmar y/o cuantificar las toxinas. Los ensayos de ELISA (ensayo de inmunoadsorción) y HPLC (cromatografía líquida de alta *performance*) son los más usados para detección y cuantificación de cianotoxinas (Brena & Bonilla, 2009). Si bien en Uruguay existe la capacidad técnica para detectar cianotoxinas en varios laboratorios de análisis de calidad de agua, ésta es aún restringida a microcistinas totales y algunas variantes (e.g., LR, RR).

3.2. Técnicas moleculares para la cuantificación de cianobacterias tóxicas y análisis de diversidad genotípica

El desarrollo de métodos de detección de cianobacterias tóxicas rápidos, sensibles y accesibles es imprescindible para entender y prevenir los efectos negativos de las floraciones. En este sentido, los basados en técnicas de biología molecular son los preferidos. Los más empleados están basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y proporcionan una manera rápida y sensible de detectar poblaciones de cianobacterias potencialmente tóxicas. La adaptación del PCR en métodos cuantitativos (PCR cuantitativo en tiempo real, qPCR) permite monitorear poblaciones mediante la cuantificación de células, identificación de especies problemáticas y el estudio de la expresión de genes de síntesis de cianotoxinas (Pearson & Neilan, 2008; Sipari *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011).

Uno de los métodos más empleados para el análisis de la diversidad microbiana y composición de las comunidades es la electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante, DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis* por su sigla en inglés) (Muyzer *et al.*, 1993). Esta es una técnica mediante la cual se separan moléculas de ADN que poseen, por ejemplo, el mismo tamaño pero distinta secuencia, gracias a diferencias en sus propiedades de desnaturalización, lo que resulta en variaciones en la distancia de migración en gradientes químicos (técnica DGGE) (McCaig *et al.*, 2001). Teóricamente, el DGGE puede separar moléculas de ADN cuyas secuencias difieren en tan solo una base. El método DGGE generalmente es empleado para detectar cambios en las poblaciones microbianas a lo largo del tiempo y/o bajo diferentes condiciones ambientales o experimentales. Son técnicas rápidas, relativamente sencillas y permiten el análisis simultáneo de un gran número de muestras, lo cual hace posible la comparación estadística de la diversidad genética de comunidades microbianas de diferentes hábitats, entre otras aplicaciones (Muyzer, 1998). Por lo tanto, el DGGE es un método que permite comparaciones rápidas, reproducibles y a costos más bajos que otras técnicas. Además, permite realizar cuantificaciones relativas de la abundancia de cada banda (que corresponde a un genotipo bacteriano) en una muestra mediante la comparación de la intensidad de bandas individuales en los geles (McCaig *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2004).

La técnica *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) fue desarrollada recientemente para detectar variaciones de secuencias en genes particulares (Wittwer *et al.*, 2003). Esta herramienta es muy utilizada para análisis clínicos, epidemiológicos y estudio de diversidad de microorganismos (Hofinger *et al.*, 2009; Ganopoulos *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012). El análisis de *melting* de alta resolución es un método posterior a la realización de un PCR en tiempo real que se utiliza para detectar genotipos basados en polimorfismos de un único nucleótido (SNP). Una vez realizada la amplificación del fragmento de interés se realiza la desnaturalización de los amplicones, aumentando la temperatura gradualmente en incrementos de 0,1 °C. Como resultado se obtiene una curva de decaimiento de la fluorescencia en función de la temperatura (curva de *melting*) característica para cada muestra analizada que varía según el contenido G+C, longitud y secuencia del fragmento amplificado. La curva de *melting* corresponde a variantes del gen en estudio. Esta técnica es tan sensible que permite la detección de variaciones en una sola base. La herramienta HRMA es una técnica molecular relativamente simple y adecuada para el estudio de la

variabilidad a nivel genético (Hjelmsø *et al.*, 2014; Kim & Lee, 2014). Se ha usado en diferentes estudios, como ser la genotipificación, análisis de mutaciones y detección de SNP en poblaciones bacterianas (Wittwer, 2003; Hofinger *et al.*, 2009; Thomsen *et al.*, 2012; Tong & Giffard, 2012). Además, la técnica de HRMA ha sido utilizada para detectar enfermedades humanas asociadas a mutaciones puntuales (Li *et al.*, 2011), así como para abordar la diversidad de comunidades microbianas (Hjelmsø *et al.*, 2014; Kim & Lee, 2014; Zeyoudi *et al.*, 2015).

Las tecnologías de secuenciación masiva de moléculas de ADN permiten que un fragmento de ADN sea secuenciado repetidamente en un muy pequeño lapso de tiempo. Este procedimiento incrementa en la sensibilidad y precisión de la información generada (Malone & Oliver, 2011). La capacidad tecnológica de secuenciar ADN ha jugado un rol más que importante en los avances de la biología molecular. Estas técnicas son ampliamente aplicadas en diferentes estudios, como ser análisis de la expresión génica, identificación de factores de transcripción, identificación de mutaciones, número de copias y variaciones estructurales, y para el estudio de la diversidad genética. La aplicación de la secuenciación masiva al estudio de la diversidad genética permite que a partir de una muestra natural se puedan identificar, cuantificar y estudiar la filogenia de los organismos.

Estas técnicas son herramientas promisorias para estudiar la ocurrencia, abundancia y diversidad de poblaciones tóxicas de cianobacterias en distintas condiciones ambientales. Sus principales ventajas consisten en ser eficientes con muy bajas densidades celulares, permitiendo la evaluación de muchas muestras en forma simultánea y en corto tiempo, lo que permite generar alertas tempranas y facilitar la toma de medidas de gestión de manera rápida.

3.2.1. Genes candidatos para la aplicación de técnicas moleculares

Algunas especies de microorganismos presentan grandes diferencias ecológicas y fisiológicas entre poblaciones, que se ven reflejadas en grandes diferencias a nivel genómico (Welch *et al.*, 2002). Estas diferencias suelen ser difíciles de detectar cuando se utilizan marcadores filogenéticos de evolución lenta, como los genes ribosomales, lo que impide el estudio de los mecanismos que explican la dinámica de la estructura comunitaria. Este es el caso del CMA que incluye varias morfo-especies que comparten

más del 97% de identidad en su secuencia del gen 16S rRNA (Otsuka *et al.*, 1999). Estas diferencias morfológicas no se reflejan en la filogenia basada en el gen ribosomal 16S de *Microcystis*. En este sentido, el espaciador intergénico del operón de ficocianina (PC-IGS) ha sido muy utilizado en estudios de diversidad de cianobacterias, debido a que presenta niveles similares de variación de la secuencia y es capaz de resolver los distintos genotipos dentro de una gama de géneros (Bolch & Blackburn, 1996; Hayes & Barker, 1997; Bolch *et al.*, 1999).

Los genes *mcy* son ampliamente empleados en investigación para detectar, diferenciar e identificar cianobacterias productoras de microcistina mediante métodos moleculares (Sipari *et al.*, 2010). En este sentido, la técnica qPCR se ha aplicado para cuantificar la presencia de cianobacterias productoras de microcistinas basados en los genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyE*, *mcyD* y *mcyJ* (Neilan *et al.*, 1995; Vaitomaa *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2006; Rinta-Kanto & Wilhelm, 2006; Kim *et al.*, 2010). Además, se ha utilizado el gen *mcyJ* para el estudio de la diversidad genotípica de *Microcystis* mediante la técnica de electroforesis en geles con gradiente desnaturizante (DGGE) (Kim *et al.*, 2010).

4. Problema a abordar

Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que dentro de una misma floración del CMA se pueden encontrar poblaciones portadoras de genotipo tóxico (de aquí en adelante también referidas como genotipos tóxicos para abreviar) y poblaciones no tóxicas. Cambios en las variables ambientales pueden afectar diferencialmente la abundancia relativa de cada una, así como también la expresión genética y producción de toxinas y por lo tanto la presencia, concentración y variantes de la toxina en el agua. Si bien varios estudios han abordado la influencia de las variables ambientales sobre la dinámica de genotipos tóxicos y no tóxicos y sobre la producción de toxinas, no existe aun evidencia concluyente y consensuada sobre que condiciones inducen la proliferación de poblaciones tóxicas y la síntesis de toxinas. Por lo tanto, es importante enfocar los estudios en la respuesta de las poblaciones del CMA con diferentes genotipos frente a cambios en las variables ambientales.

Los sistemas acuáticos río Uruguay y Río de la Plata proveen de diversos servicios ecosistémicos y tiene valor para la conservación, incluyendo pesca artesanal e industrial, transporte, recreación y turismo, siendo zona de cría de peces y hábitat de mamíferos y aves marinas. Existen varios trabajos que analizan la estructura comunitaria del fitoplancton (incluyendo cianobacterias) en estos ecosistemas y reportes de la presencia de organismos potencialmente nocivos (De León, 2000; Kruk & De León, 2002; De León & Chalar, 2003; Calliari *et al.*, 2005; Calliari *et al.*, 2009). Por ejemplo, en el Río de la Plata se han registrado floraciones tóxicas de *Microcystis* desde el año 2001 , lo cual genera problemas sanitarios y ecológicos (De León & Yunes, 2001), con floraciones que ocurren desde Colonia hasta la costa este del país. Por otro lado, en el río Uruguay las floraciones de cianobacterias son frecuentes y han sido foco de controversia internacional (Petherick, 2010). Por estos motivos, el ecosistema río Uruguay-Río de la Plata cuenta con las características necesarias para evaluar la respuesta de las poblaciones del CMA frente a cambios ambientales, principalmente de temperatura y salinidad, haciendo posible evaluarlos a lo largo de un amplio gradiente espacial.

Existen diversas hipótesis sobre cuál sería el mecanismo que genera la dominancia de los genotipos tóxicos. Una limitante de la proliferación de los genotipos tóxicos es el gasto energético necesario para sostener la producción de toxinas (Kardinaal *et al.*, 2007a). Por otra parte, el aumento de la abundancia de poblaciones tóxicas podría verse favorecido por la acción de la toxina como metabolito alelopático y como señal de comunicación frente al estrés ambiental (Schatz *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2015). En este marco **nuestra hipótesis general de trabajo es que la variación de las condiciones ambientales, principalmente abióticas, es la principal determinante de la dominancia de poblaciones con genotipos tóxicos.**

Hipótesis y predicciones

La primera hipótesis es que el CMA presenta diferentes respuestas a nivel de la proliferación frente a distintos factores ambientales. La principal predicción es que la temperatura y la salinidad serían las variables ambientales más relevantes. Para evaluar esta hipótesis se describe la dinámica espacial y temporal de la abundancia de genotipos tóxicos de organismos del CMA y su relación con las variables bióticas y abióticas en un amplio gradiente ambiental, desde Salto Grande en el río Uruguay hasta la desembocadura del Río de la Plata en el océano Atlántico (Capítulo 1).

La segunda hipótesis es que la fracción tóxica del CMA está compuesta por una diversidad de poblaciones con diferente adecuación biológica al ambiente, lo que permite proliferar en un amplio rango ambiental. Dicha diversidad de poblaciones se origina a nivel local (evolución reciente o intra-taxón) y puede ser identificada a través de sus genotipos *mcy*. La principal predicción es que existirán grupos de organismos más adecuados a diferentes condiciones ambientales. Para estudiar la diversidad genotípica se desarrolló una metodología que combina una herramienta molecular de alta resolución y modelos matemáticos de aprendizaje automático (Capítulo 2).

La tercera hipótesis plantea que las poblaciones tóxicas de CMA son más exitosas en condiciones de aguas quietas y alta carga de nutrientes debido a los altos costos energéticos asociados al mantenimiento de la producción de toxinas. La principal predicción es que la abundancia y dominio de organismos tóxicos será mayor en los embalses que en aguas corrientes. Para confirmar dicha hipótesis se estudió la abundancia de poblaciones tóxicas, la transcripción de genes *mcy* y la diversidad del CMA *in situ* en el embalse de Salto Grande, río Uruguay (Capítulo 3).

Finalmente, se evalúan los efectos de la temperatura y salinidad en el CMA. La hipótesis respecto a los efectos de la salinidad es que altas concentraciones de sal afectan el metabolismo celular, alterando las tasas de respiración y fotosíntesis, así como también la permeabilidad de las membranas celulares. Por tanto, altas salinidades afectan también el

metabolismo de toxinas. Como predicción se encontrará menor transcripción de genes *mcy* en muestras con salinidad mayores a 0. Para confirmar dicha hipótesis se realizaron experimentos controlados de laboratorio utilizando comunidades naturales de organismos del CMA y se evaluó su respuesta a nivel genético frente a variaciones de salinidad. La hipótesis en relación con la temperatura es que las poblaciones tóxicas tienen mayores temperaturas óptimas de crecimiento para contrarrestar los mayores gastos metabólicos de producción de toxinas. Esto llevará a que a temperaturas mayores haya una dominancia de poblaciones con genotipos tóxicos. Por el contrario, a temperaturas menores se favorecerán las poblaciones con menores necesidades energéticas y por lo tanto con genotipo no tóxico (Capítulo 4).

Objetivo general

Conocer las respuestas de poblaciones tóxicas y no tóxicas de CMA a cambios en las condiciones ambientales y aportar al conocimiento acerca de las situaciones en las que la producción de microcistinas es más importante.

Objetivos específicos

- 1) Conocer qué condiciones ambientales favorecen la proliferación de poblaciones tóxicas del CMA en el gradiente río Uruguay-Río de la Plata.
- 2) Evaluar si la capacidad de estos organismos para prosperar en una amplia gama de ambientes se basa en la existencia de genotipos adaptados a diferentes condiciones ambientales.
- 3) Conocer la influencia del embalsamiento del agua sobre la toxicidad, la distribución y estructura comunitaria del CMA.
- 4) Evaluar el efecto de la temperatura y la salinidad sobre la dinámica de genotipos tóxicos, su toxicidad (concentración y variantes de microcistinas) y diversidad mediante una aproximación experimental.

Estructura de la tesis

En base a lo mencionado previamente, las principales preguntas a responder en esta tesis se centran en conocer cuáles son las condiciones ambientales que favorecen o no la proliferación de las poblaciones con genotipos tóxicos del CMA y si estas variables ambientales modulan su estructura comunitaria y diversidad genética, así como también la producción de toxinas. Para ello, se combinaron distintas aproximaciones incluyendo estudios de campo y experimentos de laboratorio, y se utilizó una diversidad de métodos para cuantificar distintos aspectos biológicos del CMA (**Figura 5**). Los estudios de campo se realizaron en el río Uruguay y en el Río de la Plata y luego se hizo foco en la zona del embalse de Salto Grande. Estos ecosistemas fueron seleccionados por constituir un gradiente ambiental que incluye desde condiciones continentales dulceacuícolas (río Uruguay) hasta el inicio de la zona marina (Río de la Plata). En base a los resultados obtenidos de los estudios de campo se realizaron experimentos de laboratorio en condiciones controladas para evaluar el efecto de diferentes salinidades y temperaturas sobre la dinámica del CMA. Los distintos resultados se presentan en cuatro capítulos interconectados, donde cada capítulo genera nuevas hipótesis a ser evaluadas en el siguiente (**Figura 5**).

Capítulos	Escala espacial y temporal	Variable de respuesta	Método de análisis	Variable explicativa
Capítulo 1	Gradiente regional Un año	Abundancia de genotipos tóxicos	qPCR de <i>mcyB</i> , <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> y <i>mcyJ</i>	Ambiente Biológicas
Capítulo 2	Gradiente regional Un año	Diversidad de genotipos tóxicos	qPCR-HRMA de <i>mcyJ</i>	Ambiente
Capítulo 3	Gradiente local Verano-Invierno	Abundancia de genotipos tóxicos Expresión génica Diversidad de genotipos tóxicos Estructura comunitaria del CMA	qPCR de <i>mcyB</i> , <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> y <i>mcyJ</i> RT y qPCR de <i>mcyB</i> , <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> y <i>mcyJ</i> qPCR-HRMA de <i>mcyJ</i> Secuenciación masiva de PC-IGS	Ambiente Biológicas
Capítulo 4	Local Experimento duración 10 días	Abundancia de genotipos tóxicos Expresión génica Diversidad de genotipos tóxicos Producción de microcistinas (MC)	qPCR de <i>mcyE</i> RT y qPCR de <i>mcyE</i> y <i>mcyH</i> qPCR-HRMA de <i>mcyJ</i> LC-MS para variantes MC-LR, MC-RR, MC-WR y MC-YR	Salinidad Temperatura

Figura 5. Esquema de la estructura de la Tesis, división de los capítulos, escala espacial y temporal, variables de respuesta estudiadas y su método de análisis, y las variables explicativas utilizadas en cada capítulo.

Capítulo 1

Dinámica espacio-temporal de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el gradiente ambiental río Uruguay-Río de la Plata

1.1. Resumen

Las especies pertenecientes al CMA son las que forman floraciones más frecuentes en todo el mundo. Dichas floraciones están compuestas por poblaciones con genotipo tóxico y no tóxico y las condiciones ambientales que favorecen el dominio de los genotipos tóxicos siguen siendo un tema de debate. En este estudio, se evaluó la distribución de poblaciones con genotipo tóxicos del CMA durante un año, abarcando las cuatro estaciones del año y un gradiente ambiental de 800 km de longitud, desde un embalse de agua dulce eutrófico en el río Uruguay hasta agua marina en el límite exterior del Río de la Plata. Se determinó la abundancia de cuatro genes *mcy*: *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ* por qPCR, que se empleó como *proxy* de la abundancia de genotipos tóxicos del CMA. Todos los genes *mcy* se detectaron en todos meses y en todos los sitios de muestreo, presentando mayor abundancia en el embalse de Salto Grande (agua dulce) en verano y disminuyendo hacia los sitios del Río de la Plata (agua estuarina). De acuerdo con los modelos de regresión lineal generalizados (GLM) y los modelos de bosques aleatorios (*Random Forest*), la temperatura y la conductividad fueron las variables más relevantes en explicar la distribución de la abundancia de genotipos tóxicos del CMA. Esto sugiere que, aunque los genotipos tóxicos de CMA crecen de manera óptima en agua dulce, pueden tolerar condiciones de alta salinidad como ser aguas estuarinas y marinas. Hasta el momento, este es el primer estudio que aborda varios genes *mcy* en un amplio gradiente que incluye una gama de diferentes condiciones ambientales.

1.2. Introducción

Identificar cuáles son los mecanismos que favorecen la proliferación de genotipos tóxicos del CMA es fundamental para la evaluación y manejo de la calidad del agua. Si bien varios estudios han abordado la influencia de factores ambientales sobre la proliferación de cianobacterias y la producción de toxinas (Yoshida *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010; Joung *et al.*, 2011; Te & Gin, 2011; Guedes *et al.*, 2014), no existe aún evidencia concluyente sobre qué induce la producción de toxinas y su dilucidación sigue siendo un desafío.

Para entender los mecanismos que modulan la presencia y abundancia de poblaciones de cianobacterias tóxicas en los ecosistemas acuáticos es fundamental discriminar entre poblaciones tóxicas y no tóxicas. Como se mencionó anteriormente, los métodos clásicos empleados para el monitoreo de floraciones de cianobacterias no permiten diferenciar poblaciones tóxicas de no tóxicas (Kurmayer *et al.*, 2002). Por lo tanto, es necesario implementar nuevas metodologías para complementar y mejorar las existentes, considerando la importancia de que estos métodos sean rápidos, sensibles y confiables. Los métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) son comúnmente utilizados para detectar genes de las enzimas responsables de la síntesis de toxinas. La técnica PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) se ha aplicado con éxito para cuantificar genotipos de cianobacterias potencialmente tóxicos en poblaciones naturales (Kurmayer *et al.*, 2003; Kurmayer & Kutzenberger, 2003; Vaitomaa *et al.*, 2003; Rinta-Kanto & Wilhelm, 2006; Yoshida *et al.*, 2007). Los genes *mcy* son ampliamente empleados para detectar, diferenciar e identificar cianobacterias potencialmente productoras de microcistinas por qPCR con fines de investigación (Kurmayer *et al.*, 2003; Vaitomaa *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2006; Sipari *et al.*, 2010). La presencia y abundancia de al menos un gen *mcy* es utilizada como proxy de la presencia y abundancia de genotipos potencialmente tóxicos (genotipo tóxico).

Varios estudios de campo han abordado la relación entre los genes *mcy* y las variables ambientales. Por ejemplo, se han reportado relaciones positivas entre el nitrógeno y/o fósforo total y la abundancia de genes *mcy* (ej: *mcyA*, *mcyB*, *mcyE*, *mcyJ*) (Yoshida *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010; Joung *et al.*, 2011; Te & Gin, 2011; Guedes *et al.*, 2014), mientras que otros autores reportan relaciones negativas (Rinta-Kanto *et al.*, 2009). Se ha demostrado

que la abundancia de genes *mcyD* y *mcyJ* aumenta al aumentar la temperatura del agua (de 10 a 30 °C) (Davis *et al.*, 2009; Joung *et al.*, 2011), aunque en algunos estudios no se encontró efecto de la temperatura sobre la abundancia de dichos genes (Rinta-Kanto *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Te & Gin, 2011; Guedes *et al.*, 2014). Además, se ha reportado una relación positiva entre algunos genes *mcy* y la turbidez (ej: *mcyE*, *mcyB* y *mcyJ*) (Xu *et al.*, 2010; Joung *et al.*, 2011; Te & Gin, 2011). Por otro lado, estudios basados en cultivos demostraron la dominancia de genotipos tóxicos (abundancia de *mcyB*) bajo diferentes intensidades de luz (35 y 120 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Lei *et al.*, 2015). Tonk *et al.* (2007) reportaron que la salinidad es una variable ambiental que afecta la toxicidad de las especies del CMA, mediante ensayos experimentales demostraron que la cuota de microcistina por célula disminuye a salinidades superiores a 10 y propusieron que la presencia de genotipos tóxicos y la producción de toxinas se verían afectadas negativamente por condiciones de estrés, como la alta salinidad (Tonk *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios de campo no encontraron asociación entre la salinidad (medida como conductividad) y la abundancia del gen *mcyE* (Te & Gin, 2011).

Existe gran cantidad de estudios que evalúan la influencia de las variables ambientales sobre el dominio de poblaciones tóxicas en ecosistemas de agua dulce, sin embargo, su rol específico e influencia aún se desconocen. La mayoría de los estudios que abordan la abundancia de poblaciones tóxicas a través de la cuantificación de genotipos tóxicos por qPCR generalmente evalúan solo uno o dos genes *mcy*, esto conlleva a que no se detecte toda la posible variabilidad genética debido al sesgo de los *primers*. Por lo tanto, las respuestas evaluadas a través de un solo gen *mcy* pueden estar sesgadas a las poblaciones portadoras de la variante genética detectada con los *primers*, y esto podría explicar algunos hallazgos contradictorios (Rinta-Kanto *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Te & Gin, 2011; Ngwa *et al.*, 2014).

Con el fin de generar conocimiento acerca de las condiciones ambientales que promueven la proliferación de poblaciones tóxicas, se estudió la abundancia y distribución de poblaciones del CMA portadoras de genotipos tóxicos en el sistema río Uruguay-Río de la Plata. Esto se realizó utilizando una aproximación basada en PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR). Este análisis fue acompañado de la medición de variables ambientales meteorológicas, limnológicas, oceanográficas y biológicas incluyendo las comunidades de fitoplancton. De esta manera, fue posible identificar los principales mecanismos

condicionantes de la abundancia de poblaciones tóxicas en estos ecosistemas de gran importancia para el país.

1.3. Objetivo

El objetivo de este capítulo es conocer qué condiciones ambientales favorecen la proliferación de poblaciones tóxicas del CMA en el gradiente río Uruguay-Río de la Plata.

1.4. Estrategia de investigación

Para la cuantificación de cianobacterias productoras de microcistinas se utilizó la técnica molecular PCR en tiempo real (qPCR) de cuatro genes *mcy* involucrados en la síntesis de microcistinas utilizando *primers* específicos. La técnica se puso a punto con cultivos de laboratorio que luego fue ajustada para la amplificación en muestras naturales de agua. Se realizaron campañas de muestreo bimensuales durante un año en seis sitios, cubriendo el gradiente ambiental río Uruguay-Río de la Plata. Se tomaron muestras de agua para extracción de ADN y posterior cuantificación por qPCR y se midieron variables ambientales *in situ*. La abundancia de genotipos tóxicos se analizó en el contexto ambiental, teniendo en cuenta variables como temperatura, salinidad, turbidez, concentración de nutrientes, intensidad del viento, entre otras. De esta forma, se estudio la dinámica de los genotipos tóxicos en el río Uruguay-Río de la Plata y las variables ambientales implicadas (**Figura 1.1**).

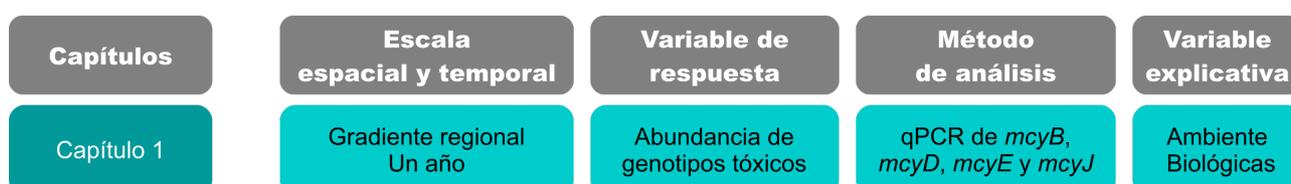


Figura 1.1. Esquema de trabajo indicando la escala espacial y temporal, las variables de respuesta estudiadas y su método de análisis, y las variables explicativas.

1.5. Metodología

1.5.1. Sitio de estudio

El sitio de estudio cubrió una extensión de ~800 km, desde el embalse de Salto Grande en el río Uruguay (latitud 31 ° 11'S, longitud 57 ° 52'O) a Punta del Este (latitud 34 ° 57'S, longitud 55 ° 02'O) en el extremo marino del estuario del Río de la Plata. Ambos ecosistemas acuáticos (río Uruguay y Río de la Plata) proveen de diversos servicios ecosistémicos y tiene valor para la conservación, incluyendo pesca artesanal e industrial, transporte, recreación y turismo, siendo zona de cría de peces y hábitat de mamíferos y aves marinas. Sin embargo, algunos de los usos resultan conflictivos debido a que estos ecosistemas son receptores de desechos crudos, efluentes industriales y domésticos, y de residuos de dragado. Además reciben la escorrentía de vastas cuencas agrícolas. Como resultado de las actividades antrópicas en el estuario y en sus tributarios el funcionamiento ecosistémico se ha visto modificado, afectando los servicios brindados.

1.5.2. Muestreo

Se realizaron seis campañas de muestreo entre el 20 de enero del año 2013 y el 30 de marzo del año 2014 cubriendo las cuatro estaciones del año (**Tabla 1.1**). Se tomaron muestras de agua en seis sitios a lo largo del río Uruguay y Río de la Plata (**Tabla 1.2**, **Figura 1.2**). En cada uno de estos sitios se midieron variables *in situ* y se tomaron muestras en dos estaciones correspondientes a aguas abiertas (AA) y costa (CO). En el embalse de Salto Grande, AA y CO correspondieron a los brazos del embalse generados por los ríos Gualeguaycito e Itapebí, respectivamente (**Tabla 1.2**). En cada estación de muestreo (12) se midió la dirección e intensidad del viento (m/s) y la temperatura del aire (°C). Utilizando un multiparámetro se registraron en superficie y fondo la temperatura (°C), pH, conductividad (mS/cm), oxígeno disuelto (mg/L) y turbidez (NTU). Se tomaron muestras de agua subsuperficial con botellas de polipropileno estériles para nutrientes, comunidades biológicas y extracción de ADN. Se utilizaron redes de distintos poros para el muestreo de organismos de fitoplancton de mayor tamaño. Se determinó la presencia o ausencia de colonias del CMA en el copo de la red de poro de 115 µm arrastrada por ~2 minutos. Se calculó el biovolumen de fitoplancton, cianobacterias y del CMA mediante microscopía según Kruk *et al.* (2017). La concentración de clorofila-a (ug/L) se determinó

mediante extracción con etanol y medida por absorbancia (por más detalle Kruk *et al.* (2017)). El nitrógeno total (mg/L) se estimó por combustión y oxidación a dióxido nitroso y posterior detección por quimioluminiscencia, descrito por la norma ISO/TR 11905-2:1997. El fósforo total ($\mu\text{g/L}$) se analizó utilizando inyección de flujo (FIA, por su sigla en inglés), según el método del fabricante del equipo Lachat, QuikChem Method 31-115-01-3-D, que convierte variantes de las formas de fósforo a ortofosfato mediante ácido sulfúrico, persulfato y digestión UV. La variante de microcistina MC-LR fue cuantificada mediante HPLC. Tanto el fósforo, el nitrógeno total como la concentración de MC-LR fueron realizados en las instalaciones del LATU.

Tabla 1.1. Fechas en las que fueron realizadas las distintas campañas de muestreo.

Campaña	Fechas de muestreo	Estación del año
1	20 al 27 de enero 2013	Verano
2	16 al 24 de marzo 2013	Verano - Otoño
3	22 al 30 de junio 2013	Invierno
4	5 al 13 de octubre 2013	Primavera
5	30 de noviembre al 8 de diciembre 2013	Verano
6	23 al 30 de marzo 2014	Verano-Otoño

Tabla 1.2. Nombre, sitio de referencia y coordenadas correspondientes a las estaciones muestreadas. RU: río Uruguay, RdIP: Río de la Plata, AA: aguas abiertas, CO: costa.

Localidad	Estación	Sitio de referencia	Latitud	Longitud	Distancia Costa (km)
Salto (RU)	AA	Brazo Gualaguaito	31° 12'	57° 59'	3,7
Salto (RU)	CO	Brazo Itapebi	31° 11'	57° 52'	0,0
Fray Bentos (RU)	AA	Frente a Las Cañas	33° 10'	58° 23'	2,4
Fray Bentos (RU)	CO	Al S de la PNN	33° 10'	58° 21'	0,0
Carmelo (RdIP)	AA	Frente a Carmelo, Beril de canal	34° 00'	58°22'	5,8
Carmelo (RdIP)	CO	Entre Punta Piedras y muelle	34° 00'	58° 17'	0,0
Colonia (RdIP)	AA	Canal del medio NW de isla San Gabriel	34° 28'	57° 55'	5,9
Colonia (RdIP)	CO	Ensenada de la Colonia	34° 27'	57° 51'	0,0
Montevideo (RdIP)	AA	Al SE de Buen Viaje	34° 58'	56° 05'	7,7
Montevideo (RdIP)	CO	Playa Pocitos	34° 55'	56° 08'	0,0
Punta del Este (RdIP)	AA	W de Punta Britos Isla Gorriti	34° 57'	55° 02'	6,4
Punta del Este (RdIP)	CO	Playa Mansa	34° 55'	54° 58'	5

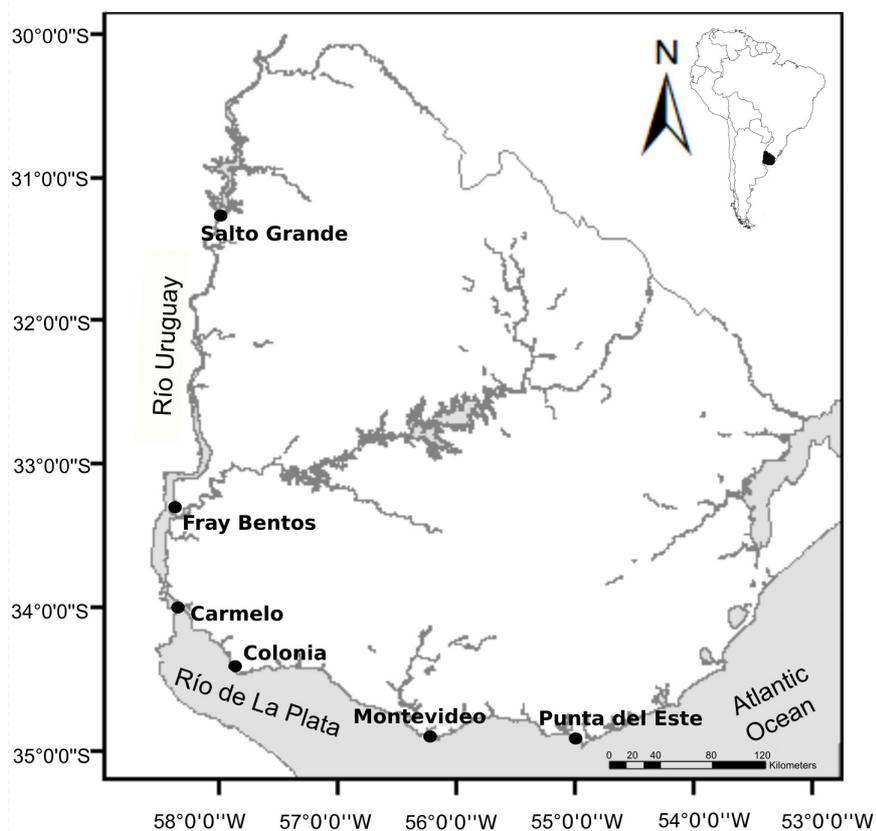


Figura 1.2. Mapa de los sectores del río Uruguay y Río de La Plata que fueron evaluados. Los puntos negros refieren a las estaciones de muestreo correspondientes a costa (CO) y aguas abiertas (AA).

1.5.3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de muestras ambientales se ajustó el método descrito por Zhou *et al.* (1996) (Martínez de la Escalera *et al.*, 2014). Para ello, 250-300 mL de agua se filtraron a través de filtros estériles de policarbonato de 0,22 μm de tamaño de poro (Millipore). Se adicionó *buffer* de extracción conteniendo 1% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), EDTA (100 mM) y proteinasa K (10 mg/ml) a cada tubo conteniendo la muestra y se incubaron a 37 °C durante 30 min con agitación. Luego, se añadió dodecil sulfato de sodio (SDS 20%) y la mezcla se incubó a 65 °C durante 2 hs. Una vez finalizada la incubación, los ácidos nucleicos se extrajeron utilizando una solución de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 (tres veces). Después de recuperar la fase acuosa que contiene al ADN, el mismo se precipitó con isopropanol a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó y el *pellet* obtenido se lavó con etanol al 70 % (v/v) frío, se secó y se

resuspendió en agua bidestilada estéril toda la noche a 4 °C. Una vez extraído el ADN y confirmada su calidad por espectrofotometría se almacenó a -20 °C hasta su empleo. Por más detalle en el protocolo de extracción de ADN ver Apéndice 1.

1.5.4. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Las condiciones de la técnica qPCR se ajustaron para las muestras obtenidas utilizando *primers* específicos descritos en la literatura (**Tabla 1.3**, Kaebernick *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2010; Sipari *et al.*, 2010; Hautala *et al.*, 2013). Para las reacciones se usó el kit Power SYBR Green PCR (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20 µl: 9,5 µl de agua, 0,5µl de BSA (30 mg/ml, del inglés: *bovine serum albumin*, albumina de suero bovino), 7,76 µl de mix (Power SYBR Green PCR), 0,12 µl de cada primer (50 µM) y 2 µl de ADN de la muestra. El termociclador utilizado para los ensayos de qPCR fue Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO RAD) y las condiciones de ciclado fueron 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C. Al final se realizó la curva de *melting* desde 65 °C a 95 °C, en incrementos de 1 °C cada 4 seg para confirmar la especificidad del fragmento amplificado. Se realizó la secuenciación de los amplicones para confirmar la identidad de los mismos (servicio Instituto Paesteur).

Tabla 1.3. *Primers* empleados para amplificar fragmentos de genes para la síntesis de microcistinas mediante qPCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)	Tamaño esperado (pb)	Referencia
mcyJ_F	TAGCTAAAGCAGGGTTATCG	51,7	242	Kim <i>et al.</i> , 2010
mcyJ_R	TCTTACTATTAACCCGCAGC	51,9	242	Kim <i>et al.</i> , 2010
mcyD_F	GGTTCGCCTGGTCAAAGTAA	55,2	297	Kaebernick 2000
mcyD_R	CCTCGCTAAAGAAGGGTTGA	54,4	297	Kaebernick 2000
mcyB_F	AGATTTTAATCCACAAGAAGCTTTATTAGC	54,4	104	Hautala <i>et al.</i> , 2013
mcyB_R	CTGTTGCCTCCTAGTTCAAAAATGACT	57,5	104	Hautala <i>et al.</i> , 2013
mcyE_F	AAGCAAAGTCTCCCGGTATC	57,6	120	Sipari <i>et al.</i> , 2010
mcyE_R	CAATGGGAGCATAACGAGTCAA	55,1	120	Sipari <i>et al.</i> , 2010

1.5.5. Curva de calibración y cuantificación del número de copias del gen

La eficiencia de amplificación de los genes fue determinada empleando vectores

(plásmidos) que contienen los fragmentos de cada gen clonado. Para la clonación de los genes *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ* se utilizó una muestra conocida del embalse de Baygorria dominada por una única mofro-especie del género *Microcystis*, el vector TOPO 2.1 (TOPO-TA cloning kit, Invitrogen) y células competentes *Escherichia coli* (por más detalle ver Apéndice 1). Para la cuantificación absoluta del número de copias de cada gen en las muestras se realizaron diluciones seriadas de 1/10 a 1/100000 de los genes clonados, se realizó el ajuste de la curva y se determinó el número de copias por microlitro. Una vez conocido el número de copias génicas que contenía cada reacción de PCR se calculó el número original de copias en la muestra.

1.5.6. Análisis de datos

Se utilizó la correlación bivariada de Spearman (r_s) para identificar a las variables ambientales que se correlacionan con la abundancia de genotipos tóxicos (genes *mcy*). El test no paramétrico de medianas (Kruskal-Wallis) fue aplicado para evaluar diferencias en la abundancia de genes *mcy* en presencia o ausencia de colonias de CMA en la red de 115 μm . Para evaluar la relación entre las variables ambientales y la abundancia de genotipos tóxicos (genes *mcy*) se aplicaron modelos lineales generalizados (GLM) con distribución gamma y función *link* log. En todos los casos las variables ambientales utilizadas fueron: nutrientes totales (nitrógeno total; NT y fósforo total; FT), intensidad del viento (viento), temperatura del agua (Temp), turbidez (Tur) y conductividad (K). Los modelos fueron construidos usando *backward selection* y fueron comparados en base a el criterio de Akaike (AIC) (Burnham & Anderson, 2002). Para cada modelo GLM se calculó el pseudo- R^2 de la siguiente manera: (devianza nula*devianza residual)/devianza nula; donde la devianza nula corresponde al modelo nulo y la devianza residual corresponde a la devianza estimada por el modelo (Veall & Zimmermann, 1996). Se empleó una técnica de aprendizaje automático, *Random Forest* (RF, Cutler *et al.*, 2007) para determinar cuales eran las variables ambientales que explican la abundancia de genotipos tóxicos. Para ello, la abundancia de los genes *mcy* fue clasificada en dos categorías: 1) abundancia baja (menos que 999 copias/ml), este nivel de abundancia no presenta riesgo para la salud humana (Falconer *et al.*, 1999; World Health Organization, 2004) y 2) abundancia alta (mas que 1000 copias/ml), valores que son registrado durante una floración de cianobacterias y presentan riesgo para la salud humana (Falconer *et al.*, 1999; World Health Organization, 2004). Se emplearon las mismas variables independientes que en los GLM, el porcentaje de

variabilidad explicada y la importancia de cada variable (Índice de Ginni) fue representado en un gráfico (ej: Kruk & Segura, 2012). Se evaluó la exactitud de los modelos RF mediante el análisis de la tasa de mal clasificación en 10 validaciones cruzadas.

Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico R versión 3.0.2 utilizando los paquetes {randomForest} y {fBasics} (Liaw & Wiener, 2002; R Core Team, 2013; Wuertz *et al.*, 2017).

1.6. Resultados

1.6.1. Caracterización ambiental

- Variables meteorológicas

La intensidad del viento presentó un gradiente temporal, variando entre situaciones de calma (0 m/s) y brisa fresca (9 m/s) según la escala de Beaufour (**Figura 1.3**). La mayor intensidad del viento se observó en Punta del Este durante invierno y primavera (de Junio a Octubre).

- Variables fisicoquímicas

La variable que presentó mayor estacionalidad fue la temperatura superficial del agua (**Figura 1.3**). La misma varió desde 11 a 34 °C, presentando los mayores valores en el embalse de Salto Grande en los meses de verano (Enero y Marzo) y los menores valores en la zona marina del Río de la Plata durante invierno y primavera (de Junio a Octubre) (**Figura 1.3**). El gradiente espacial estuvo reflejado en la conductividad y turbidez (**Figura 1.3**). La conductividad presentó un mínimo de 0,023 mS/cm (sistemas de agua dulce: Salto, Fray Bentos, Carmelo y Colonia) y un máximo de 51 mS/cm (Montevideo y Punta del Este) (**Figura 1.3**). Montevideo presentó la mayor variación estacional de conductividad (9-51 mS/cm) (**Figura 1.3**). La turbidez varió entre 0 y 187 NTU con mayores valores en las estaciones localizadas en la intersección entre el río Uruguay y el estuario Río de la Plata (Carmelo y Colonia) (**Figura 1.3**). Las mayores concentraciones de nutrientes fueron encontradas en el embalse de Salto Grande y Montevideo (FT = 60 µg/L, NT = 0,9 mg/L).

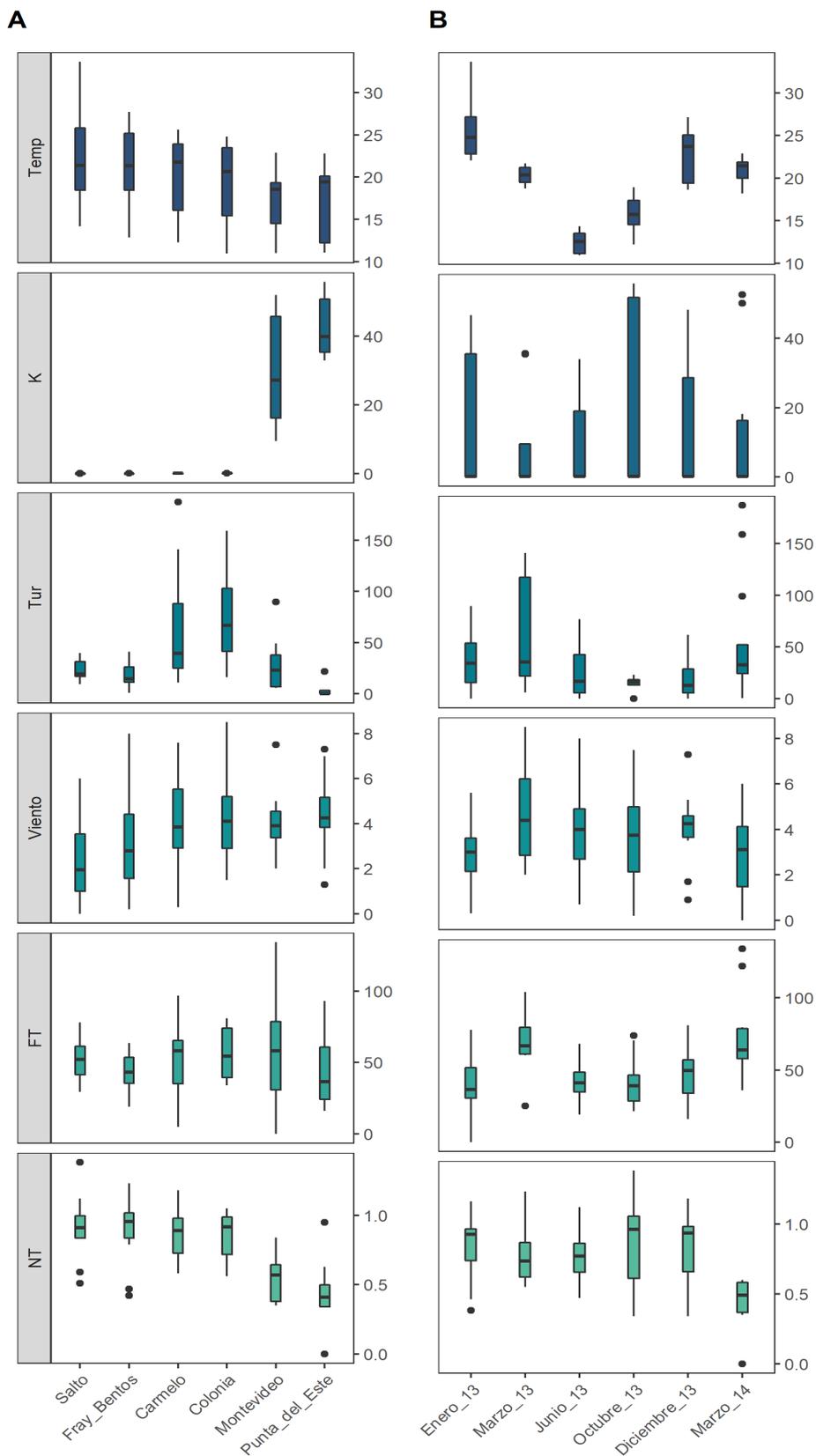


Figura 1.3. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la variación espacial (A) y temporal (B) de las variables ambientales: Temp (temperatura, °C), K (conductividad, ms/cm), Tur (turbidez, NTU), Viento (intensidad del viento, m/s), FT (fósforo total, µg/L) y NT (nitrógeno total, mg/L).

- Variables biológicas

Los valores de clorofila-a fueron altos en el embalse de Salto Grande y en el estuario Río de la Plata (Punta del Este), mientras que en los sitios localizados en el medio del gradiente (Carmelo y Colonia) presentaron bajos valores de clorofila-a (**Tabla 1.4**). Un patrón similar se observó para el biovolumen de fitoplancton (**Tabla 1.4**). El biovolumen de cianobacterias fue máximo en el embalse de Salto Grande decreciendo hacia los sitios del estuario (Montevideo y Punta del Este; **Tabla 1.4**). Las especies del CMA fueron las cianobacterias dominantes en términos de biovolumen. Se registraron floraciones de organismos del CMA tanto en verano (temperatura = 20 - 33 °C) como en invierno (temperatura = 11 - 14 °C). Además, la presencia de colonias del CMA en la red de 115 µm fue detectada a lo largo de todo el gradiente y en la mayoría de las fechas de muestreo.

- Toxinas

La microcistina-LR (MC-LR) solamente fue detectada durante los meses de verano en el embalse de Salto Grande y en Colonia (**Tabla 1.4**).

Tabla 1.4. Valores medios y rangos de variables biológicas en cada sitio durante el año de muestreo: biovolumen de fitoplancton total (BV_Fito), biovolumen de cianobacterias (BV_Ciano), clorofila-a (Clo-a) y microcistina-LR (MC-LR). BLD = por debajo del límite de detección.

Sitio	BV_Fito (mm ³ /L)	BV_Ciano (mm ³ /L)	Clo-a (µg/L)	MC-LR (µg/L)
Salto Grande	361,4 (0,2-2188)	457 (BLD-2175)	7,9 (0,9-29,9)	7,1 (0,4-15)
Fray Bentos	0,5 (0,1-3,4)	0,06 (BLD-0,5)	0,6 (0,1-2,1)	BLD
Carmelo	1,4 (BLD-3,8)	0,4 (BLD-2,9)	0,7 (0,3-1,9)	BLD
Colonia	4,7 (BLD-42,6)	0,8 (BLD-9,1)	0,8 (0,1-1,4)	0,2 (BLD-0,3)
Montevideo	2,4 (0,1-6,7)	1,4X10 ⁻⁴ (BLD-8,5X10 ⁻⁴)	1,2 (0,3-1,8)	BLD
Punta del Este	19,8 (0,6-141,4)	2,8X10 ⁻⁴ (BLD-0,0029)	2,4 (0,3-7,9)	BLD

1.6.2. Variabilidad espacial y temporal de los genes *mcy*

Se detectó la presencia de genes *mcy* en todas las fechas y estaciones de muestreo (**Figura 1.4**). Las mayores abundancias se registraron en la zona del embalse de Salto Grande y Fray Bentos, disminuyendo notoriamente hacia las estaciones estuarinas (Montevideo y Punta del Este). Las abundancias individuales de los genes analizados (*mcyB*, *mcyE*, *mcyD* y *mcyJ*) presentaron el mismo patrón espacial, máximos en el embalse disminuyendo hacia el estuario (**Figura 1.5 A**). La distribución temporal de la abundancia fue similar en los genes *mcyB*, *mcyE* y *mcyJ*, siendo máxima en verano (**Figura 1.5 B**). Sin embargo, la abundancia del gen *mcyD* presentó un patrón de distribución temporal opuesta (valores máximos en invierno) a los otros genes analizados (**Figura 1.5 B**).

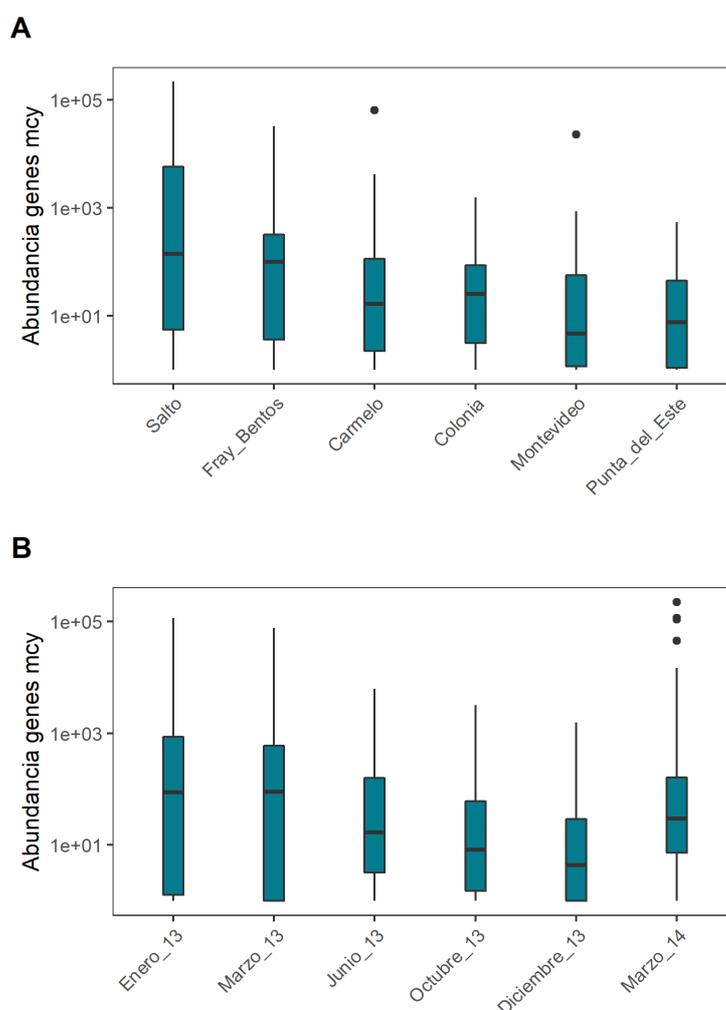


Figura 1.4. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la variabilidad espacial (**A**) y temporal (**B**) del logaritmo en base 10 de abundancia máxima de los gen *mcy* (copias/ml).

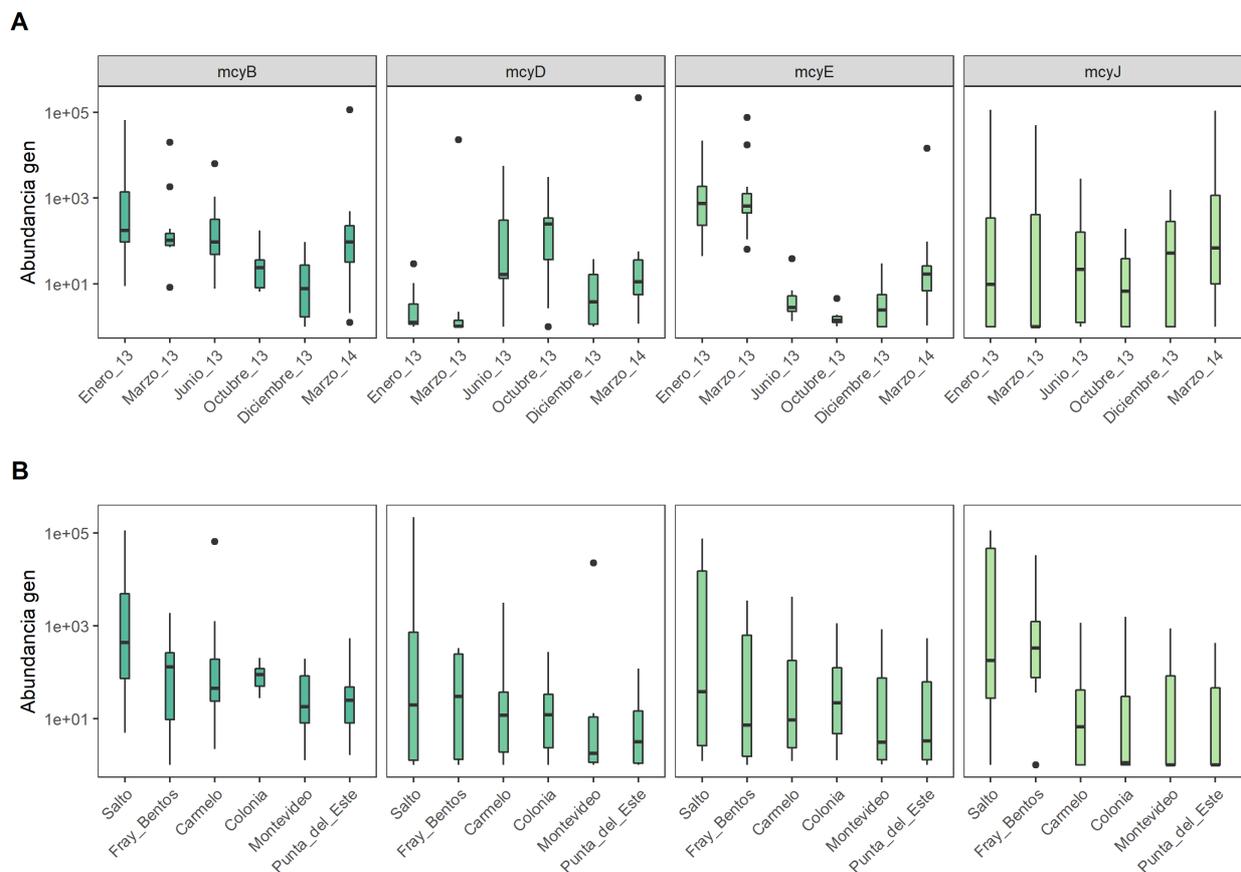


Figura 1.5. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la variabilidad espacial (A) y temporal (B) del logaritmo en base 10 de abundancia de cada gen *mcy* (copias/ml).

1.6.3. Relación entre genotipos tóxicos y variables ambientales

Se encontraron diferentes relaciones entre los cuatro genes y las variables ambientales (**Tabla 1.5**). La intensidad del viento se asoció negativamente con la abundancia de los genes *mcyD* y *mcyJ*. La temperatura y turbidez se correlacionaron positivamente con la abundancia del gen *mcyE* y negativamente con el *mcyD*, mientras que la conductividad se correlacionó negativamente con todos los genes *mcy* analizados. La concentración de nutrientes no presentó asociación alguna con la abundancia de genotipos tóxicos.

Tabla 1.5. Valores del coeficiente de correlación de Spearman (r_s) entre la abundancia de cada gen *mcy* (copias/ml) y las variables ambientales: temperatura (°C), conductividad (mS/cm), turbidez (NTU), intensidad del viento (m/s), nitrógeno total (mg/L) y fósforo total (µg/L). Se presentan solo los valores que fueron significativos, $p < 0,05$.

	Temperatura (°C)	Conductividad (mS/cm)	Turbidez (NTU)	Intensidad del viento (m/s)	Nitrógeno total (mg/L)	Fósforo total (µg/L)
<i>mcyB</i>	-	-0,37	-	-	-	-
<i>mcyD</i>	-0,33	-0,28	-0,26	-0,27	-	-
<i>mcyE</i>	0,50	-0,25	0,41	-	-	-
<i>mcyJ</i>	-	-0,31	-	-0,23	-	-

Las variables seleccionadas en los modelos GLM fueron diferentes para cada gen *mcy* y la varianza explicada (pseudó R^2) varió entre 0,25 a 0,36 (**Tabla 1.6**). La conductividad afectó negativamente a la abundancia del gen *mcyB*, mientras que la temperatura tuvo un efecto positivo en la abundancia del gen *mcyE*. La abundancia del gen *mcyD* fue afectada positivamente por la conductividad y turbidez, y negativamente por la intensidad del viento y la temperatura. En relación a la abundancia del *mcyJ*, la conductividad, turbidez y FT tuvieron un efecto negativo, mientras que la temperatura la afectó positivamente.

Tabla 1.6. Resultados de los modelos de GLM para explicar la abundancia de genes *mcy* en base a seis variables ambientales: temperatura (°C), conductividad (mS/cm), turbidez (NTU), intensidad del viento (m/s), nitrógeno total (NT, mg/L) y fósforo total (FT, µg/L). Los valores de los coeficientes y el intercepto que se presentan son significativos, $p < 0,05$.

Genes	Variables ambientales/coeficientes						Parámetros	
	Temperatura	Conductividad	Turbidez	Intensidad del viento	NT	FT	Valor del intercepto	Pseudo R2
<i>mcyB</i>	-	-0,011	-	-	-	-	22,46	0,25
<i>mcyD</i>	-0,074	0,020	0,007	-0,1000	-	-	20,47	0,30
<i>mcyE</i>	0,100	-	-	-	-	-	22,60	0,36
<i>mcyJ</i>	0,047	-0,021	-0,006	-	-	-0,010	14,62	0,30

El análisis de *Random Forest* (RF) mostró una alta exactitud predictiva de las dos clases (alta/baja) de cada gen *mcy* (entre 81 y 93%, **Figura 1.6**). Según el resultado de RF, la importancia de las variables difiere según el gen *mcy* analizado. El mayor porcentaje de variabilidad para el gen *mcyB* esta dado principalmente por la conductividad (K), intensidad del viento (Viento) y temperatura del agua (Temp), mientras que los nutrientes (FT y NT) y la intensidad del viento (Viento) explican un alto porcentaje de la variabilidad del gen *mcyD*. La variabilidad del gen *mcyE* es explicada mayoritariamente por la temperatura del agua (Temp) y la conductividad (K). Finalmente, la abundancia del gen *mcyJ* estuvo principalmente relacionada con la conductividad (K) y la temperatura del agua (Temp) (**Figura 1.6**).

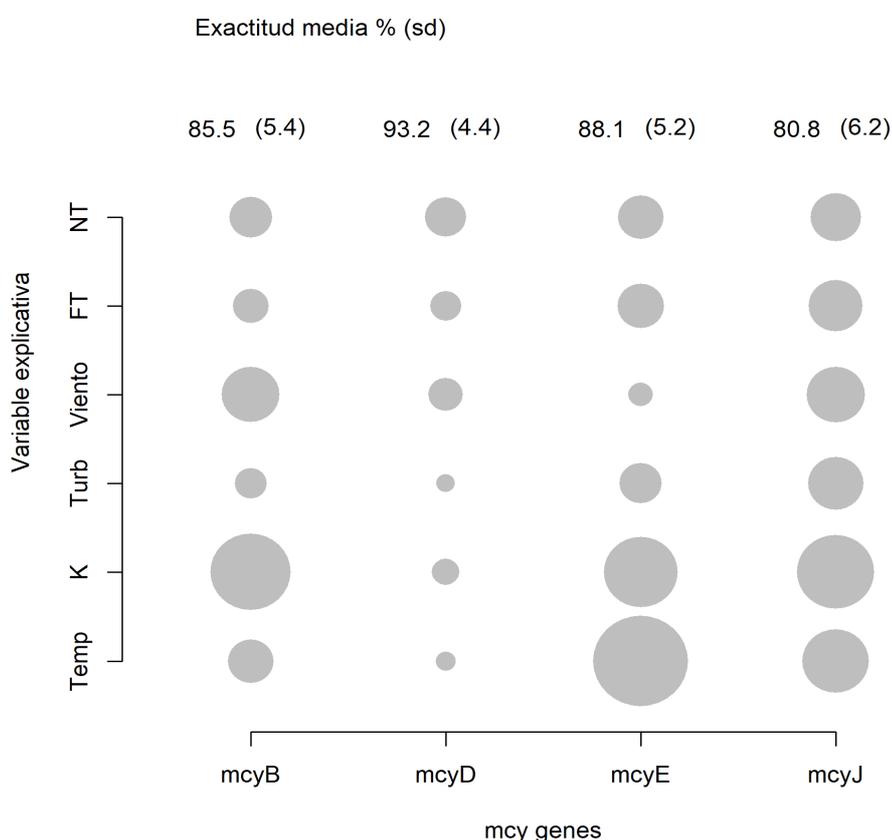


Figura 1.6. Gráfico de importancia de las variables ambientales en la predicción de las clases de abundancia de los genes *mcy* obtenidos del método *Random Forest*. La importancia de cada variable ambiental (evaluada a través del índice de Gini) para explicar la abundancia de cada gen *mcy* es proporcional al diámetro del círculo. Se evaluaron seis variables ambientales: temperatura del agua (Temp; °C), conductividad (K; mS/cm), turbidez (Turb, NTU), intensidad del viento (Viento; m/s), fósforo total (FT; µg/L) y nitrógeno total (NT; mg/L). Se muestra la exactitud promedio del modelo (%) y su desviación estándar (sd).

1.6.4. Relación entre genotipos tóxicos y otros indicadores del CMA

A excepción de los genes *mcyE* y *mcyD*, la abundancia de los demás genes *mcy* se correlacionó positiva y significativamente entre sí (**Tabla 1.7**). La abundancia de *mcyE* se correlacionó positivamente con los indicadores tradicionales de fitoplancton, como ser la clorofila-a, biovolumen total de fitoplancton y biovolumen de cianobacterias totales (**Tabla 1.7**). La abundancia de *mcyB* y *mcyJ* presentó una fuerte asociación positiva solo con el biovolumen de cianobacterias totales (**Tabla 1.7**). Por otro lado, la abundancia de los genes *mcyB* y *mcyE* fue significativamente mayor cuando los organismos del CMA fueron detectados en la red de 115 μm (Kruskal-Wallis, $H = 20$ y 25 respectivamente, $p < 0,05$) (**Figura 1.7**). Sin embargo, la abundancia de *mcyD* y *mcyJ* no presentó relación con la presencia de colonias del CMA en la red de 115 μm .

Tabla 1.7. Valores de correlación de Spearman (r_s) entre la abundancia de cada gen *mcy* (copias/ml) y entre la abundancia de genes y otros indicadores de cianobacterias potencialmente tóxicas: clorofila-a (Clo-a; $\mu\text{g/L}$), biovolumen de fitoplancton total (BV_Fito; mm^3/L), biovolumen de cianobacterias totales (BV_Ciano; mm^3/L) y biovolumen CMA (BV_CMA; mm^3/L). Solo se muestran valores significativos ($p < 0,05$).

	<i>mcyB</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyE</i>	Clo-a	BV_Fito	BV_Ciano	BV_CMA
<i>mcyB</i>				-	-	0,57	0,57
<i>mcyD</i>	0,28			-	-	-	-
<i>mcyE</i>	0,71	-		0,25	0,68	0,43	0,42
<i>mcyJ</i>	0,38	0,41	0,33	-	-	0,33	0,36

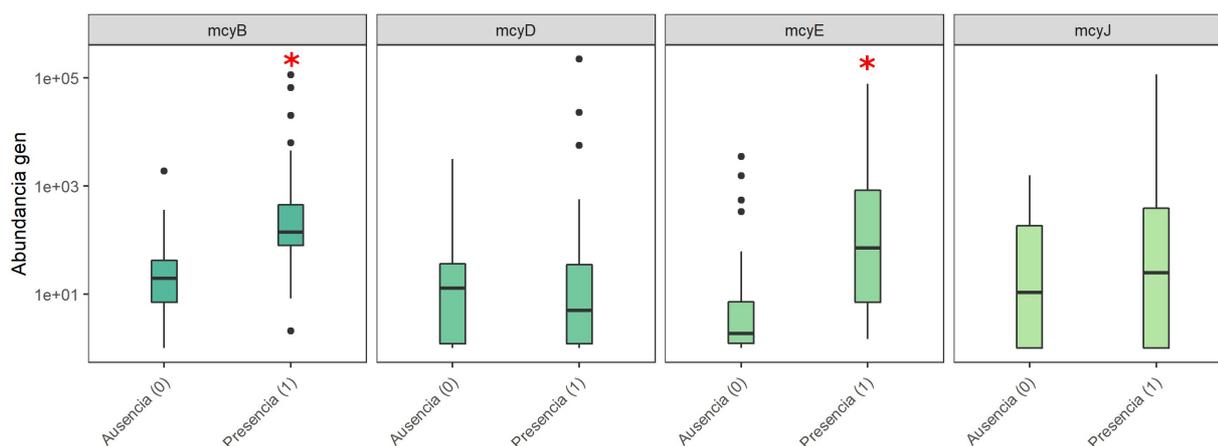


Figura 1.7. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la abundancia de genes *mcy* (copias/ml) relacionadas con la presencia (1) o ausencia (0) de colonias del CMA visibles en la red de 115 μ m. El asterisco rojo marca la diferencia significativa de la abundancia del gen *mcy* entre la ausencia y presencia de colonias visibles del CMA (test KW, $p < 0,05$).

1.7. Discusión

Los mecanismos responsables del control de poblaciones tóxicas del CMA no son bien comprendidos aún y la información sobre cuáles son las variables más relevantes para explicar su dinámica es contradictoria. Además, la mayoría de los estudios se centran en uno o pocos ecosistemas acuáticos y no incluyen un alto grado de variabilidad ambiental. En este trabajo, pionero a nivel local, se realizó un estudio de la variabilidad espacial y temporal de poblaciones tóxicas del CMA y su relación con las variables ambientales en un amplio gradiente, desde agua dulce (río Uruguay) a aguas estuarinas y marinas (Río de la Plata).

1.7.1. CMA y variables meteorológicas

Cuando se analizó el efecto de la intensidad del viento sobre la abundancia de células portadoras de genotipo tóxico, solo se encontraron correlaciones significativas y negativas para *mcyJ* y *mcyD*, lo que sugiere que las altas intensidades de viento dificultarían el crecimiento de poblaciones con genotipo tóxico. Se ha descrito que el viento puede impedir la formación de floraciones del CMA reduciendo su tasa de crecimiento debido a la mezcla de la columna de agua (Blottière *et al.*, 2014; Harke *et al.*, 2016). Sin embargo, el

efecto de la mezcla es aplicable a pequeños lagos poco profundos o lagunas (Visser *et al.*, 1996) y estaría limitado en aguas estuarinas debido a su gran área y volumen (Paerl, 2014). Esto podría explicar la baja contribución de esta variable explicativa en los modelos de RF.

1.7.2. CMA y temperatura

La abundancia de organismos tóxicos fue mayor en verano que en invierno, siguiendo el mismo patrón que la temperatura del agua. El rango de temperatura encontrado coincide con la temperatura óptima de crecimiento descrita para *Microcystis* spp. (cerca a 25 °C; Reynolds, 2006). En base a los resultados obtenidos con los modelos GLM y RF, la temperatura del agua sería uno de las principales variables ambientales que afectarían la abundancia de los genotipos tóxicos. Sin embargo, en base a las correlaciones de Spearman, solo las abundancias de *mcyD* y *mcyE* se relacionaron significativamente de forma opuesta con la temperatura del agua (Spearman, $p < 0,05$). En este sentido, nuestros hallazgos coinciden con los reportados por otros autores, los cuales no encuentran correlación significativa entre *mcyB* y la temperatura (Xu *et al.*, 2010; Guedes *et al.*, 2014). Por otro lado, no se encontró correlación significativa entre *mcyJ* y temperatura, en contraste con el trabajo de Joung *et al.* (2011), quienes encontraron que las temperaturas más altas promueven un rápido crecimiento de poblaciones tóxicas de *Microcystis* (evaluados como la abundancia del gen *mcyJ*) en comparación con genotipos no tóxicos. Davis *et al.* (2009), utilizando abundancias de genes *mcyD*, demostraron que la temperatura aumenta la tasa de crecimiento de genotipos tóxicos de *Microcystis*. En contraste, la abundancia del gen *mcyD* presentó una relación con la temperatura opuesta a la de los otros genes *mcy* analizados. Dado que los *primers* utilizados en este estudio fueron diseñados basándose en secuencias de cianobacterias productoras de microcistina de otros orígenes geográficos (diferentes latitudes) (Kaebernick *et al.*, 2000), una posible explicación de este comportamiento puede atribuirse a un sesgo impuesto por los *primers* de *mcyD*, que solo podrían estar detectando una variante genética o subpoblación de especies de CMA tóxicas que son capaces de crecer a baja temperatura. En un estudio similar realizado en cuatro lagos, Beversdorf *et al.* (2015) encontraron diferentes tendencias entre los genes *mcy* y las variables ambientales para cada lago, la abundancia de los diferentes genes presentó gran variabilidad temporal y se correlacionó con el aumento de la temperatura y los nutrientes en algunos casos. Por lo tanto, las tendencias positivas encontradas entre *mcyE* y *mcyJ* y la temperatura y la correlación negativa con la

conductividad obtenida en el presente trabajo, que comprende un alto rango de temperatura y condiciones de salinidad, son alentadoras y sugieren que ambas variables son relevantes para la dinámica de poblaciones tóxicas, al menos en ecosistemas acuáticos que involucran conexiones de ríos y estuarios.

1.7.3. CMA y salinidad

Se encontró que la principal variable que limitó la abundancia de genotipos tóxicos fue la salinidad (medida como conductividad). Se ha reportado que el estrés salino afecta las tasas de respiración, disminuye la tasa de fotosíntesis y altera la permeabilidad de las membranas celulares (Khomutov *et al.*, 1990; Sudhir & Murthy, 2004; Zhang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015). También se ha reportado que las especies de cianobacterias, y en particular las que pertenecen al CMA, son sensibles a ambientes salinos (Tonk *et al.*, 2007). Varios estudios han reportado que especies del CMA presentan un óptimo de crecimiento a salinidad 0, sin embargo toleran salinidades cercanas a 6 (salinidad estuarina) (Robson & Hamilton, 2003; Liu, 2006; Tonk *et al.*, 2007; Wangwibulkit *et al.*, 2008; Nasr *et al.*, 2012). En concordancia con estos estudios, en este trabajo la mayor abundancia de CMA se detectó en agua dulce (río Uruguay) disminuyendo hacia el estuario Río de la Plata (rango de salinidad 5-30). Además, los genes *mcy* mostraron una tendencia similar relacionada con el gradiente agua dulce-agua marina.

Aunque las poblaciones del CMA se describen como cianobacterias de agua dulce, la detección de colonias y genotipos tóxicos en aguas marinas podría atribuirse a su transporte desde el río Uruguay hacia el Río de la Plata. Hallazgos similares han sido reportados por Pinckney *et al.* (1997) para el estuario Neuse River (Carolina del Norte, EE.UU.), quienes encontraron una mayor abundancia y tasas de crecimiento de fitoplancton en períodos de baja salinidad, cuando el río desemboca en el estuario, implicando que las especies del CMA podrían sobrevivir pero no crecer en aguas estuarinas o marinas (Pinckney *et al.*, 1997; Lehman *et al.*, 2008).

1.7.4. CMA y turbidez

La turbidez se correlacionó negativamente con la abundancia del gen *mcyD* y positivamente con el gen *mcyE*. Además, la abundancia de *mcyE* se correlacionó

positivamente con el biovolumen del CMA, lo que sugiere que la turbidez observada podría ser una consecuencia de la alta biomasa del CMA. En concordancia con estos resultados, Te & Gin (2011) reportaron una correlación positiva entre el gen *mcyE* y la turbidez en un embalse tropical y sugirieron el uso de esta variable como un indicador de la biomasa de cianobacterias. Por otro lado, la correlación negativa entre el gen *mcyD* y la turbidez sería una consecuencia de que las mayores abundancias de *mcyD* se encontraron a bajas temperaturas cuando la biomasa del CMA y la turbidez fueron bajas. Por lo tanto, la turbidez sería más bien un indicador de biomasa de cianobacterias y no una propiedad intrínseca del agua que afecta a los genotipos tóxicos.

1.7.5. CMA y nutrientes

No se encontró asociación entre la abundancia de los genes *mcy* analizados y la concentración de nutrientes totales (FT o NT). Varios estudios han demostrado que existe una correlación positiva entre los nutrientes (FT o NT) y abundancias de genes *mcy* (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*) (Rinta-Kanto *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Joung *et al.*, 2011; Te & Gin, 2011; Guedes *et al.*, 2014). Esta falta de correlación sugiere que en situación de exceso de nutrientes, la temperatura y el estrés salino serían más relevantes para la regulación de la abundancia de genotipos tóxicos que la concentración de nutrientes. Debido a la alta concentración de nutrientes el ecosistema en estudio se clasifica como eutrófico-hipereutrófico, donde la mayor concentración de nutrientes se detectó en el embalse de Salto Grande, coincidiendo con la presencia de floraciones del CMA permanentes. En este sentido, ya que los nutrientes disponibles para las cianobacterias se encuentran en exceso su abundancia va a estar regulada por variables ambientales que no pueden ser controladas por el ser humano como por ejemplo la temperatura.

1.7.6. Producción de toxinas por el CMA

La falta de correlación entre la concentración de microcistina-LR (MC-LR) y la abundancia de genes *mcy* podría deberse a la presencia de otras variantes que no pudieron ser detectadas por la técnica empleada debido a la falta de estándares para detectar otras variantes de la toxina. Esta toxina solo fue detectada durante el verano en el embalse de Salto Grande, mientras que organismos del CMA fueron encontrados en altas abundancias en otras estaciones, lo que sugiere que las especies del CMA podrían estar sintetizando

otras variantes de microcistina diferentes a la analizada (MC-LR). Esta falta de correlación entre la producción de toxinas y la abundancia de genes *mcy* ya ha sido reportada para otros ecosistemas, en los cuales utilizan otras metodologías para cuantificar la toxina (Rinta-Kanto *et al.*, 2009; Beversdorf *et al.*, 2015). Al igual que en el presente trabajo, estudios previos solo abarcan pocas variantes de microcistina (generalmente MC-LR), lo que podría ocultar la verdadera asociación entre la presencia de los genotipos tóxicos y la síntesis de toxinas. En este sentido, Vaitomaa *et al.* (2003) encontraron una correlación positiva entre microcistinas totales evaluadas mediante ELISA y números de copias de *mcyE* en dos lagos de Finlandia, confirmando la fiabilidad del uso de números de copias del gen *mcy* como indicador de organismos productores de microcistinas.

Entre los cuatro genes *mcy* analizados en este estudio (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*), solo el *mcyD* mostró una respuesta opuesta a la temperatura. Esto implica que el potencial para producir microcistina podría lograrse bajo una combinación diferente de condiciones ambientales (i.e. Guedes *et al.*, 2014). En base a la respuesta diferencial encontrada para *mcyD* y para evitar sesgos de los *primers*, se recomienda el uso de más de un gen *mcy* para el monitoreo y predicción de toxinas en los ecosistemas acuáticos. En este trabajo, la estrategia empleada (qPCR de cuatro genes *mcy*) demostró ser exitosa para detectar genotipos tóxicos del CMA con alta sensibilidad (2 células/ml), superando el rendimiento de los métodos clásicos utilizados para el monitoreo de la abundancia de cianobacterias (microscopía). Además, los resultados mostraron que la abundancia de los genes *mcyB*, *mcyE* y *mcyJ* se correlacionó positivamente con el biovolumen de cianobacterias y del CMA, según lo estimado por métodos clásicos. En concordancia con estos resultados, la abundancia de los genes *mcyB* y *mcyE* fue significativamente mayor cuando se detectó la presencia de organismos del CMA utilizando la red de plancton (115 μm). Estos resultados, junto con la alta sensibilidad mostrada por el qPCR, sugieren que la combinación de ambas sería una herramienta prometedora para la detección temprana de genotipos tóxicos del CMA. De hecho, debido a las fuertes correlaciones encontradas entre *mcyE* y variables biológicas evaluadas en el amplio gradiente ambiental estudiado, se propone que este gen *mcy* debe incluirse como un indicador de la presencia de genotipos tóxicos del CMA.

1.8. Conclusiones

Las principales conclusiones de este capítulo se resumen en la **Figura 1.8**. Se detectaron poblaciones del CMA con genotipo tóxico a lo largo de todo el gradiente ambiental estudiado, en el cual fue el grupo productor de microcistina dominante. Los análisis estadísticos que incluyeron las variables ambientales mostraron que la temperatura y la conductividad (salinidad) serían las principales variables que explican la abundancia de genotipos tóxicos en el río Uruguay y Río de la Plata. Además, en base a los resultados, se sugiere la existencia de varias poblaciones tóxicas que portan diferentes genotipos, ya que los genes *mcy* estudiados mostraron diferentes respuestas frente a las variables ambientales evaluadas. Un ejemplo fue la población que presenta el gen *mcyD* que mostró su máxima abundancia durante el invierno.

Por otro lado, hay que destacar que éste es el primer estudio que utiliza herramientas moleculares para detectar genotipos tóxicos del CMA en el gradiente ambiental que comprende el sistema río Uruguay-Río de la Plata. La estrategia de qPCR presentó una alta sensibilidad y además se encontraron fuertes correlaciones entre la abundancia de genotipos tóxicos y la presencia de colonias del CMA, lo que representa una herramienta alternativa adecuada para la detección de floraciones tóxicas del CMA.

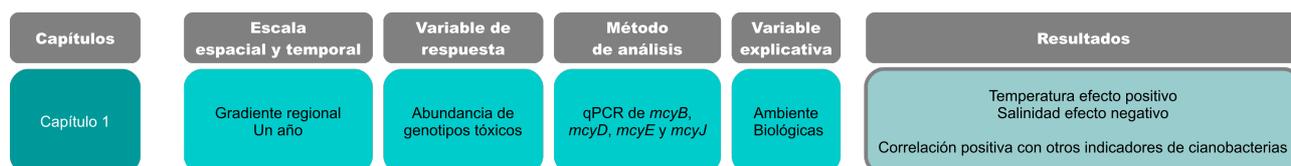


Figura 1.8. Esquema de trabajo, indicando la escala espacial y temporal, variables de respuesta estudiadas y su método de análisis, las variables explicativas utilizadas en el Capítulo 1 y principales resultados del mismo.

Este capítulo fue publicado en la revista *Harmful Algae* en 2017 (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017, Apéndice 5).

Capítulo 2

**Efecto del ambiente sobre la estructura de las
comunidades tóxicas del Complejo *Microcystis*
*aeruginosa***

2.1. Resumen

El complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) se define como un grupo de varias especies de *Microcystis* que se caracterizan por su morfología, toxicidad y preferencias ambientales, cuya distinción fenotípica y genotípica sigue siendo un desafío. En el CMA los rasgos basados en la morfología no siempre son filogenéticamente informativos y su variabilidad genómica puede no reflejarse en su morfología. En este trabajo, se estudió la diversidad genética de las poblaciones productoras de microcistina del CMA y su relación con las condiciones ambientales a lo largo de un amplio gradiente ambiental, desde un embalse eutrófico de agua dulce hasta aguas estuarinas (río Uruguay y Río de la Plata). Con el fin de identificar diferentes genotipos tóxicos del CMA y conocer sus preferencias ambientales, se utilizó la herramienta molecular *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) para detectar polimorfismos de un solo nucleótido en un gen involucrado en la biosíntesis de microcistina (*mcyJ*) y se aplicaron árboles de clasificación y regresión funcional (*f*CART) para analizar los datos obtenidos del HRMA. Primero, se generaron perfiles de *melting* de amplicones *mcyJ* de cada muestra de agua (perfil de la comunidad; HRMAc), que corresponden al promedio ponderado por la abundancia de las curvas de *melting* producidas por todas las variantes del gen *mcyJ* presentes en esa muestra. Luego, se aplicó el algoritmo *f*CART para detectar las variables ambientales que generan la mejor agrupación de HRMAc. En base a esto, se identificaron seis grupos de genotipos *mcyJ*, cada uno de los cuales prosperaba en un conjunto específico de condiciones ambientales (temperatura, conductividad y turbidez) y también eran fenotípicamente coherentes (e.g. morfología y tamaño). Se definieron estos seis grupos como ecotipos, donde cada uno está compuesto por un genotipo dominante que produce la señal principal de HRMA, más algunos genotipos similares que comparten preferencias ecológicas. Los ecotipos del CMA tóxicos que prosperan en la zona ribereña del gradiente serían más estables que los presentes en la parte estuarina, que desaparecerían periódicamente o serían eliminados por las fluctuaciones de salinidad.

2.2. Introducción

El análisis de procesos ecológicos y evolutivos que explican los patrones de diversidad biológica es fundamental para entender los mecanismos que impulsan el ensamblaje comunitario (Mayr, 1982). Esta combinación de procesos toma gran importancia en el estudio de las comunidades microbianas, donde interactúan una gran cantidad de variantes genéticas y que responden rápidamente a los cambios ambientales (Koeppel *et al.*, 2008). En algunos microorganismos existen diferencias ecológicas y fisiológicas entre las poblaciones que reflejan grandes diferencias a nivel genético (Welch *et al.*, 2002). Estas diferencias suelen ser difíciles de detectar cuando se utilizan marcadores filogenéticos de evolución lenta, tales como los genes ribosomales, para estudiar los patrones de diversidad microbiana, lo que evita dilucidar de los mecanismos que explican la estructura de la comunidad observada. Este es el caso del género *Microcystis*, para el cual se han descrito diversas morfo-especies que presentan secuencias del gen ADNr 16S casi idénticas y que exhiben diferencias ecológicas (Otsuka *et al.*, 1998). Estas diferencias morfológicas y ecológicas del género *Microcystis* no se reflejan en la filogenia basada en la secuencia del gen ADNr 16S revelan la necesidad de un enfoque teórico diferente para definir especies ecológicamente relevantes.

En este contexto, la teoría del ecotipos de especies bacterianas fue desarrollada hace varios años por Cohan (Ward *et al.*, 1994; Cohan, 2002; Cohan & Perry, 2007) y define un ecotipo como un clado de microorganismos relacionados filogenéticamente (es decir, que pertenecen a la misma especie bacteriana según la definición operativa) que comparten características ecológicas (nicho específico). Un ecotipo se genera luego de que un individuo sufre una mutación o recombinación que cambia su ecología, permitiendo la utilización de un nuevo conjunto de recursos o que prospere bajo una condición ambiental particular (Cohan, 2002). Bajo este concepto, se ha definido que dos individuos pertenecen a un mismo ecotipo cuando, además de mostrar similar secuencia del gen ARNr 16S (al menos 97% de similitud) (Stackebrandt, 2006), también comparten preferencias ecológicas (Kopac & Cohan, 2011). En este marco teórico se han propuesto diferentes modelos de generación de ecotipos dependiendo del mecanismo que induce la diferenciación (Cohan & Ward, 2005; Gevers *et al.*, 2005; Cohan, 2006). En el caso de las cianobacterias, se han definido diferentes ecotipos para varios organismos, como *Prochlorococcus* (Moore *et al.*,

1998), *Synechococcus* (Sohm *et al.*, 2016) y *Cylindrospermopsis raciborskii* (Piccini *et al.*, 2011). En estos estudios, se utilizaron las secuencias del ARNr 16S e ITS para definir ecotipos, de esta forma los autores encontraron que los ecotipos no solo tienen distintas preferencias ambientales (e.g., temperatura, intensidad de la luz, concentraciones de nutrientes y disponibilidad de hierro), sino también diferencias en la morfología y fisiología. En el caso del CMA, se han descrito especies desde el punto de vista morfológico (morfo-especies) que comparten identidad casi completa de su genoma, por lo que se ha propuesto que en realidad pertenecen al mismo clado filogenético y que la variabilidad morfológica observada obedecería a la plasticidad fenotípica (Pérez-Carrascal *et al.*, 2019).

Entre las técnicas utilizadas para el estudio de la estructura de las comunidades microbianas se ha propuesto recientemente al análisis de desnaturalización a alta resolución (*High Resolution Melting Analysis*, HRMA) como una técnica molecular relativamente simple y adecuada para el estudio de la variabilidad a nivel genético (Hjelmsø *et al.*, 2014; Kim & Lee, 2014). La técnica HRMA se ha usado en diferentes estudios, como ser la genotipificación, análisis de mutaciones y detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en poblaciones bacterianas (Wittwer, 2003; Hofinger *et al.*, 2009; Thomsen *et al.*, 2012; Tong & Giffard, 2012). Además, la técnica de HRMA ha sido utilizada para detectar enfermedades humanas asociadas a mutaciones puntuales (Li *et al.*, 2011), así como para abordar la diversidad de comunidades microbianas (Hjelmsø *et al.*, 2014; Kim & Lee, 2014; Zeyoudi *et al.*, 2015).

Una de las dificultades asociadas con el uso de métodos moleculares para el estudio de comunidades microbianas es que los datos son difíciles de analizar utilizando herramientas de estadística clásica ya que son de alta dimensión y con frecuencia muestran respuestas correlacionadas. Sin embargo, las técnicas de aprendizaje automático proporcionan una manera eficiente de utilizar la información proporcionada por los análisis moleculares (Libbrecht & Noble, 2015). En particular, el análisis funcional proporciona una manera objetiva de analizar una secuencia de resultados correlacionados, como los que se obtienen de las curvas de desnaturalización de HRMA. Por lo tanto, la combinación de métodos moleculares con técnicas de aprendizaje automático parece ser prometedora al momento de analizar los patrones de ensamble de la comunidad microbiana bajo el marco teórico de ecotipos.

Como se mencionó anteriormente, es difícil discriminar ecotipos de cianobacterias basados en las secuencias de genes del ARNr 16S, ya que pueden compartir más del 97% de identidad entre diferentes variantes morfológicas y ecológicas. En el caso del CMA, mediante el uso de la región espaciador intergénico ribosomal (ITS) varios estudios han encontrado diferencias espaciales en los genotipos del CMA a escalas regionales pequeñas (e.g., reservorios, lagos) (Briand *et al.*, 2009; Sabart *et al.*, 2009) pero no a escala global (van Gremberghe *et al.*, 2011).

Rinta-Kanto & Wilhelm (2006) estudiaron la diversidad genética de especies de *Microcystis* potencialmente tóxicas basándose en la secuencia aminoacídica de McyA y reportaron nuevas secuencias del gen *mcyA* (Rinta-Kanto & Wilhelm, 2006). Mediante la amplificación del gen *mcyA* y la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), Hu *et al.* (2016) encontraron que la presencia de las diferentes variantes de microcistinas se vio afectada por la composición de la comunidad tóxica de *Microcystis* (Hu *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha demostrado que el gen *mcyA* presenta regiones de recombinación (Tanabe *et al.*, 2004) y a su vez se detectaron múltiples eventos de recombinación dentro del dominio N-metiltransferasa de las secuencias de *mcyA* y de las secuencias del dominio de adenilación de *mcyB* y *mcyC*. Esto sugiere que la recombinación dentro y entre los genes *mcy* contribuye a su diversidad genética. Sin embargo, no se ha detectado recombinación en la secuencia del gen *mcyJ*, el cual se ha demostrado que siempre está presente en las cepas tóxicas (Tanabe *et al.*, 2009), y que se conserva lo suficiente como para utilizarlo en estudios de variabilidad genética de poblaciones tóxicas. En este sentido, Kim *et al.* (2010) analizaron la diversidad del gen *mcyJ* por DGGE en un embalse (Daechung Reservoir, Corea) y encontraron que la diversidad se redujo durante el verano (30 °C) en comparación con la primavera y el otoño (5 °C) (Kim *et al.*, 2010). Otros estudios no encontraron asociación entre las variables ambientales (por ejemplo, fósforo total, nitrato y temperatura) y la diversidad de *Microcystis*, estimada mediante DGGE (Hu *et al.*, 2016) y electroforesis capilar de polimorfismo de conformación de una sola hebra (CE-SSCP) (Pobel *et al.*, 2012).

En este capítulo se estudiaron los procesos que afectan la distribución de las poblaciones tóxicas del CMA en un amplio gradiente ambiental (aprox. 800 km), desde agua dulce (río Uruguay) hasta agua salobre (estuario Río de la Plata). Para ello, el genotipado de las

comunidades tóxicas del CMA se basó en las curvas de *melting* del gen *mcyJ* obtenidas mediante HRMA que luego se analizaron mediante un enfoque *f*CART.

2.3. Objetivo

El objetivo de este estudio fue evaluar si la capacidad de estos organismos para prosperar en una amplia gama de ambientes se basa en la existencia de múltiples genotipos adaptados a diferentes conjuntos de condiciones ambientales (ecotipos).

2.4. Estrategia de investigación

En este trabajo se utilizó la técnica HRMA para evaluar la diversidad genética de genotipos tóxicos y el ensamblaje comunitario de comunidades tóxicas del CMA. El análisis de *melting* de alta resolución es un método posterior a la realización de un PCR en tiempo real que se utiliza para detectar genotipos basados en SNPs. Esta técnica implica la utilización de un marcador especial de alta saturación del ADN que emite fluorescencia al unirse al ADN doble hebra. Una vez realizada la amplificación del fragmento de interés, se realiza la desnaturalización de los amplicones aumentando gradualmente la temperatura en incrementos de 0,1 °C. Durante este proceso y a medida que aumenta la temperatura, el ADN doble hebra se desnaturaliza y provoca el decaimiento de la fluorescencia dada por el marcador de ADN generando las curvas de *melting* (disminución de fluorescencia durante el aumento de la temperatura) que son características de cada secuencia amplificada. Por lo tanto, puede discriminar muestras según su longitud de secuencia, contenido de GC y secuencia de ADN. Este caso es cuando se analizan secuencias individuales separadas, sin embargo, el objetivo de este trabajo fue detectar variaciones entre las curvas de *melting* del gen *mcyJ* de diferentes comunidades, ya que una sola muestra ambiental incluye el ADN de toda una comunidad del CMA. Por lo tanto, la curva de *melting* resultante corresponde al promedio ponderado por la abundancia de todos los perfiles de *melting* de cada variante del gen *mcyJ*.

La relación entre la estructura de la comunidad tóxica del CMA y las variables ambientales

se evaluó mediante árboles de clasificación y regresión multivariados funcionales (CART funcional, f CART) (Breiman *et al.*, 1984, Nerini & Ghattas, 2007). f CART es una extensión de los árboles clásicos de clasificación y regresión utilizados en ecología (Breiman *et al.*, 1984; De'ath, 2002; Nerini & Ghattas, 2007) en los que la variable de respuesta no es un valor dado, sino una función (Nerini & Ghattas, 2007). Esta metodología se usó para identificar las variables ambientales asociadas a cada ecotipo tóxico, definidos como un grupo de organismos del CMA estrechamente relacionados y con las mismas preferencias ambientales.

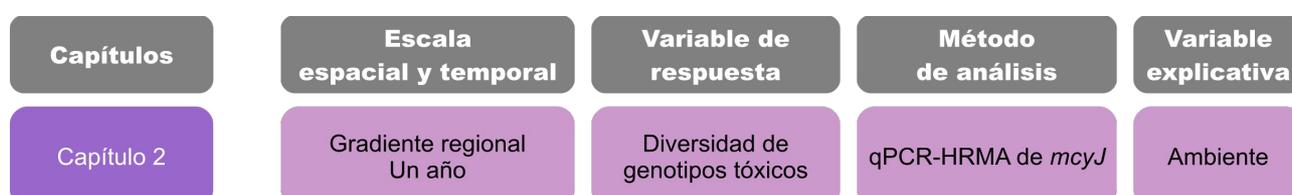


Figura 2.1. Esquema de trabajo indicando la escala espacial y temporal, las variables de respuesta estudiadas y su método de análisis, y las variables explicativas.

2.5. Métodos

2.5.1. Muestreo

La colección de muestras utilizadas en este estudio provienen de las estaciones de costa (CO) del muestreo descrito en el capítulo anterior. Por lo tanto, el total de las muestras analizadas fueron 36, las muestras correspondientes al embalse de Salto Grande fueron del sitio Itapebí.

2.5.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se tomaron entre 250-300 ml de agua subsuperficial en botellas de polipropileno estériles. La muestra de agua fue filtrada por filtros de membranas estériles de policarbonato de 0,22 μ m de tamaño de poro (Millipore) las cuales fueron inmediatamente guardadas a -20 °C hasta su procesamiento. El proceso de extracción de ácidos nucleicos fue realizado como se describió en el Capítulo 1 (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017).

2.5.3. High Resolution Melting Analysis (HRMA) de amplicones de *mcyJ*

Se utilizaron los mismos *primers* del Capítulo 1 para la realización del HRMA del gen *mcyJ* (Kim *et al.*, 2010). Para las reacciones de qPCR-HRMA se empleó el kit MeltDoctor HRMA (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20 μ l: 9,5 μ l de agua, 0,5 μ l de BSA (30 mg/ml), 7,76 μ l de mix (MeltDoctor HRMA, Invitrogen), 0,12 μ l de cada *primer* (50 μ M) y 2 μ l de ADN de la muestra (aprox. 50 ng DNA). El termociclador utilizado para los ensayos de HRMA fue TouchTM Real-Time PCR Detection System (BIO RAD) y software Bio-Rad Precision Melt Analysis. Las condiciones de ciclado fueron 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C. Para realizar los perfiles de *melting* de HRMA se registraron los valores de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) dentro de la región de *melting* de 65 °C a 95 °C con aumentos de 0,02 °C/seg. Los datos de HRM se obtuvieron y analizaron utilizando Bio-Rad Precision Melt Analysis (Bio-Rad), cada muestra se procesó por duplicado. La curva del *melting* se normalizó al mismo nivel de fluorescencia usando las regiones pre y post *melting* (antes y después de la región de *melting*, respectivamente). La región pre y post *melting* se seleccionó en función de la región de *melting* específica del amplicón *mcyJ* (de 75 °C a 82 °C, $T_m = 79,5$ °C). Los valores de RFU normalizados se utilizaron para el posterior análisis estadístico.

2.5.4. CART funcional

Las curvas de *melting* (RFU vs temperatura) se representaron en la base funcional no periódica β -spline de orden 4 (base óptima luego de haber realizado varios experimentos). El CART multivariado (De'ath, 2002; Nerini & Ghattas, 2007) se utilizó para modelar los coeficientes de las curvas (variables *output*) usando las siguientes variables *input*: nutrientes totales (Nitrógeno Total, NT y Fósforo Total, FT), intensidad del viento (viento), temperatura del agua (Temp), turbidez (Turb) y conductividad (K). Se realizó validación (10) cruzada para optimizar el tamaño (número de hojas) del árbol óptimo. Para evaluar el rendimiento (error de predicción) y la fiabilidad de dicho árbol óptimo se repitieron los siguientes pasos 100 veces: i) se dividió aleatoriamente los datos en dos partes, muestra de aprendizaje y muestra de prueba (en proporción 2/3, 1/3 respectivamente), ii) se construyó un árbol óptimo sobre la muestra de aprendizaje, iii) se aplicaron permutaciones aleatorias de las variables *input* y se construyó otro árbol óptimo sobre el conjunto de datos

"permutados", iv) se calculó el error de predicción del total de cada árbol. La distribución de errores de cada árbol (en las 100 réplicas) se comparó mediante el test *log-likelihood ratio* (LRT). Finalmente, se evaluó la estructura del árbol con respecto a la estructura de la comunidad del CMA en base a la distribución de rasgos ecológicos relevantes para cianobacterias tóxicas (volumen, relación superficie/volumen, riqueza del CMA y abundancia del gen *mcyJ*). Esto se realizó utilizando el método LRT y las comparaciones pareadas mediante el test pos-hoc de Tukey.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software libre R, versión 3.3.1 utilizando los paquetes {fda}, {rpart}, {nlme} y {PMCMR} (R Core Team, 2013; Pinheiro *et al.*, 2014; Pohlert, 2014; Ramsay *et al.*, 2014; Therneau *et al.*, 2015).

2.5.5. Identificación de ecotipos tóxicos

Para explicar la idea básica sobre cómo esta metodología se utilizó para identificar ecotipos y detectar las variables ambientales más relevantes en definir los ecotipos, se presenta un ejemplo teórico con los fundamentos y pasos del método. En primer lugar, definimos que el perfil de *melting* del amplicón *mcyJ* obtenido de una comunidad determinada del CMA (una muestra) representa el promedio ponderado en base a la abundancia de todos los perfiles de *melting* de todas las variantes de la secuencia de *mcyJ* amplificada que están presentes en esa muestra.

Luego, en el marco de la hipótesis, las variables ambientales A y B (e.g., temperatura y salinidad) son aquellas que definen el *fitness* (aptitud biológica) o abundancia de tres genotipos *mcyJ* particulares (J1, J2 y J3; **Figura 2.2 A**), que se definen por su perfil de *melting* individual (**Figura 2.2 B**). Por lo tanto, bajo una condición ambiental particular definida por las variables A y B, se espera encontrar una combinación determinada de abundancias de genotipos en la comunidad (**Figura 2.2 A**). La abundancia relativa de cada genotipo determinaría un perfil de *melting* característico de la comunidad, es decir, un ecotipo (**Figura 2.2 C**). Para una comunidad simulada, la relación entre la abundancia y las condiciones ambientales se simuló a partir de una distribución normal bivariada con un promedio de $\mu_i = \{\mu_A, \mu_B\}$ y una matriz de covarianza σ_i específica para cada genotipo, donde $i = 1: 3$. Los tres amplicones *mcyJ* (tres genotipos diferentes de *mcyJ*; J1, J2 y J3) se obtuvieron de muestras de floraciones del CMA y se clonaron en un vector TOPO-TA (ver

Capítulo 1 y Apéndice 1). Se realizó el PCR en tiempo real y el posterior análisis de HRMA para cada clon como se describió anteriormente y se obtuvo la curva de *melting* de cada genotipo. Se realizaron muestreos aleatorios para generar 50 condiciones ambientales y para cada condición (definida por las variables {A, B}) se estimó la abundancia relativa de cada genotipo y se construyó el perfil de *melting* de la comunidad (**Figura 2.2 C**). Según la hipótesis de este estudio, cada región en el gradiente ambiental debe caracterizarse por un perfil de *melting* de la comunidad correspondiente a un ecotipo tóxico dado. La aplicación del análisis *f*CART permitió conocer las variables ambientales que definen los ecotipos tóxicos (**Figura 2.2 D**). Este método sería una herramienta útil para determinar empíricamente ecotipos basados en variables ambientales. En el caso particular en el que la abundancia de los tres amplicones *mcyJ* no está determinada por las variables ambientales seleccionadas ($\mu_i = \mu_j$ y $\sigma_i = \sigma_j$ para todos i, j), se espera un solo ecotipo. En esta situación, el *f*CART no dividió los datos y el árbol permaneció como un "árbol raíz".

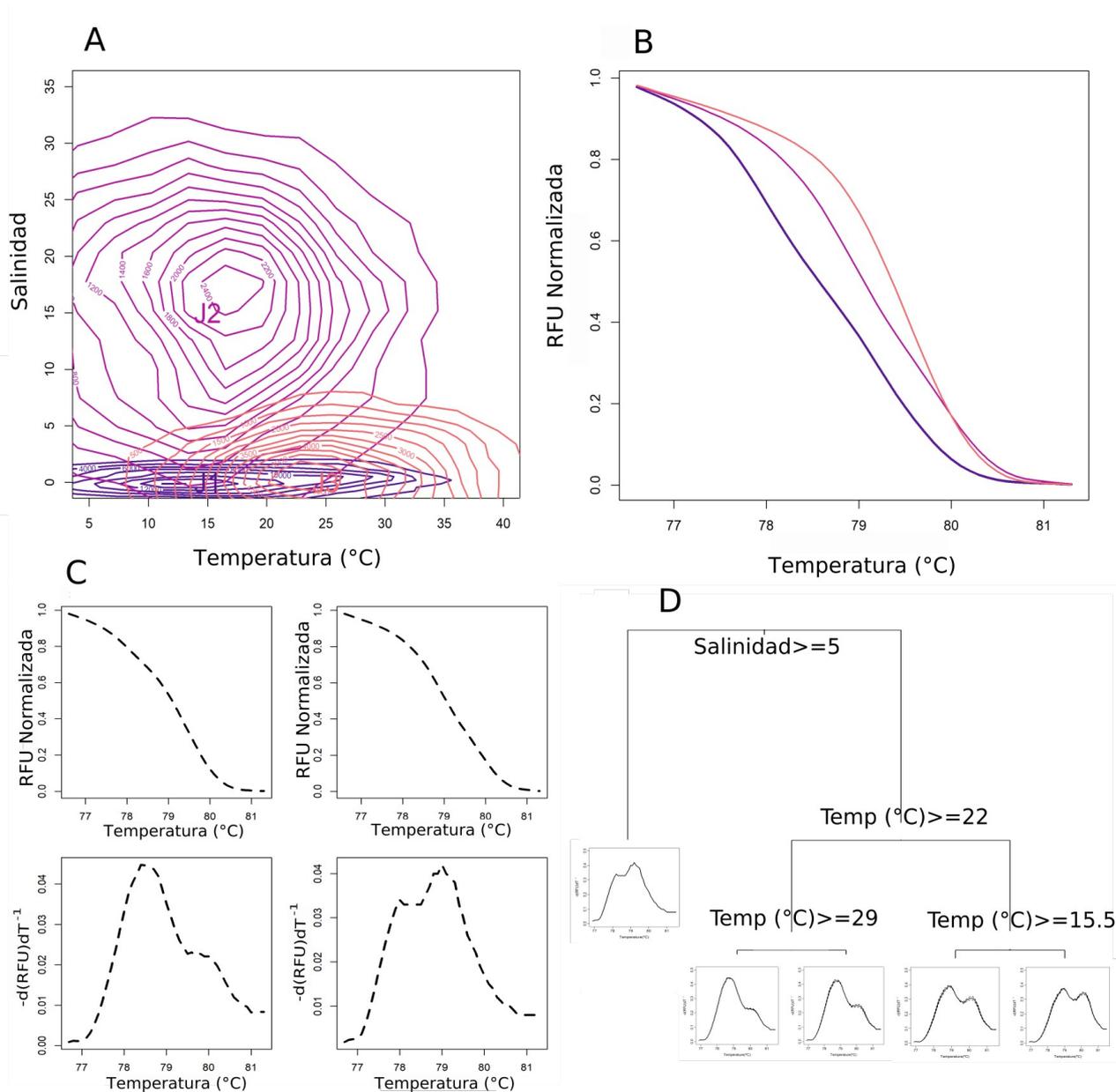


Figura 2.2. Ejemplificación del procedimiento. **(A)** ejemplo ficticio de una comunidad formada por 3 genotipos *mcyl* (J1 violeta oscuro, J2 violeta claro y J3 rosado) y su distribución en función de salinidad y temperatura. **(B)** Curvas de *melting* normalizadas para los mismos 3 genotipos analizados separadamente. **(C)** Si se tomara una muestra de la naturaleza no se podría generar una curva por cada genotipo sino que se observaría solo una. Por ejemplo, a la izquierda superior se muestra la curva resultante a temperatura 33 °C y salinidad 0, a la izquierda inferior se muestra su derivada; y a la derecha superior la curva resultante a temperatura 13 °C y salinidad 33, a la derecha inferior se muestra su derivada. **(D)** Árbol de regresión funcional óptimo obtenido con condiciones ambientales muestreadas al azar. En cada nodo, se muestra la variable ambiental y su valor umbral. Temperatura del agua (Temp °C) y salinidad. Al final de cada rama se muestra el pico de *melting* (derivada de la curva de *melting*) promedio (línea continua) y su desviación estándar (línea discontinua) que representa la comunidad de genotipos tóxicos.

2.6. Resultados

2.6.1. Perfiles de *melting* obtenidos a partir del HRMA

La técnica HRMA se aplicó con éxito al gen *mcyJ*, obteniéndose diferentes perfiles y picos de *melting* ($T_m = 78,5 - 79,5$ °C) para cada muestra, lo que indica que la diversidad de genotipos tóxicos en las comunidades evaluadas presentan diferencias en las secuencias del gen *mcyJ* (Apéndice 2).

2.6.2. Relaciones entre las comunidades de genotipos tóxicos y el ambiente

La aproximación basada en árboles de regresión y clasificación funcional (*f*CART) utilizando los valores de RFU de los perfiles de *melting* normalizados generó un árbol podado con seis hojas (**Figura 2.3**). El árbol óptimo presentó un error de predicción promedio significativamente más bajo que el error promedio obtenido de los árboles "permutados" (LRT, $p < 0.05$; **Figura 2.4**). El análisis de *f*CART presentó como resultado que la temperatura del agua (Temp) fue la principal variable ambiental en explicar las diferencias entre las comunidades de genotipos tóxicos observadas en el gradiente ambiental, con un valor umbral de 14,5 °C en el nodo raíz (**Figura 2.3**). Las siguientes dos variables seleccionadas fueron la turbidez (Tur) y conductividad (K), con valores umbral de 14,25 NTU y 0,104 mS/cm, respectivamente. Las siguientes variables seleccionadas fueron nuevamente la temperatura (valor umbral = 23,9 °C) y la conductividad (valor umbral = 9,156 mS/cm). De acuerdo con este análisis, los nutrientes totales y la intensidad del viento no fueron relevantes para determinar la composición de la comunidad de genotipos tóxicos.

Finalmente, se seleccionaron seis grupos de comunidades de genotipos tóxicos del CMA (que difieren en las condiciones ambientales donde se encontraron) en función de la temperatura, turbidez y conductividad (**Tabla 2.1**). Estos grupos están formados por diferentes genotipos tóxicos que comparten características ecológicas.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta el marco teórico propuesto, los diferentes grupos de comunidades de genotipos tóxicos representarían distintos ecotipos de organismos tóxicos del CMA. En base a los resultados obtenidos con el *f*CART, se identificaron tres ecotipos de agua cálida (14 °C < Temp < $23,9$ °C), ecotipos

A, C y D. Dentro de este grupo, los ecotipos difieren en sus preferencias de salinidad: el ecotipo A estuvo presente en agua salobre, el ecotipo C en agua dulce y el ecotipo D estuvo presente en aguas con un amplio rango de K pero con baja turbidez. Por otro lado, el ecotipo B se asoció a aguas dulces con temperaturas más altas (Temp > 23,8 °C). Finalmente, los ecotipos E y F estuvieron presentes en aguas frías (Temp < 14 °C), el ecotipo E se detectó en aguas salobres y el F en ecosistemas de agua dulce (**Figura 2.3, Tabla 2.1**).

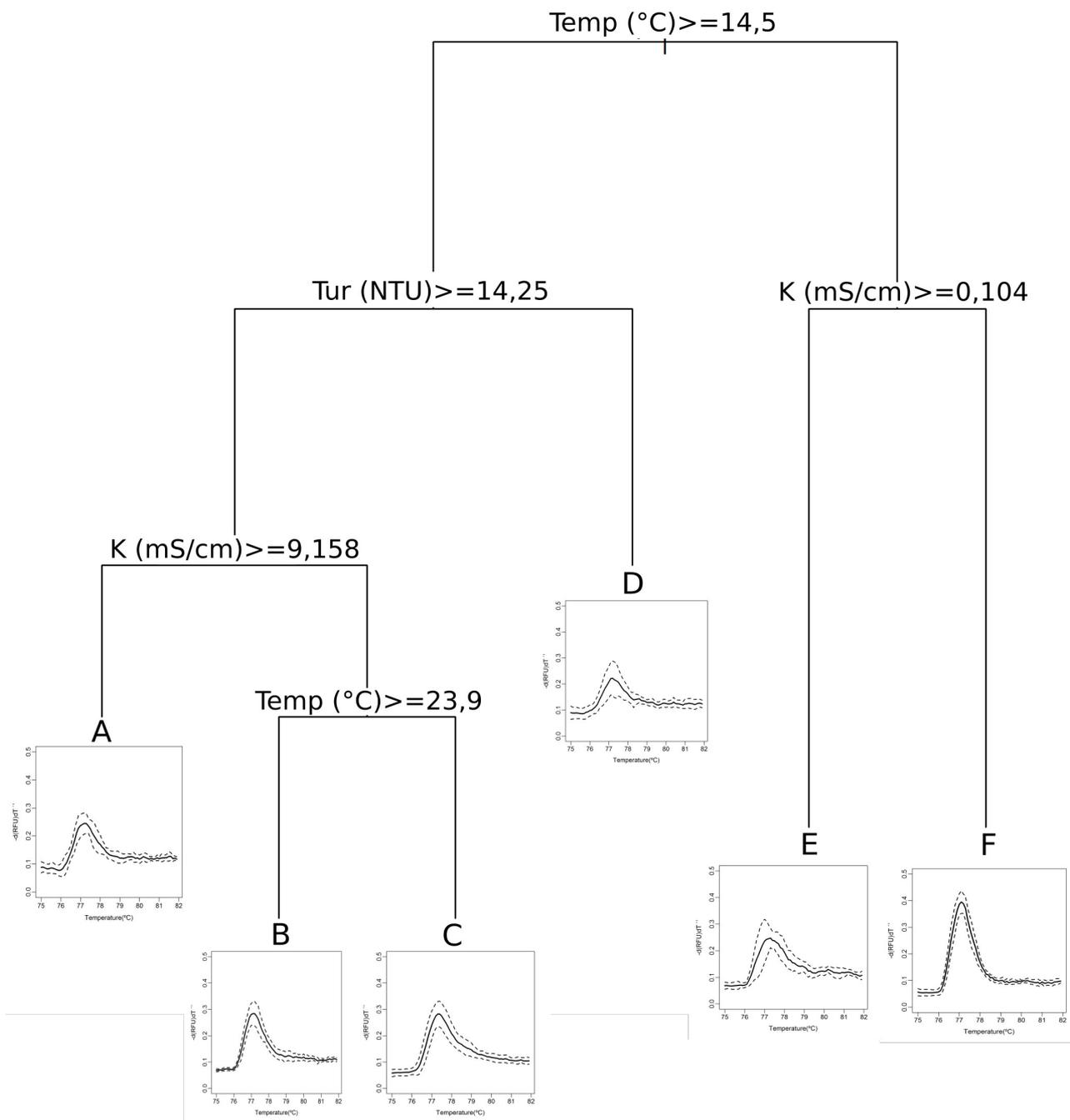


Figura 2.3. Árbol óptimo de regresión funcional que muestra las principales variables ambientales que explican la diversidad de genotipos tóxicos. En cada nodo, se muestra la variable ambiental y su valor umbral. Temperatura del agua (Temp), turbidez (Tur) y conductividad (K). Al final de cada rama se muestra el pico de *melting* promedio (línea continua) y su desviación estándar (línea discontinua) que representa la comunidad de genotipos tóxicos.

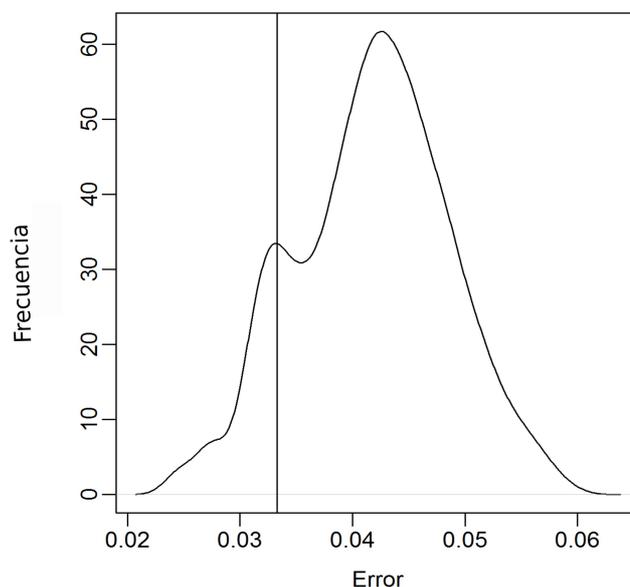


Figura 2.4. Errores obtenidos de los árboles de regresión funcional. Densidad del error del árbol realizado al cambiar aleatoriamente los valores de las variables ambientales y el valor medio del error obtenido del árbol óptimo utilizando los datos originales.

Tabla 2.1. Variables ambientales asociadas a cada ecotipo. Valores medios y rangos de variables ambientales: temperatura (°C), conductividad (mS/cm), turbidez (NTU), y las características del nicho para cada ecotipo. BLD = por debajo del límite de detección.

Ecotipo	Nicho	Temperatura (°C)	Conductividad (mS/cm)	Turbidez (NTU)
A	Aguas cálidas y salobres	19.1 (14.8-22.9)	36.4 (18.2-52.0)	40.9 (15.4-89.6)
B	Agua caliente y dulce	27.2 (24.3-33.6)	0.041 (0.023-0.054)	28.5 (14.3-47.9)
C	Agua cálida y dulce	20.5 (15.6-23.4)	0.074 (0.033-0.113)	56.0 (19.9-127.0)
D	Agua cálida y con baja turbidez	20.9 (16.1-25.9)	14.02 (0.048-52.7)	7.6 (BLD-14.2)
E	Agua fría y salobre	11.9 (11.2-12.3)	29.13 (0.113-55.8)	20.8 (BLD-49.0)
F	Agua fría y dulce	12.7 (11.0-14.2)	0.061 (0.036-0.095)	17.5 (0.9-42.2)

2.6.3. Ecotipos tóxicos y rasgos fenotípicos

Cuando se analizaron las muestras por microscopía se detectó una abundancia muy baja de organismos del CMA en muestras asociadas con los ecotipos A, D y E (Apéndice 2). Los ecotipos B, C y F incluyen muestras que presentaron un mayor biovolumen del CMA en comparación con los demás ecotipos y mostraron diferencias significativas en los rasgos individuales del CMA (volumen y relación superficie/volumen) y riqueza entre ellos (LRT, $p < 0.05$, Apéndice 2). El ecotipo F se asoció a muestras en las que el volumen individual de los organismos del CMA fue máximo en comparación con los ecotipos B y C (LRT, $p < 0.05$, Apéndice 2). Los valores de la relación superficie/volumen fueron menores en el ecotipo F en comparación con los ecotipos B y C (LRT, $p < 0.05$, Apéndice 2). Se encontraron diferencias significativas en el biovolumen del CMA en los ecotipos B y C, siendo mayor en B (LRT, $p < 0.05$, Apéndice 2). El ecotipo B mostró el mayor número de copias de *mcyJ* relacionadas con los demás ecotipos (LRT, $p < 0.05$, Apéndice 2) (**Tabla 2.2**). Los ecotipos presentaron diferente frecuencia de ocurrencia, siendo los ecotipos C y D los más frecuentes en el ecosistema (**Tabla 2.2**).

Tabla 2.2. Variables biológicas asociadas a cada ecotipo. Valores medios y rangos de variables biológicas: volumen de colonias del CMA (μm^3), relación superficie/volumen de colonias del CMA (μm^{-1}), biovolumen del CMA (mm^3/L), abundancia del gen *mcyJ* (copias/ml) y frecuencia de ocurrencia de los ecotipos. BLD = por debajo del límite de detección.

Ecotipo	Nicho	Volumen de las colonias del CMA	Relación superficie/volumen de las colonias del CMA	Biovolumen del CMA	Abundancia del gen <i>mcyJ</i>	Frecuencia de ocurrencia de los ecotipos
A	Aguas cálidas y salobres	BLD	BLD	BLD	34,9 (BLD-96,0)	5/35
B	Agua caliente y dulce	1,89E5 (29,2-2,81E6)	0,73 (0,039-1,57)	4,54E6 (2,37E3-1,37E7)	2,30E4 (BLD-1,14E5)	5/35
C	Agua cálida y dulce	1,76E5 (59,0-2,15E6)	0,59 (0,039-1,24)	2,98E5 (5,89E3-1,28E6)	1,21E4 (BLD-4,54E4)	11/35
D	Agua cálida y con baja turbidez	BLD	BLD	BLD	46,2 (BLD-148,7)	7/35
E	Agua fría y salobre	BLD	BLD	BLD	11,7 (BLD-44,7)	4/35
F	Agua fría y dulce	1,55E6 (6,12E4-6,88E6)	0,075 (0,028-0,14)	1,71E6 (BLD-5,03E6)	192,7 (0,3-437,2)	3/35

Resumiendo, la comunidad del CMA a lo largo de un gradiente ambiental de 800 km se separa en seis diferentes ecotipos compuestos por organismos genotípicamente homogéneos que comparten nicho ecológico (**Tabla 2.2**).

2.7. Discusión

En este trabajo, se detectaron ecotipos tóxicos pertenecientes al complejo *Microcystis aeruginosa* combinando métodos de biología molecular y técnicas estadísticas de aprendizaje automático. Utilizando las curvas de *melting* del gen *mcyJ* y aplicando *f*CART se logró describir la estructura comunitaria de los genotipos tóxicos del CMA a lo largo de un amplio gradiente ambiental lo que permitió la detección de ecotipos tóxicos con nichos ecológicos distintivos. Además, se determinó que algunos de los ecotipos se asociaron a una elevada toxicidad, lo que sugiere que este método sería una forma confiable de explorar los mecanismos involucrados en la producción de toxinas.

Según el análisis de *f*CART, la temperatura del agua, la conductividad y turbidez fueron las variables ambientales más relevantes en determinar la distribución de las comunidades de genotipos tóxicos y, basándose en estos resultados, se asignaron seis grupos de genotipos tóxicos con diferentes preferencias ambientales como pertenecientes a diferentes ecotipos. Éstos tienen preferencias ambientales claramente definidas, lo que sugiere que la estrategia de presentar diferente diversidad de ecotipos permitiría a las especies potencialmente tóxicas del CMA prosperar en una amplia gama de condiciones ambientales que abarcan ecosistemas lénticos, lóticos y estuarinos. Según la teoría de ecotipos bacterianos, un nuevo ecotipo se origina cuando un solo organismo sufre una alteración genética, como mutación o recombinación, que provoca un cambio en su *fitness* ecológico (por ejemplo, permite prosperar bajo una nueva serie de condiciones ambientales) (Cohan, 2002). Esta estrategia ecológica se ha descrito para otras cianobacterias como *Prochlorococcus* y *Cylindrospermopsis raciborskii* (Moore, 1998; Piccini *et al.*, 2011). En el caso de *Prochlorococcus*, se han encontrado al menos seis clados filogenéticos que difieren en su fisiología y ocupan nichos distintos en el océano (Moore, 1998; Martiny *et al.*, 2009). Esta diferenciación de ecotipos se basa en la intensidad de la luz (ecotipos adaptados a alta y baja intensidad de luz), la temperatura y los nutrientes (Moore, 1998; Malmstrom *et al.*, 2007; Martiny *et al.*, 2009). Además, utilizando secuenciación de células individuales (*single-cell*) de *Prochlorococcus* se ha demostrado que la abundancia relativa de subpoblaciones puede variar en relación con la temperatura del agua, lo que sugiere cambios en su *fitness* (adecuación biológica) como respuesta a las condiciones ambientales (Kashtan *et al.*, 2014). Por otro lado, se han descrito diferentes

ecotipos de *Cylindrospermopsis raciborskii* basados en marcadores filogenéticos, morfología, tolerancia a diferentes intensidades de luz (de 5 a 180 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$), diferentes afinidades a concentraciones altas o bajas de fosfato y diferente toxicidad (Dokulil, 2000; Piccini *et al.*, 2011). En base a estos resultados los autores sugieren que *C. raciborskii* puede proliferar en una amplia gama de condiciones de turbidez y estado trófico (Dokulil, 2000; Piccini *et al.*, 2011). En el presente estudio, la presencia de diferentes ecotipos tóxicos del CMA explicaría la proliferación de estos organismos en una gran variedad de condiciones ambientales y por lo tanto la amplia distribución observada de *Microcystis* spp. en todo el mundo.

Los ecotipos descritos coincidieron con los rasgos observados a diferentes niveles de organización. A nivel individual, los organismos que integran los diferentes ecotipos mostraron diferencias en sus características morfológicas, incluido el volumen individual de cada colonia del CMA y su relación superficie-volumen. También se detectaron cambios en la abundancia de células tóxicas (número de copias del gen *mcyJ*) entre diferentes ecotipos que prosperan en ecosistemas con diferentes características. Esto implica que cada ecotipo mostró diferencias en múltiples niveles de organización y que estaban compuestos por un grupo de microorganismos de *Microcystis* estrechamente relacionados (similares morfo-especies), que comparten características ecológicas, morfológicas y de toxicidad. Estos ecotipos, aunque fueron definidos por una comunidad y no por una única población o aislamiento, estarían compuestos por una serie de poblaciones filogenéticamente relacionadas que comparten el nicho ecológico.

Si las especies microbianas pueden verse como unidades genéticas, fenotípicas y ecológicamente similares, es importante comprender cómo se originan y optimizan selectivamente estas unidades para que coexistan ocupando diferentes nichos o, por el contrario, cuánto estas unidades comparten, no solo genéticamente sino también ecológicamente (Shapiro & Polz, 2014). En este sentido, aquí se abordó este tema mediante el análisis de comunidades tóxicas de *Microcystis* que habitan en una amplia gama de ambientes, donde algunos de ellos imponen condiciones extremas para la supervivencia (e.g., ambientes con elevada conductividad).

Como se ha demostrado, el género *Microcystis* no presenta diferencias entre las especies definidas por morfología según los criterios moleculares (Kato, 1991; Otsuka *et al.*, 2001),

pero sí según su ecología, toxicidad, morfología y distribución geográfica. Utilizando una aproximación polifásica, basada en una combinación de métodos donde la evaluación genética es la base y se combina con otras metodologías (e.g., análisis morfológicos, ecofisiológicos y ecológicos), la diversidad de este género no se ha resuelto (Komárek, 2016). En este sentido, el enfoque propuesto en el presente trabajo es una forma novedosa de comprender la diversidad del CMA y de dilucidar los mecanismos subyacentes de una de las cianobacterias formadora de floraciones potencialmente tóxicas más frecuentes en el mundo.

Se ha descrito que la morfología del fitoplancton refleja las respuestas funcionales a los cambios ambientales (Kruk *et al.*, 2010). En el caso del CMA, los ecotipos de agua caliente y cálida (ecotipos C y B, respectivamente) mostraron un amplio rango de tamaño de organismos del CMA (volumen: 29,2-2810000 μm^3). Estos resultados respaldan la información reportada por Kruk *et al.* (2017) donde encontraron desde células individuales a grandes colonias del CMA en el embalse de Salto Grande, sugiriendo la existencia de múltiples etapas del ciclo de vida (Reynolds *et al.*, 1981). Los aumentos de temperatura afectan los procesos biológicos como el metabolismo, lo que provocaría un aumento en la tasa de crecimiento de los organismos y por lo tanto la formación de floraciones (Paerl & Paul, 2012). El calentamiento del agua superficial genera estratificación térmica tanto en agua dulce como en agua marina, promoviendo la acumulación de biomasa (Paerl & Paul, 2012). Una columna de agua más estable también favorece a las cianobacterias, especialmente a aquellas que pueden regular su posición en la columna de agua, como el CMA (O'Neil *et al.*, 2012). Por lo tanto, es esperable la existencia de múltiples etapas del ciclo de vida cuando la temperatura aumenta y lo contrario cuando la temperatura disminuye. En concordancia con los presentes resultados, Tromas *et al.* (2018) reportaron la existencia de separación de nichos dentro del género *Microcystis* debido principalmente a la temperatura y a las preferencias de nitrógeno disuelto. Por lo tanto, el grupo de morfo-especies de *Microcystis* con preferencias similares de temperatura y nitrógeno disuelto detectado por Tromas *et al.* (2018) también podría representar un ecotipo.

Los ecotipos tóxicos del CMA que se asociaron al agua salobre (A y E) presentaron una baja abundancia de células tóxicas (genotipo *mcyJ*) y no se detectaron mediante microscopía debido al método de muestreo clásico (Alcántara *et al.*, 2018). Estos resultados respaldan la información previa obtenida del mismo ecosistema (Capítulo 1), que mostró

una disminución general de la biomasa del CMA, de la riqueza de especies y de la abundancia de genotipos tóxicos desde agua dulce hacia aguas marinas (Kruk *et al.*, 2017; Martínez de la Escalera *et al.*, 2017). Se ha reportado que cuando la salinidad está por encima de las condiciones óptimas de los organismos causa estrés osmótico, disminuye las tasas de fotosíntesis y puede inducir la lisis celular (Orr *et al.*, 2004; Sabart *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015), lo que conduce a una disminución de la abundancia y biomasa, e impide su detección mediante análisis clásicos de microscopía (Segura *et al.*, 2017). Estudios recientes demostraron que algunas cepas de *M. aeruginosa* han adquirido genes que sintetizan un osmoprotector (como la sacarosa) mediante múltiples transferencias horizontales recientes (HGT), generando genotipos tolerantes a la salinidad (Tanabe *et al.*, 2018). En base a los modelos: *Stable Ecotype* y *Species Less* (Cohan, 2002, 2011) los autores propusieron dos escenarios para explicar esto: 1) las cepas de *M. aeruginosa* tolerantes a la salinidad representan ecotipos nuevos y estables (modelo *Stable Ecotype*) o 2) estos ecotipos nuevos se extinguirán inmediatamente (modelo *Species Less*) (Tanabe *et al.*, 2018). Como fue propuesto por Cohan (2002), el modelo de *Stable Ecotype* define ecotipos estables donde la selección periódica limita la diversidad, mientras que el modelo de *Species Less* supone una rápida generación y extinción de ecotipos con baja selección periódica, especialmente bajo condiciones ambientales que están cambiando rápidamente (Cohan, 2011), como ser los límites entre río y el estuario. En este sentido, el origen de los ecotipos de aguas salobres encontrados en este estudio también podría explicarse por uno de estos dos modelos. Sin embargo, según la dinámica del límite del río Uruguay-Río de la Plata, se sugiere que el modelo *Species Less* es el escenario más adecuado para explicar la existencia de estos ecotipos en este sistema de estudio.

Las concentraciones de los nutrientes totales (FT y NT) registradas en este estudio no fueron seleccionadas como variables explicativas, probablemente debido al exceso de nutrientes disponibles que presenta el ecosistema evaluado (FT ~ 60 µg/L, NT ~ 0.9 mg/L). Estudios realizados en el lago Erie (EE.UU.), Berry *et al.* (2017) analizaron oligotipos de *Microcystis* usando un método computacional (oligotipificación) basado en la región V4 del gen 16S rRNA y encontraron cambios en la composición de oligotipos de *Microcystis* relacionados con gradientes espaciales de nutrientes. En el lago Taihu (China) se reportó que el nitrato explica la mayor variación en la composición de genotipos tóxicos analizada utilizando el gen *mcyJ* y la técnica DGGE (Wang *et al.*, 2012). Estos resultados soportan la

idea de la existencia de ecotipos asociados al régimen de nutrientes. Sin embargo, en los ecosistemas eutróficos o hipertróficos, como lo es el sistema acuático estudiado, los nutrientes no afectan la diversidad de cianobacterias tóxicas y son otras las variables ambientales (temperatura y conductividad) quienes modulan la distribución de los ecotipos tóxicos del CMA (ver Capítulo 1).

En base a ese hallazgo y a las características del sistema estudiado nuestra hipótesis es que el embalse de Salto Grande, el cual presenta altas biomásas y diversidad del CMA durante todo el año, podría ser la principal fuente de organismos tóxicos del CMA que serían transportados río abajo. A medida de que los organismos tóxicos del CMA son transportados aguas abajo del embalse a través del río hacia estuario Río de la Plata, las características ambientales (temperatura, conductividad y turbidez) encontradas en cada sitio irían seleccionando ecotipos adaptados a estas condiciones particulares. En este contexto, los mecanismos de selección que actúan en cada parte del gradiente diferirán según la combinación de estas tres variables ambientales. Por lo tanto, según el modelo de *Stable Ecotype* y *Species Less* (Cohan, 2002), algunos ecotipos podrían mantenerse de forma estable (aquellos que prosperan en la zona de agua dulce del gradiente como el embalse), mientras que otros desaparecerían periódicamente según los niveles de salinidad (desembocadura del río al estuario).

2.8. Conclusiones

En este capítulo se desarrolló un método novedoso para analizar la diversidad de genotipos tóxicos del CMA e identificar ecotipos. Los resultados muestran que la temperatura, la conductividad y la turbidez son las principales variables ambientales que impulsan la diversidad de genotipos tóxicos y modulan la aparición y distribución de ecotipos en el río Uruguay y el Río de la Plata. A lo largo del gradiente ambiental, el CMA sería transportado desde el embalse hacia aguas abajo, llegando hasta el estuario. En dicho recorrido aguas abajo se seleccionan diferentes ecotipos dependiendo de las características ambientales de cada sitio (**Figura 2.6**).

El método estadístico utilizado en el presente trabajo (f CART) demostró ser una técnica útil para clasificar los genotipos tóxicos del CMA en función de sus perfiles de *melting* de HRMA en base a variables ambientales con un alto poder discriminatorio. El árbol óptimo obtenido del análisis f CART presentó un error menor en comparación con el error del árbol obtenido por permutaciones aleatorias, lo que apoya la robustez del resultado obtenido. Este estudio es el primer trabajo en combinar una técnica molecular altamente sensible (HRMA) y el análisis de datos funcionales (f CART), proporcionando una poderosa herramienta para detectar ecotipos y los principales mecanismos y variables ambientales que impulsan su selección.



Figura 2.6. Esquema de trabajo, indicando la escala espacial y temporal, variables de respuesta estudiadas y su método de análisis, las variables explicativas utilizadas en el Capítulo 2 y los principales resultados obtenidos en el mismo.

El contenido de este capítulo fue publicado en forma "*pre-print*" en bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory).

Capítulo 3

Efecto de los embalses en la proliferación y toxicidad del complejo *Microcystis aeruginosa*: Salto Grande (río Uruguay)

3.1. Resumen

Los embalses se caracterizan por presentar tiempos de residencia y concentración de nutrientes altos, condiciones que favorecen las floraciones de cianobacterias. Sin embargo, no existe una visión común sobre sus efectos en la producción de toxinas y la diversidad de poblaciones tóxicas, aspectos clave para predecir el riesgo en los ecosistemas acuáticos. Teniendo en cuenta dicho vacío de información, se eligió el embalse de Salto Grande por ser un sitio con frecuentes floraciones del Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) para estudiar la relación entre las variables ambientales e indicadores de toxicidad y diversidad del CMA. Se realizaron muestreos en invierno y verano, dentro y fuera del embalse y se evaluó la estructura de toda la comunidad del CMA (secuenciación del espaciador de ficocianina PC-IGS), la diversidad (HRMA del gen *mcyA*) y la actividad de la fracción tóxica (transcripción de genes *mcy* por qPCR). Tanto la expresión de genes *mcy* como la abundancia de genotipos tóxicos disminuyeron con mayores turbidez y conductividad. Asimismo, se observó que tanto en verano como en invierno la transcripción de genes *mcy* y la abundancia de genotipos tóxicos fue mayor dentro del embalse. Al analizar la diversidad del CMA se encontró que tanto la diversidad total (tóxicas y no tóxicas), como la diversidad de la fracción tóxica fue afectada por la temperatura. Como consecuencia, se detectaron dos ecotipos tóxicos diferentes, uno asociado al invierno y otro al verano. Además, cabe destacar que dentro del embalse la diversidad del CMA fue siempre menor que fuera del mismo. Estos hallazgos sugieren que las condiciones ambientales del embalse promueven la dominancia de uno o pocos genotipos tóxicos del CMA cuyo potencial tóxico es alto durante todo el año. Sin embargo, la estructura comunitaria (total y fracción tóxica) difiere entre meses con alta y baja temperatura. Por lo tanto, todo el año hay mayor toxicidad en el embalse a pesar de que la estructura comunitaria cambia entre estaciones.

3.2. Introducción

La presencia de cianotoxinas en el agua resulta de una combinación de factores y procesos incluyendo la presencia de poblaciones tóxicas y condiciones ambientales que favorezca la expresión de los genes que codifican para las toxinas. La microcistina es una de las toxinas más frecuentes en todo el mundo y es sintetizada principalmente por especies del género *Microcystis*. La biosíntesis de las microcistinas se realiza de manera no ribosomal por un complejo enzimático (Fischbach & Walsh, 2006), el cual está codificado por el *cluster* genético *mcy* de 55 kb que contiene 10 genes (*mcyA-J*) (Tillett *et al.*, 2000). Este tiene una regulación genética compleja que involucra diversos sitios de inicio de transcripción (Kaebernick *et al.*, 2002).

Se ha descrito que en las especies del género *Microcystis* la transcripción de los genes *mcy* se inicia en el promotor bidireccional ubicado entre los genes *mcyA* y *mcyD* (Tillett *et al.*, 2000; Kaebernick *et al.*, 2002). Dentro del promotor, se han descrito dos sitios de inicio de la transcripción alternativos tanto para *mcyA* como para *mcyD* que parecen ser dependientes de la intensidad de la luz (Kaebernick *et al.*, 2002). Además, se identificaron sitios de inicio de transcripción putativos para los genes *mcyE*, *mcyF*, *mcyG*, *mcyH*, *mcyI* y *mcyJ* pero no para *mcyB* ni *mcyC* indicando que existe una regulación genética compleja que involucra múltiples y alternativos sitios de inicio de transcripción (Kaebernick *et al.*, 2002).

El promotor bidireccional posee una caja Fur (regulador de la absorción férrica) y NtcA (factor de transcripción de nitrógeno) (Ginn *et al.*, 2010). La participación de NtcA es particularmente interesante ya que potencialmente vincula la síntesis de microcistina directamente con los componentes del metabolismo energético (Alfonso *et al.*, 2001; Tanigawa *et al.*, 2002; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2005). Lo que podría aportar a la hipótesis de que la síntesis de la toxina tendría un costo energético y estaría asociada a mayores concentraciones de nutrientes y mayores temperaturas.

Diversos trabajos han analizado la expresión de genes *mcy* para determinar cuáles son las variables ambientales que influyen en la síntesis de microcistinas. En este sentido, se ha reportado que altas intensidades de luz ($68 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inducen la expresión de los

genes *mcyB* y *mcyD* (Kaebernick *et al.*, 2000) y que la falta de hierro induce la transcripción del gen *mcyD* (Sevilla *et al.*, 2008), al igual que la deficiencia en fósforo (Kuniyoshi *et al.*, 2013). Por otro lado, el aumento de la temperatura incrementa la síntesis de microcistinas (Dziallas & Grossart, 2011; Walls *et al.*, 2018). Además, el aumento de la salinidad inhibe la expresión del gen *mcyD* y la síntesis de microcistinas (Tonk *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015).

La síntesis de microcistinas también depende del tamaño de los organismos de CMA y de su estructura comunitaria, aspectos directamente relacionados con las condiciones ambientales (Kardinaal & Visser, 2005; Hu *et al.*, 2016; Kruk *et al.*, 2018). En este sentido, experimentos de competencia entre genotipos tóxicos y no tóxicos demostraron que la síntesis de microcistina favorece el crecimiento de genotipos tóxicos en condiciones de alta intensidad de luz, limitación de carbono y temperaturas elevadas (>30 °C) (Jähnichen *et al.*, 2007; Dziallas & Grossart, 2011; Van de Waal *et al.*, 2011).

La combinación de distintos factores actuando a distintos niveles de organización (desde genes hasta comunidades) determina que la presencia de cianotoxinas y su concentración en una floración sea altamente variable. Esta variabilidad depende de la morfología de los organismos y de su genotipo, de las poblaciones presentes, y la estructura comunitaria, así como de las interacciones biológicas y las condiciones ambientales predominantes. Todo esto se asocia a la historia del ecosistema, a sus conexiones con otros ecosistemas y a su ubicación geográfica.

El efecto ambiental que genera el embalsamiento de los ríos ha sido descrito detalladamente (Vörösmarty *et al.*, 2010). Los embalses crean cuerpos de agua lénticos, lo que afecta a los regímenes de flujo y temperatura, al transporte de sedimentos y de los organismos (Roberts, 2001; Vörösmarty *et al.*, 2010; Liermann *et al.*, 2012). Por lo tanto, estas alteraciones de los cursos de agua presentan impacto a nivel del hábitat de los organismos acuáticos, lo que lleva a una pérdida de biodiversidad (Roberts, 2001; Hall *et al.*, 2011; Liermann *et al.*, 2012).

La influencia de los factores ambientales sobre la síntesis de microcistinas todavía es un tema en discusión. La información generada sobre cómo influyen las variables ambientales en la síntesis de toxinas se basan principalmente en experimentos con cultivos monoespecífico y generalmente unicelulares, lo cual implica que los organismos no se encuentran es

su estado natural. Por lo tanto es necesario realizar estudios *in situ* para comprender la influencia de las variables ambientales en la síntesis de toxinas. En este sentido, este estudio se enfocó en la zona del embalse de Salto Grande donde previamente se ha identificado la presencia frecuente de floraciones de cianobacterias del CMA.

3.3. Objetivo

El objetivo de este capítulo fue conocer la influencia del embalsamiento del agua sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de microcistinas, así como también sobre la distribución y la estructura de la comunidad del Complejo *Microcystis aeruginosa* y de su fracción tóxica.

3.4. Estrategia de investigación

Se evaluaron tanto las relaciones entre diferentes variables ambientales y la toxicidad del CMA como su estructura comunitaria. Para ello, se tomaron muestras de agua en sitios dentro del embalse, aguas arriba y aguas abajo del mismo, tanto en verano como en invierno. En algunos de estos sitios se ha identificado previamente la presencia de floraciones de cianobacterias del CMA. Se cuantificó la abundancia de genotipos tóxicos mediante qPCR y se analizó su diversidad con la técnica HRMA. Se emplearon las herramientas desarrolladas en los capítulos 1 y 2 de esta tesis y en Martínez de la Escalera *et al.* (2017), basadas en la amplificación de genes *mcy* (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*) para cuantificar por qPCR, y *mcyJ* para diversidad por HRMA). Además, se puso a punto la extracción de ARN a partir de muestras naturales y su posterior retro-transcripción (RT) para obtener ADN copia (ADNc) que fue utilizado para cuantificar los transcritos de los genes *mcy*.

Para analizar la diversidad del CMA (fracción tóxica y no tóxica) se diseñó una estrategia

basada en la amplificación y secuenciación del espaciador intergénico del operón de ficocianina (PC-IGS), presente en todas las cianobacterias por ser parte del aparato fotosintético, utilizando *primers* específicos para la amplificación de los organismos del CMA. Se cuantificó asimismo la abundancia de organismos del CMA mediante la amplificación del PC-IGS por qPCR utilizando *primers* específicos para la amplificación de los organismos del CMA. Una vez obtenida la abundancia de células con genotipo tóxico (genes *mcy*) y la abundancia total (PC-IGS), se calculó la proporción de células con genotipo tóxico en relación al total del CMA: $(\text{número de copias de genes } mcy / \text{número de copias de PC-IGS}) \times 100$. Así, se obtuvo información sobre la diversidad del CMA a varios niveles: a nivel de todo el CMA (análisis del espaciador intergénico del operón de ficocianina), a nivel de los genes que codifican para microcistinas (*mcy*) y a nivel de la variabilidad exhibida por uno de estos genes (*mcyJ*). Su combinación con el análisis de la transcripción génica y la medida de variables ambientales brindó conocimiento acerca de los procesos que estimulan la producción de toxinas en el ecosistema (**Figura 3.1**).

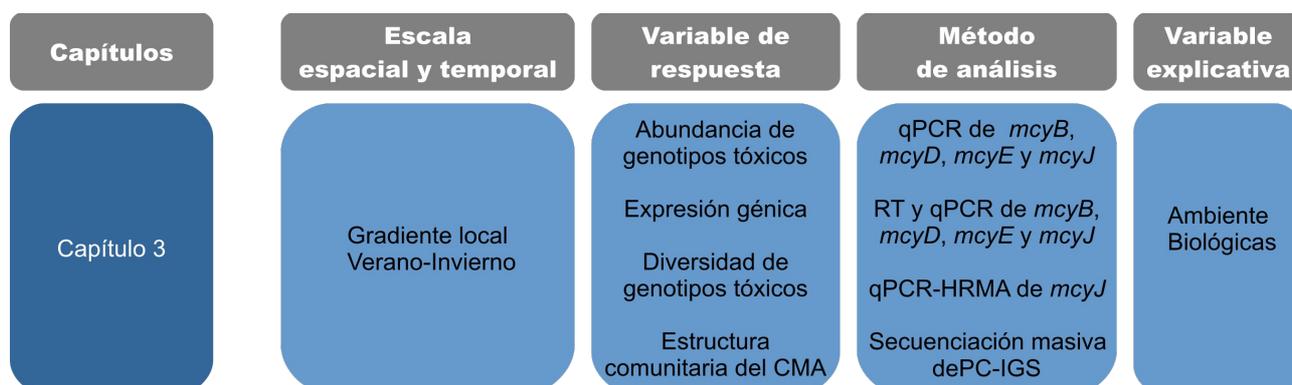


Figura 3.1. Esquema de trabajo indicando la escala espacial y temporal, las variables de respuesta estudiadas y su método de análisis, y las variables explicativas.

3.5. Metodología

3.5.1. Muestreo

Las muestras de agua provienen de cinco sitios de la zona del embalse de Salto Grande; tres se ubican dentro del embalse (Gualeguaycito, Itapebí y Playa Grande Federación), uno

aguas arriba del embalse (Bella Unión) y otro aguas abajo (Puerto Yeruá) (**Figura 3.2**). Se realizaron dos campañas de muestreo en verano (enero y febrero) y una en invierno (junio). Se llegó a un total de 15 casos. Se midieron variables meteorológicas incluyendo intensidad del viento (m/s) y temperatura del aire (°C). Se midió además la profundidad (m) y la turbidez (NTU), oxígeno disuelto (mg/L), conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y temperatura del agua (°C), subsuperficialmente en la columna de agua. Se tomaron muestras de agua subsuperficiales para realizar los análisis moleculares. Además se contó con información de la abundancia de cianobacterias totales (células/ml), cuantificada por conteo en microscopio, y la concentración de clorofila-a (mg/m^3), determina mediante extracción con etanol y medida por absorbancia. Estos datos fueron proveídos por la Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU).

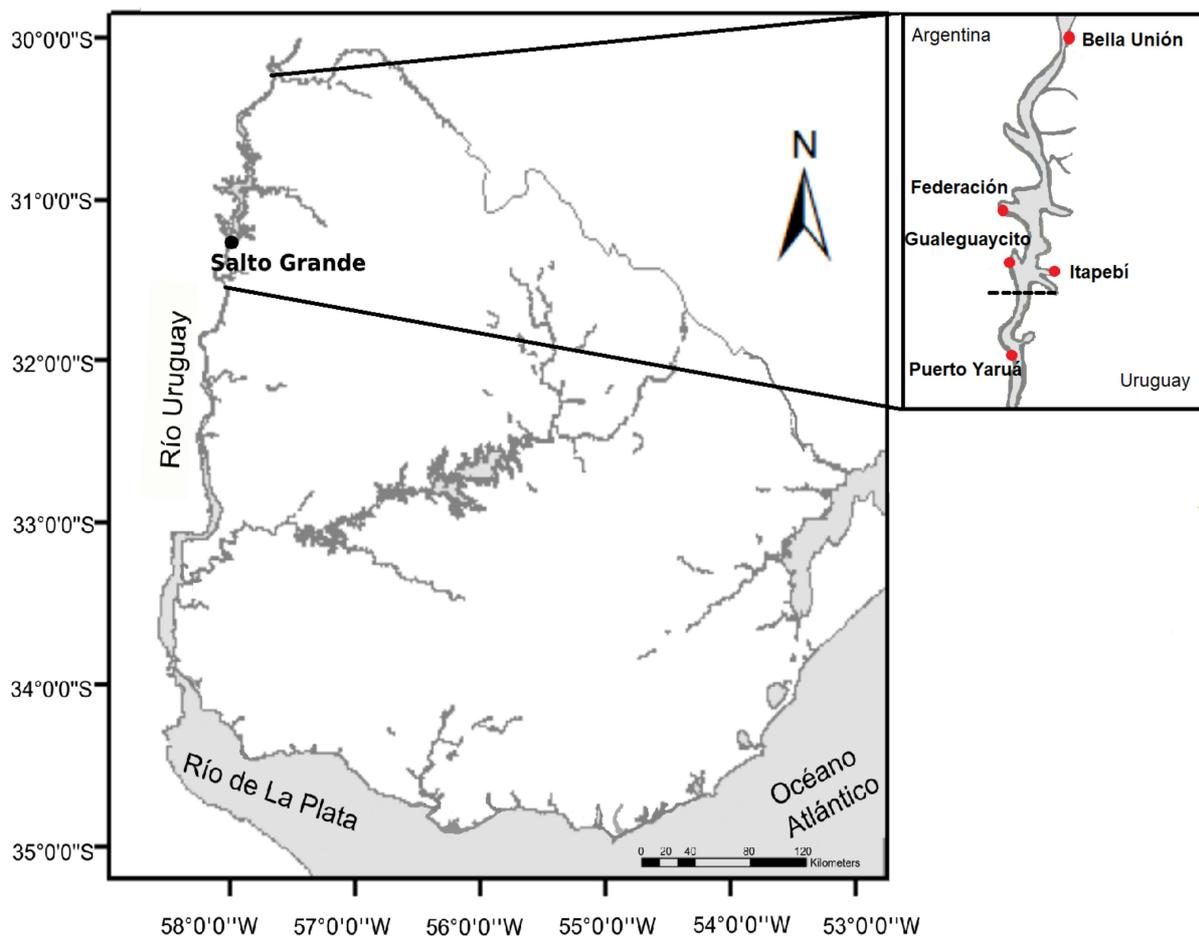


Figura 3.2. Mapa de los sitios de la zona del embalse de Salto Grande que fueron evaluados. Los puntos rojos refieren a las estaciones de muestreo: Bella Unión, Federación, Gualaguaycito, Itapebí y Puerto Yeruá.

3.5.2. Extracción de ácidos nucleicos

A partir de las muestras obtenidas se empleó un método fisicoquímico para la extracción de ADN de muestras de agua (modificado de Martínez de la Escalera *et al.*, 2014). Se filtraron entre 250-300 ml de agua en filtros de membrana de celulosa de 0,45 μm de poro (Millipore). La lisis celular se realizó utilizando *beads* de cerámica de 2 mm de diámetro, junto con buffer de extracción con 1% de CTAB. El filtro fue colocado junto con las *beads* y el buffer de extracción en tubos de 2 ml estériles y se homogeneizaron durante 40s a 6 m/s en el equipo *fastprep* (MP Biomedicals). Posteriormente, se separó el ADN utilizando cloroformo : isoamilalcohol y luego se precipitó con isopropanol durante una hora a temperatura ambiente y se lavó con etanol 70 % v/v frío (Apéndice 1). Para la extracción de ARN, los filtros se conservaron en RNAlater (Ambion) inmediatamente de ser filtrada la muestra de agua (250-300 ml aprox.) y se conservaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. Se utilizó el kit Pure Link RNA (Life Technologies) para extracción de ARN, para ello se colocó el filtro en tubos estériles con *beads* de cerámica de 2 mm de diámetro, junto con 800 μl del buffer de extracción y 10 μl de b-mercaptoetanol cada 1 ml de buffer de extracción. Luego se homogeneizaron durante 40s a 6 m/s en el equipo *fastprep* (MP Biomedicals) y se centrifugaron a 5000 g por 1 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó el mismo volumen de etanol absoluto (100%). Luego se continuó con el protocolo descrito para el kit Pure Link RNA (Life Technologies). El ARN extraído fue sometido a tratamiento con DNasa I, siguiendo el protocolo descrito en el kit (Invitrogen) utilizando 5 μl del ARN extraído. Luego este fue sometido a RT para la producción de ADNc (kit High Capacity RNA to cDNA, Invitrogen). Durante todo el proceso de obtención del ADNc las muestras se mantuvieron en frío. La pureza del ADN y ARN se determinó por espectrofotómetro para micro-volúmenes (Nanodrop).

3.5.3. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

La cuantificación de la abundancia de organismos del CMA tóxicos y no tóxicos y la expresión de los genes *mcy* se determinó mediante qPCR. Se puso a punto la técnica de qPCR para la amplificación del espaciador intergénico del operón de ficocianina (PC-IGS) utilizando *primers* específicos de la literatura para la detección de la población total del CMA, *forward*: 5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3' (Neilan *et al.*, 1995; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001), *reverse*: 5'-GAATCAGCGGCTGCTACGGC-3' (esta tesis). Para las reacciones se usó el kit Power SYBR Green PCR (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20 μl : 9,5 μl

de agua, 0,5 µl de BSA (30 mg/ml), 7,76 µl de mix (Power SYBR Green PCR), 0,12 µl de cada primer (50 µM) y 2 µl de ADN de la muestra. El termociclador utilizado para los ensayos de qPCR fue Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO RAD) y las condiciones de ciclado fueron 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C. Al final se realizó la curva de *melting* desde 65°C a 95°C, en incrementos de 1 °C cada 4 sec. para confirmar la especificidad del fragmento amplificado. Por otro lado, se aplicó el mismo procedimiento de qPCR utilizado en el Capítulo 1 dirigido a los genes del *cluster mcy* (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*) para cuantificar la abundancia de genotipos tóxicos y la expresión de los genes.

3.5.4. Curva de calibración y cuantificación de copias del gen

La eficiencia de amplificación de los genes fue determinada empleando el gen clonado en vectores (plásmidos). Para la clonación del PC-IGS se utilizó una muestra conocida del embalse de Baygorria dominada por una única mofro-especie del género *Microcystis*, el vector TOPO 2.1 (TOPO-TA cloning kit, Invitrogen) y células competentes *Escherichia coli* (Apéndice 1). Para cuantificar el número de copias de cada gen en las muestras se realizaron diluciones seriadas de los genes clonados 1/10 a 1/100000, se realizó el ajuste de la curva y se determinó el número de copias por microlitro. Una vez conocido el número de copias génicas que contenía cada reacción de PCR se calculó el número original de copias en la muestra de agua. Este procedimiento se realizó tanto para la cuantificación de la abundancia de los genes *mcy* y PC-IGS así como también para la cuantificación absoluta de la abundancia de los transcritos de los genes *mcy*.

3.5.5. Análisis de la diversidad del CMA

Se analizó la diversidad de la comunidad del CMA y de su fracción tóxica. Para ello se realizó secuenciación masiva de amplicones del intergénico PC-IGS para el estudio de la diversidad de toda la comunidad del CMA. Por otro lado, se utilizó la técnica HRMA para el estudio de la diversidad de organismos tóxicos del CMA mediante el análisis de la variabilidad del gen *mcyJ*.

- Secuenciación del espaciador intergénico del operón de ficocianina PC-IGS

La diversidad genética del CMA se analizó mediante secuenciación masiva del espaciador

intergénico del operón de ficocianina (PC-IGS) (Neilan *et al.* 1995; Do Carmo Bittencourt-Oliveira *et al.* 2001) empleando el equipo *ion torrent* PGM (Life Technology) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Previo a la secuenciación se amplificó por PCR tiempo final el espaciador PC-IGS utilizando *primers* específicos, *forward*: 5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3' (Neilan *et al.*, 1995; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001), *reverse*: 5'-GAATCAGCGGCTGCTACGGC-3' (esta tesis), que contienen los adaptadores y códigos de barra necesarios para la secuenciación. Las lecturas ("*reads*") obtenidas se analizaron con el programa QIIME (Kreisinger, 2014). Se eliminaron las secuencias de los adaptadores, códigos de barra y *primers*. Luego los *reads* se filtraron en base a la calidad de secuencia (*quality score* > 25), tamaño del amplicón (300 pb) y se eliminaron las quimeras. Se asignaron OTUs (del inglés: *Operational Taxonomic Unit*, Unidad Taxonómica Operativa) al 97 % (Huo *et al.*, 2018) de identidad de secuencia y se eliminaron aquellas cuya abundancia fue menor o igual a cinco en el total de las muestras. Por último, se calcularon índices de diversidad alfa utilizando la abundancia de OTUs en cada muestra.

- HRMA de organismos con el gen *mcyJ*

El análisis de la diversidad de poblaciones tóxicas se realizó utilizando la técnica HRMA del gen *mcyJ* y la metodología desarrollada en el Capítulo 2. Previamente todas las muestras se llevaron a una misma concentración de ADN de ~30 ng/μl. Para las reacciones de qPCR-HRMA se empleó el kit MeltDoctor HRMA (Invitrogen), el termociclador Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO RAD) y software Bio-Rad Precision Melt Analysis. Las curvas del *melting* se normalizaron al mismo nivel de fluorescencia (RFU) usando las regiones pre y post *melting*. Los valores normalizados de RFU se usaron para los análisis estadísticos (*t*-CART). Todas las muestras se analizaron por duplicado y se utilizaron *primers* específicos de la literatura dirigidos al gen *mcyJ* (Kim *et al.*, 2010).

3.5.6. Análisis de datos

Se evaluó la existencia de diferencias significativas de las variables ambientales y biológicas entre sitios y entre meses utilizando el método LRT y las comparaciones pareadas mediante el test *pos-hoc* de Tukey. Se utilizó la correlación bivariada de Spearman (r_s) para identificar las variables ambientales correlacionadas con la abundancia de genotipos tóxicos (genes *mcy*) y la abundancia de transcritos de los genes *mcy*. Modelos lineales generalizados (GLM) con distribución gamma y función de *link* log fueron utilizados para

identificar que variables ambientales explicaban la abundancia de genotipos tóxicos (genes *mcy*), y la expresión de genes *mcy* en términos de abundancia de transcritos. En todos los casos las variables ambientales analizadas fueron: intensidad del viento (viento), temperatura del agua (Temp), turbidez (Tur) y conductividad (K). Los modelos fueron construidos usando *backward selection* y los distintos modelos fueron comparados en base a el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham & Anderson, 2002). Para cada modelo GLM se calculó el pseudo- R^2 de la siguiente manera: (devianza nula - devianza residual) / devianza nula; donde la devianza nula corresponde al modelo nulo y la devianza residual corresponde a la estimada por el modelo en cuestión (Veall & Zimmermann, 1996).

Para el análisis de la comunidad global del CMA se calculó la riqueza de cada muestra como el número de OTUs obtenido de la secuenciación del amplicón PC-IGS. Además, se determinó la diversidad alfa utilizando la abundancia de OTUs en cada muestra mediante los índices de Shannon y equitatividad. Se evaluó si existen diferencias de riqueza e índices de diversidad entre los meses aplicando el método LRT. Para describir la relación entre la diversidad de poblaciones tóxicas del CMA y las características ambientales se utilizó el método desarrollado en el Capítulo 2 en el cual se clasifican a las curvas de *melting* obtenidas con la técnica HRMA utilizando árboles de clasificación y regresión funcional (*f*CART) (ver Capítulo 2).

Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico R versión 3.4.2 utilizando los paquetes {rpart}, {fda}, {nlme} y {PMCMR} (R Core Team, 2013; Pinheiro *et al.*, 2014; Pohlert, 2014; Ramsay *et al.*, 2014; Therneau *et al.*, 2015).

3.6. Resultados

3.6.1. Caracterización ecosistémica

La intensidad del viento varió entre situaciones de calma (0 m/s) y brisa ligera (13 m/s) según la escala de Beaufort. La mayor intensidad del viento se observó en los meses de invierno (junio) en Itapebí (**Figura 3.3**). La temperatura superficial del agua varió entre 15 y 31 °C, presentando los mayores valores en el embalse de Salto Grande en el mes de enero y los menores valores en el mes de junio (**Figura 3.3**). Los mayores valores de conductividad se observaron en febrero (media = 78 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (**Figura 3.3**). Bella Unión presentó la mayor variación de conductividad (59-110 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (**Figura 3.3**). La turbidez varió entre 16 y 67 NTU, mostrando mayores valores en la estación aguas arriba del embalse de Salto Grande (Bella Unión) en invierno (junio) (**Figura 3.3**).

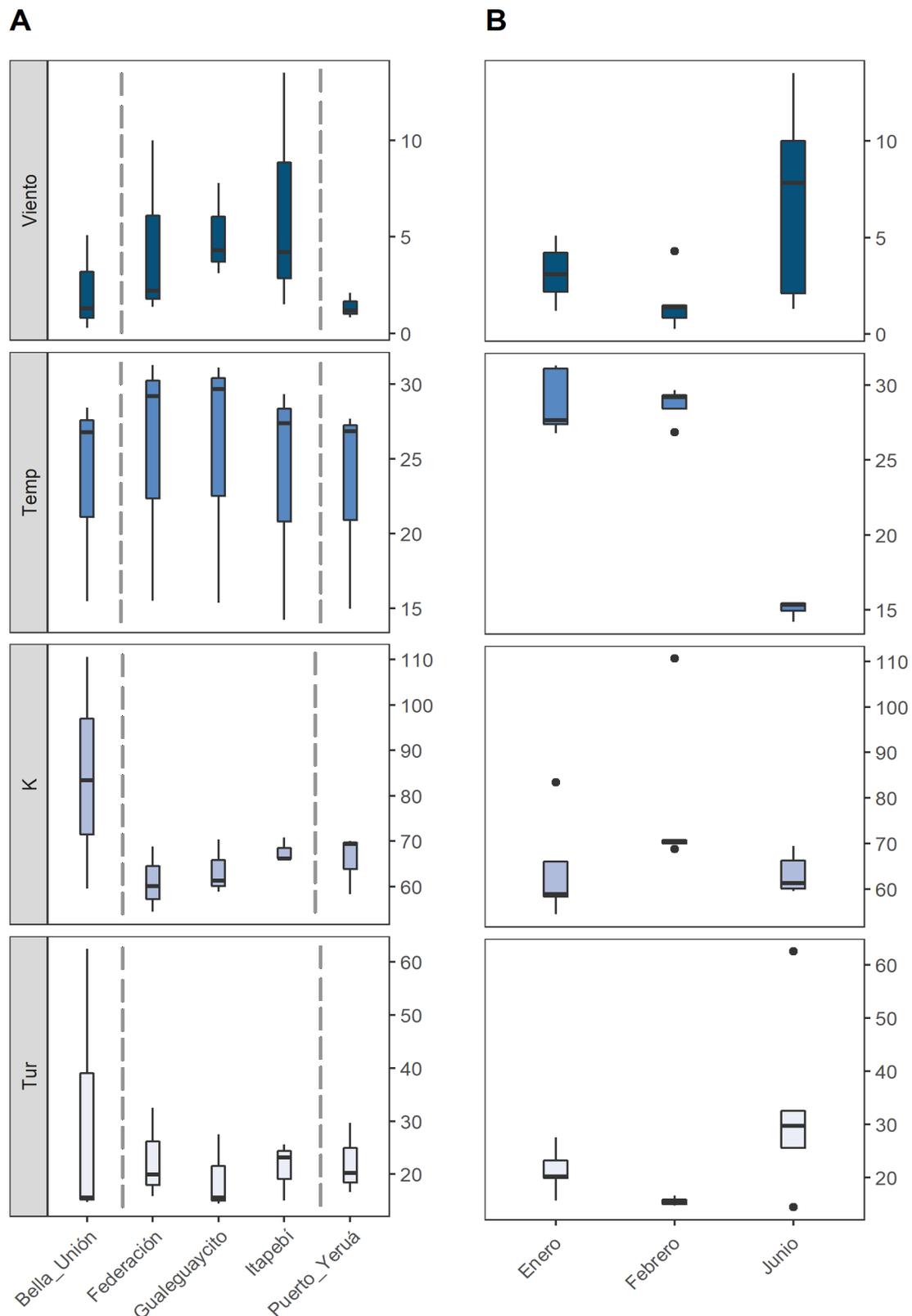


Figura 3.3. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la variación espacial (**A**) y temporal (**B**) de las variables ambientales: Viento (intensidad del viento, m/s), Temp (temperatura, °C), K (conductividad, $\mu\text{s}/\text{cm}$) y Tur (turbidez, NTU). Las líneas punteadas grises señalan los sitios que se encuentran dentro del embalse de Salto Grande.

Las tres variables biológicas (clorofila-a, abundancia de cianobacterias totales y abundancia de organismos del CMA) se correlacionaron positiva y significativamente entre sí (Spearman, r_s varió entre 0,63 y 0,91, $p < 0,05$).

Los valores de clorofila-a (mg/m^3) fueron altos dentro del embalse de Salto Grande (Federación, Gualaguaycito e Itapebí), mientras que los sitios localizados aguas arriba y aguas abajo (Bella Unión y Puerto Yeruá, respectivamente) presentaron bajos valores de clorofila-a (LRT, Tukey $p < 0,05$) (**Figura 3.4**). Un patrón similar se observó para la abundancia de cianobacterias totales (células/ml) sin embargo las diferencias no fueron significativas (LRT $p > 0,05$) (**Figura 3.4**). La abundancia de cianobacterias totales fue máxima en el embalse de Salto Grande y mínima aguas arriba y abajo del embalse (**Figura 3.4**). La abundancia total de organismos del CMA (cuantificada por qPCR de PC-IGS) fue máxima en el embalse de Salto Grande disminuyendo aguas abajo y aguas arriba del mismo (LRT, Tukey $p < 0,05$) (**Figura 3.4**). Por otro lado, los valores de las tres variables biológicas: clorofila-a (mg/m^3), abundancia de cianobacterias (células/ml) y abundancia de organismos del CMA (PC-IGS, copias/ml), presentaron menor variabilidad temporal que espacial (LRT $p > 0,05$) (**Figura 3.4**).

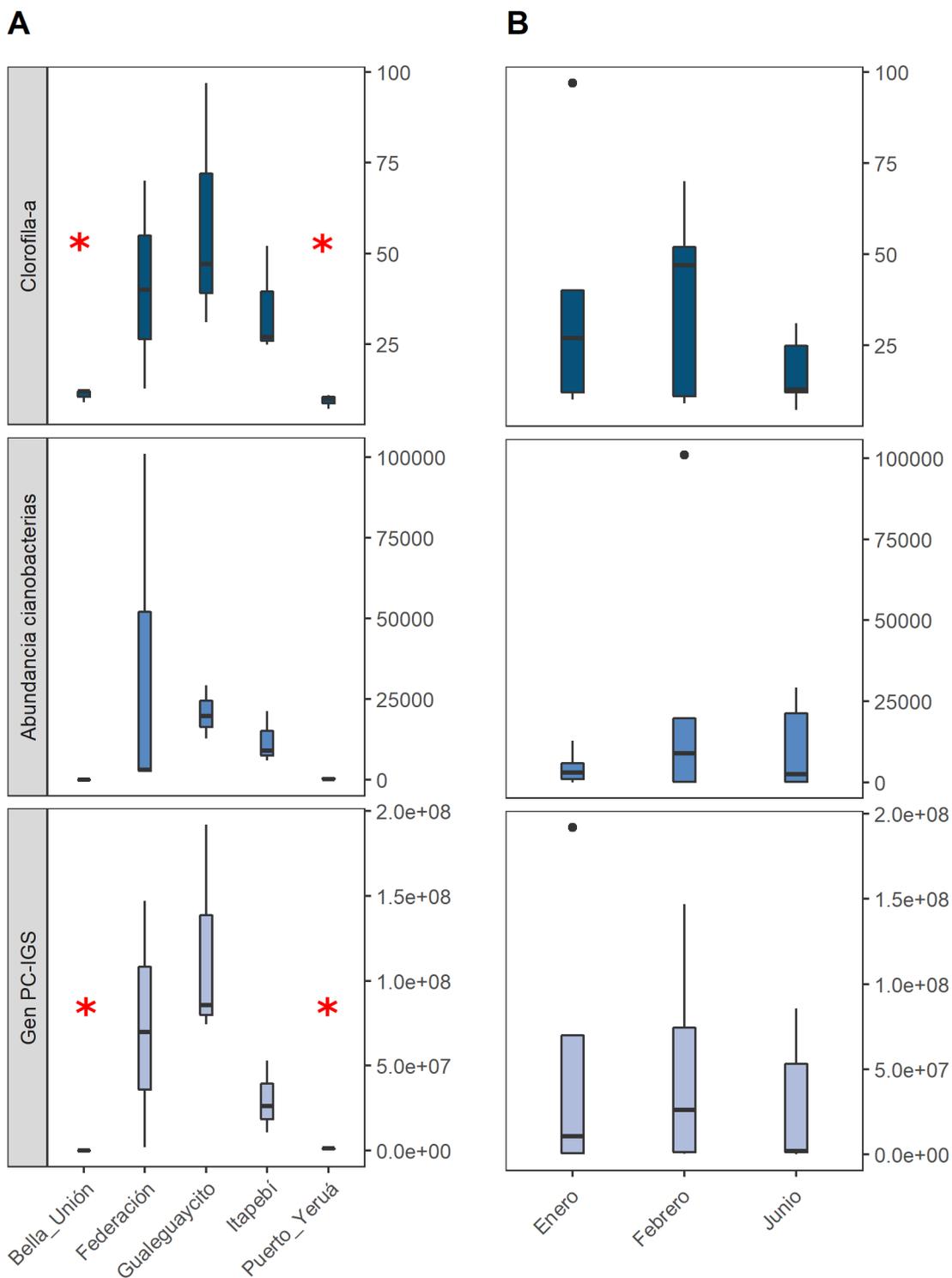


Figura 3.4. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la variación espacial (**A**) y temporal (**B**) de las variables biológicas: Clorofila-a (mg/m^3), Abundancia de cianobacterias (células/ml) y Gen PC-IGS (abundancia de organismos del CMA, copias/ml). El asterisco rojo marca la diferencia significativa entre los sitios dentro y fuera del embalse (LRT, Tukey $p < 0,05$).

3.6.2. Variabilidad espacial y temporal de la abundancia de los genes *mcy*

Se detectó la presencia de células portadoras de los genes *mcy* en todas las fechas y estaciones de muestreo (**Figura 3.5**). Los cuatro genes *mcy* estudiados se correlacionaron de forma positiva y significativa entre sí, los coeficientes de correlación de Spearman (r_s) variaron entre 0,61 y 0,89 ($p < 0,05$). Las abundancias de cada gen analizado (*mcyB*, *mcyE*, *mcyD* y *mcyA*) presentaron el mismo patrón espacial (**Figura 3.5**), máximos valores en el embalse y mínimos aguas arriba y abajo del mismo. Los valores de abundancia más bajos se detectaron en Bella Unión (aguas arriba) (LRT, Tukey $p < 0,05$) (**Figura 3.5**). No se observaron diferencias significativas en el número de copias de ninguno de los genes evaluados entre los distintos meses (LRT, Tukey $p > 0,05$) (**Figura 3.5**).

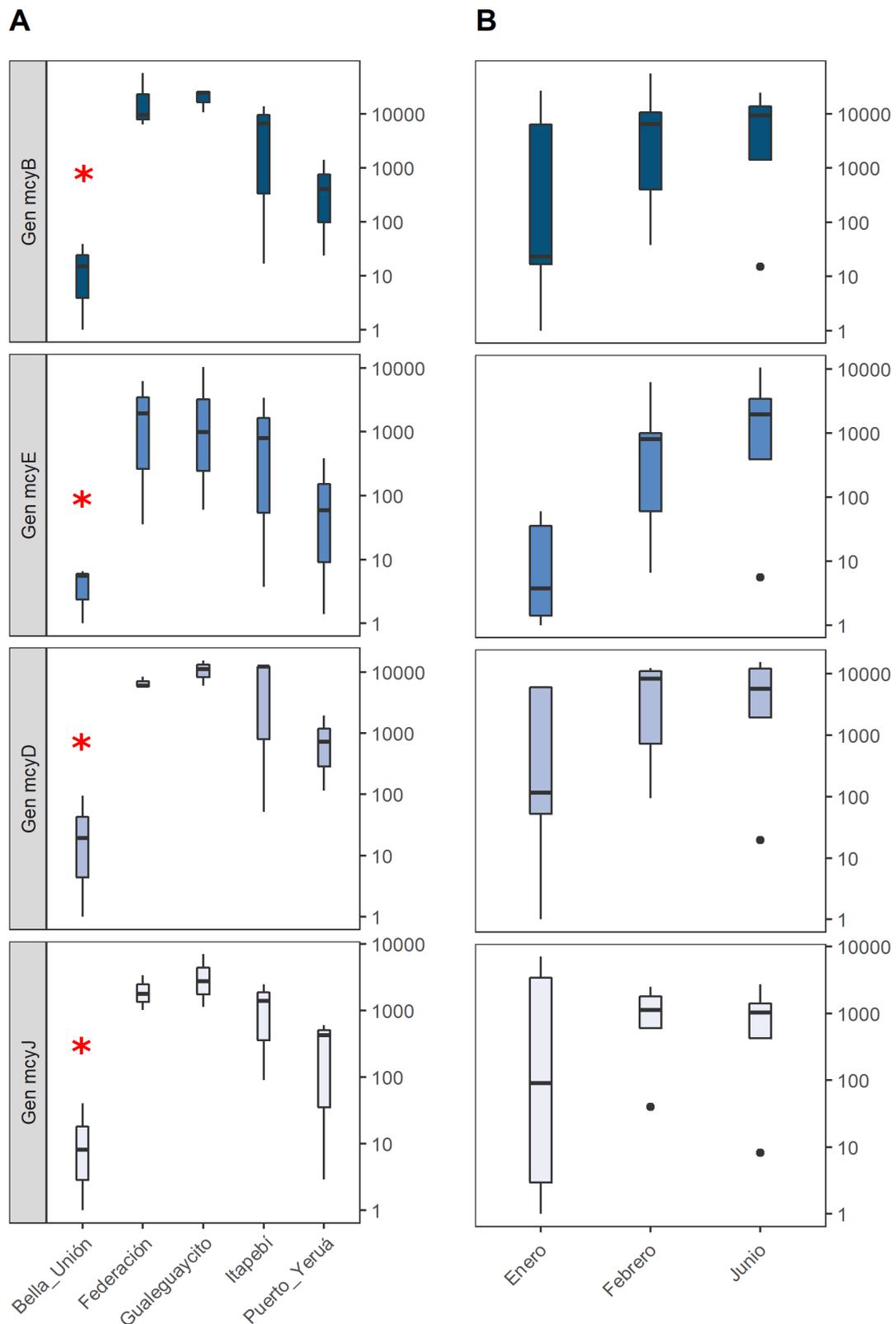


Figura 3.5. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la variación espacial (**A**) y temporal (**B**) del número de copias de los genes *mcy* (*mcyB*, *mcyE*, *mcyD* y *mcyJ*) en copias/ml de agua. Eje Y logaritmizado en base 10. El asterisco rojo marca la diferencia significativa entre los sitios dentro y fuera del embalse (LRT, Tukey $p < 0,05$).

3.6.3. Poblaciones portadoras de genotipos tóxicos: variables ambientales y otros indicadores de cianobacterias

Mediante modelos lineales generalizados se observó una asociación negativa entre la abundancia de células portadoras de genotipo tóxico (cuatro genes *mcy*) y las variables turbidez y conductividad. Sin embargo, no se detectó relación con la temperatura (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Resultados de los modelos de GLM para explicar la abundancia (copias/ml) y transcriptos (copias/ml) de genes *mcy* en base a tres variables ambientales: temperatura (°C), turbidez (NTU) y conductividad (μS/cm). Los valores de los coeficientes y el intercepto que se presentan son significativos, $p < 0,05$.

	Genes	Variables ambientales/coeficientes			Parámetros	
		Temperatura	Turbidez	Conductividad	Valor del intercepto	Pseudo R ²
Abundancia (copias/ml)	<i>mcyB</i>	-	-0,13	-0,15	22,46	0,25
	<i>mcyD</i>	-	-0,13	-0,11	20,47	0,30
	<i>mcyE</i>	-	-0,17	-0,12	22,60	0,36
	<i>mcyJ</i>	-	-0,067	-0,10	14,62	0,30
Transcriptos (copias/ml)	<i>mcyB</i>	-	-0,05	-0,03	5,21	0,32
	<i>mcyD</i>	-	-0,05	-0,06	6,81	0,35
	<i>mcyE</i>	-	-0,05	-0,05	6,75	0,39
	<i>mcyJ</i>	-	-0,05	-0,06	7,24	0,50

El número de copias de los genes *mcy* estudiados se correlacionó de forma positiva y significativa (Spearman, $p < 0,05$) con la abundancia de cianobacterias totales (células/ml) y con la abundancia de organismos del CMA (PC-IGS, copias/ml) (**Tabla 3.2**). La concentración de clorofila-a (mg/m^3) se correlacionó de forma positiva y significativa con la abundancia de los genes *mcyB* y *mcyJ* (Spearman, $p < 0,05$), pero no se encontró correlación con los genes *mcyE* y *mcyD* (Spearman, $p > 0,05$, **Tabla 3.2**). Por otro lado, la proporción de genotipos tóxicos no se correlacionó con ningún indicador de cianobacterias tóxicas estudiado (Spearman, $p > 0,05$).

Tabla 3.2. Valores del coeficiente de correlación de Spearman (r_s) entre la abundancia de cada gen *mcy* (copias/ml) y la abundancia de transcritos de cada gen *mcy* (copias/ml) con otros indicadores de cianobacterias tóxicas: clorofila-a (mg/m^3), abundancia de cianobacterias totales (células/ml), abundancia de organismos del CMA (PC-IGS, copias/ml). Se presentan sólo los valores que fueron significativos, $p < 0,05$.

	Genes	Clorofila-a (mg/m^3)	Cianobacterias totales (células/ml)	Gen PC-IGS (copias/ml)
Abundancia (copias/ml)	<i>mcyB</i>	0,68	0,86	0,90
	<i>mcyD</i>	-	0,63	0,66
	<i>mcyE</i>	-	0,76	0,71
	<i>mcyJ</i>	0,57	0,63	0,83
Transcriptos (copias/ml)	<i>mcyB</i>	0,70	0,90	0,84
	<i>mcyD</i>	0,79	0,73	0,82
	<i>mcyE</i>	0,73	0,91	0,85
	<i>mcyJ</i>	0,73	0,74	0,83

3.6.4. Transcripción de genes *mcy* variación espacial y temporal

Se detectó la presencia de transcritos de genes *mcy* en todas las fechas y estaciones de muestreo al menos una vez (**Figura 3.6**). La abundancia de transcritos de los cuatro genes *mcy* estudiados se correlacionó de forma positiva y significativa entre ellos (Spearman r_s entre 0,70 - 0,98, $p < 0,05$). Al igual que lo observado para la abundancia de genotipos tóxicos y los indicadores generales de cianobacterias, los mayores niveles se registraron en la zona del embalse y los valores mínimos se registraron en Bella Unión (aguas arriba) (LRT, Tukey $p < 0,05$) (**Figura 3.6**). En junio se detectaron los niveles mas altos de transcritos de *mcyB* y *mcyE*, sin embargo, los transcritos de *mcyD* y *mcyJ* tuvieron máximas abundancias en enero (**Figura 3.6**).

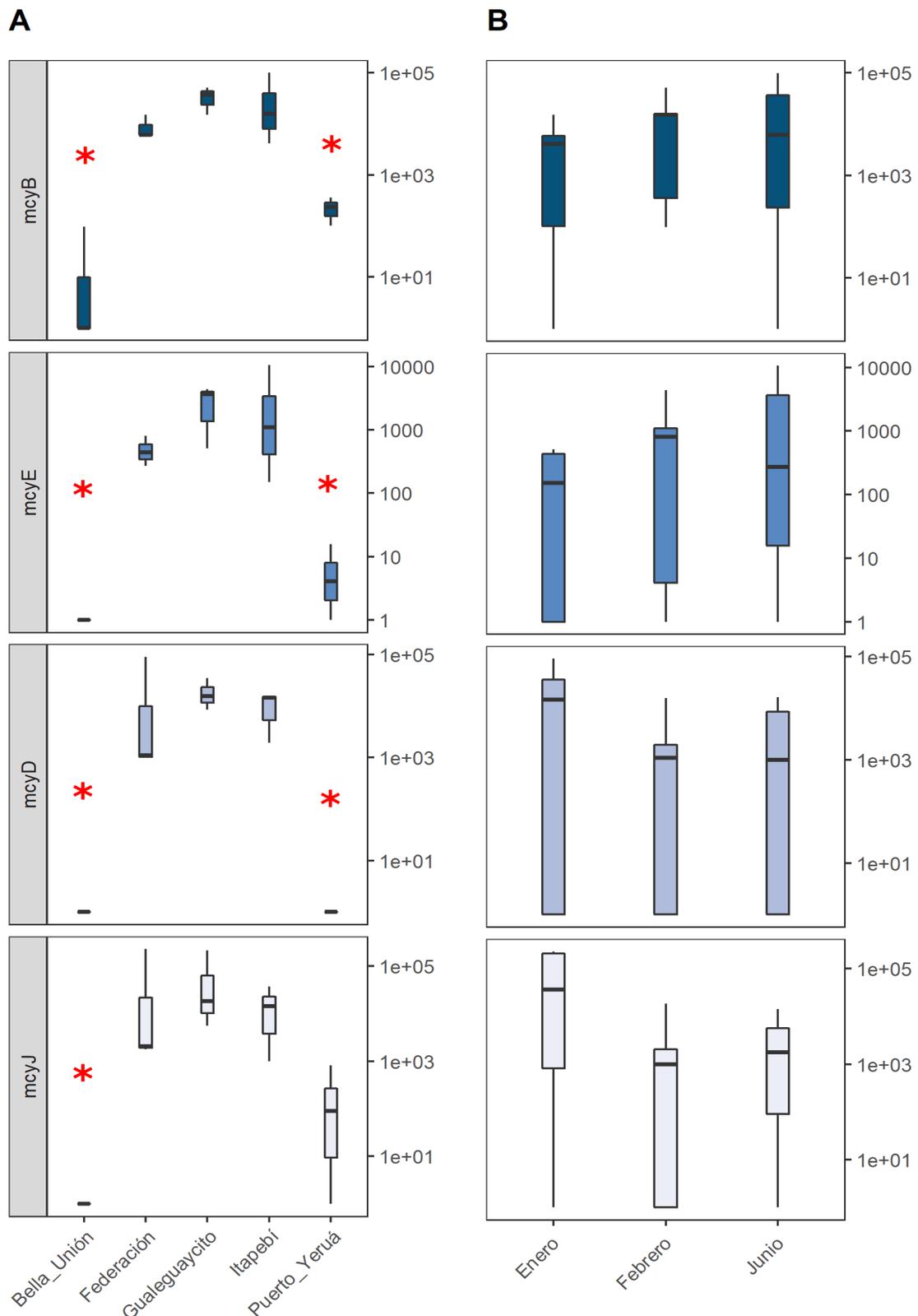


Figura 3.6. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la variación espacial (A) y temporal (B) de las abundancias de transcritos de los genes *mcy* (*mcyB*, *mcyE*, *mcyD* y *mcyJ*) en copias/ml de agua. Eje Y logaritmizado en base 10. El asterisco rojo marca la diferencia significativa entre los sitios dentro y fuera del embalse (LRT, Tukey $p < 0,05$).

3.6.5. Transcripción de los genes *mcy*: variables ambientales y otros indicadores de cianobacterias

Se encontraron asociaciones similares entre la expresión de los cuatro genes *mcy* y las variables ambientales (**Tabla 3.1**). Las variables seleccionadas en los modelos GLM fueron la conductividad y turbidez, y la varianza explicada (p-seudo R²) varió entre 0,32 y 0,50 (**Tabla 3.1**). La conductividad y la turbidez afectaron negativamente la transcripción de todos los genes analizados, mientras que la temperatura no tuvo efecto (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Resultados de los modelos de GLM para explicar la abundancia (copias/ml) y transcriptos (copias/ml) de genes *mcy* en base a tres variables ambientales: temperatura (°C), turbidez (NTU) y conductividad (µS/cm). Los valores de los coeficientes y el intercepto que se presentan son significativos, p<0,05.

Genes	Variables ambientales/coeficientes			Parámetros		
	Temperatura	Turbidez	Conductividad	Valor del intercepto	Pseudo R ²	
Abundancia (copias/ml)	<i>mcyB</i>	-	-0,13	-0,15	22,46	0,25
	<i>mcyD</i>	-	-0,13	-0,11	20,47	0,30
	<i>mcyE</i>	-	-0,17	-0,12	22,60	0,36
	<i>mcyJ</i>	-	-0,067	-0,10	14,62	0,30
Transcriptos (copias/ml)	<i>mcyB</i>	-	-0,05	-0,03	5,21	0,32
	<i>mcyD</i>	-	-0,05	-0,06	6,81	0,35
	<i>mcyE</i>	-	-0,05	-0,05	6,75	0,39
	<i>mcyJ</i>	-	-0,05	-0,06	7,24	0,50

Al analizar la correlación entre la abundancia de transcriptos y la de genotipos *mcy* se encontró una correlación positiva y significativa (Spearman r_s entre 0,62 - 0,85, p<0,05) (**Figura 3.7**).

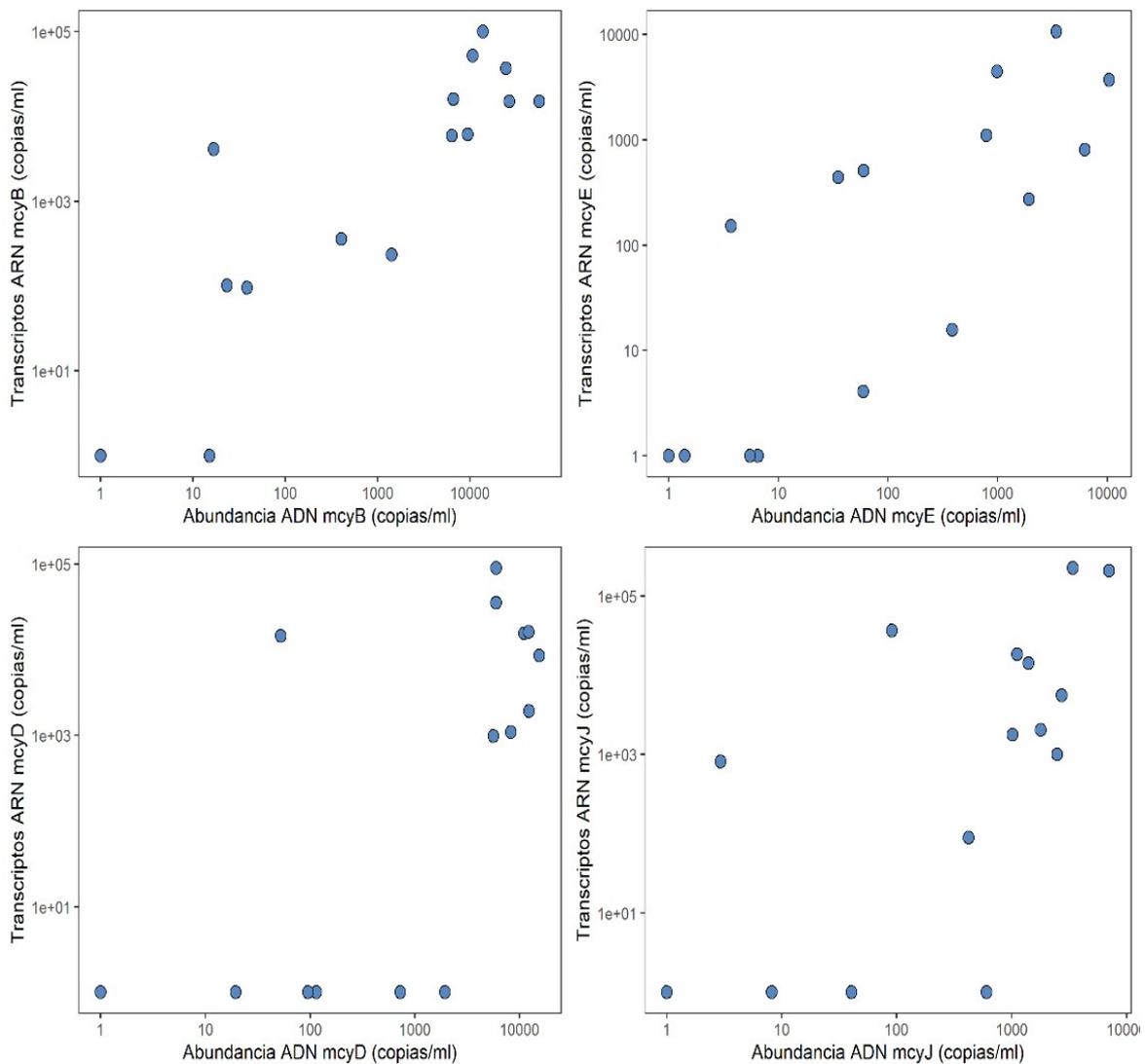


Figura 3.7. Gráficos X e Y de la abundancia de genes *mcy* (X): *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*, y la abundancia de transcritos del mismo gen en X (Y): *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*. Ambos ejes logaritmizados en base 10.

Por otro lado, los demás indicadores de cianobacterias estudiados (clorofila-a, abundancia de cianobacterias y abundancia de PC-IGS) también se correlacionaron de forma positiva y significativa con la abundancia de transcritos (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Valores del coeficiente de correlación de Spearman (r_s) entre la abundancia de cada gen *mcy* (copias/ml) y la abundancia de transcritos de cada gen *mcy* (copias/ml) con otros indicadores de cianobacterias tóxicas: clorofila-a (mg/m^3), abundancia de cianobacterias totales (células/ml), abundancia de organismos del CMA (PC-IGS, copias/ml). Se presentan sólo los valores que fueron significativos, $p < 0,05$.

	Genes	Clorofila-a (mg/m^3)	Cianobacterias totales (células/ml)	Gen PC-IGS (copias/ml)
Abundancia (copias/ml)	<i>mcyB</i>	0,68	0,86	0,90
	<i>mcyD</i>	-	0,63	0,66
	<i>mcyE</i>	-	0,76	0,71
	<i>mcyJ</i>	0,57	0,63	0,83
Transcriptos (copias/ml)	<i>mcyB</i>	0,70	0,90	0,84
	<i>mcyD</i>	0,79	0,73	0,82
	<i>mcyE</i>	0,73	0,91	0,85
	<i>mcyJ</i>	0,73	0,74	0,83

3.6.6. Ecotipos tóxicos del CMA

Se aplicó el método HRMA y f CART desarrollado previamente (Capítulo 2) para evaluar la diversidad de genotipos tóxicos. Este análisis fue aplicado con éxito a las curvas de *melting*, obteniendo un árbol óptimo con dos hojas (**Figura 3.8**). El error sobre la muestra de prueba fue significativamente menor al error calculado en la permutación aleatoria (LRT, $p < 0,05$). El análisis de f CART presentó como resultado que la temperatura del agua (Temp) fue la única variable ambiental que explicó las diferencias entre los grupos de genotipos tóxicos observados, con un valor umbral de 21,1 °C en el nodo raíz (**Figura 3.8**). De acuerdo con este análisis, las demás variables ambientales incluidas (turbidez y conductividad) no fueron relevantes para determinar la composición de la comunidad de genotipos tóxicos. En base a estos resultados se definieron o identificaron dos ecotipos tóxicos en función de la temperatura: uno que proliferó en verano y otro en invierno.

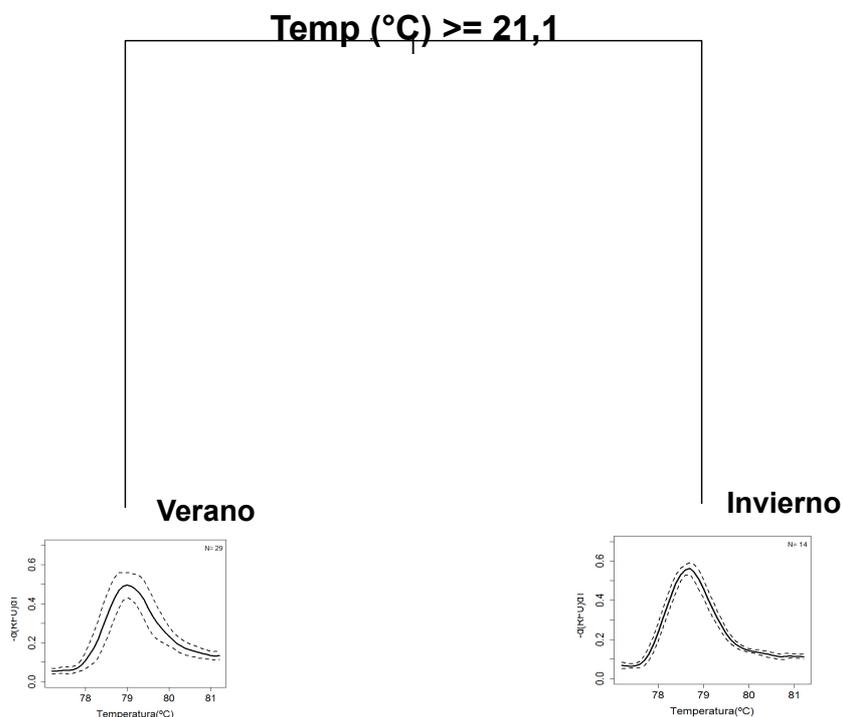


Figura 3.8. Árbol de regresión funcional que muestra las principales variables ambientales que explican la diversidad de genotipos tóxicos. En cada nodo, se muestran la variable ambiental y su valor umbral. La temperatura del agua (Temp) fue la única variable ambiental en explicar las diferencias entre las comunidades de genotipos tóxicos observadas, con un valor umbral de 21,1 °C en el nodo raíz. Al final de cada rama se muestra el pico de *melting* promedio (línea continua) y su desviación estándar (línea discontinua) que representa la comunidad de genotipos tóxicos.

3.6.7. Variación estacional y temporal de la proporción de genotipos tóxicos

La proporción de genotipos tóxicos, calculada a partir de los valores máximos de la abundancia de los genes *mcy*, fue mayor en invierno y en Federación, sin embargo estas diferencias no fueron significativas en la media (LRT, Tukey $p > 0,05$) pero sí en la varianza (LRT, $p < 0,05$) (**Figura 3.9**). Los valores mínimos se registraron en enero y en los sitios que se encuentran dentro de embalse (Guaqueguaycito e Itapebí) y aguas arriba del mismo (Bella Unión) (**Figura 3.9**). Cuando se analizaron estas proporciones estimadas a partir de la abundancia de cada gen *mcy* por separado, se observó que presentaron tendencias espaciales y temporales similares, valores mínimos dentro del embalse de Salto Grande y en el mes de enero (Apéndice 2). En general, las proporciones estuvieron correlacionadas positivamente (r_s : 0,61 - 0,91, $p < 0,05$, Apéndice 2). Teniendo en cuenta que tanto la abundancia

de genotipos *mcy* como su transcripción fueron siempre mayores dentro del embalse (no presentaron diferencias estacionales), su disminución relativa al total de la comunidad indica que las condiciones del embalse promovieron la proliferación de poblaciones no tóxicas.

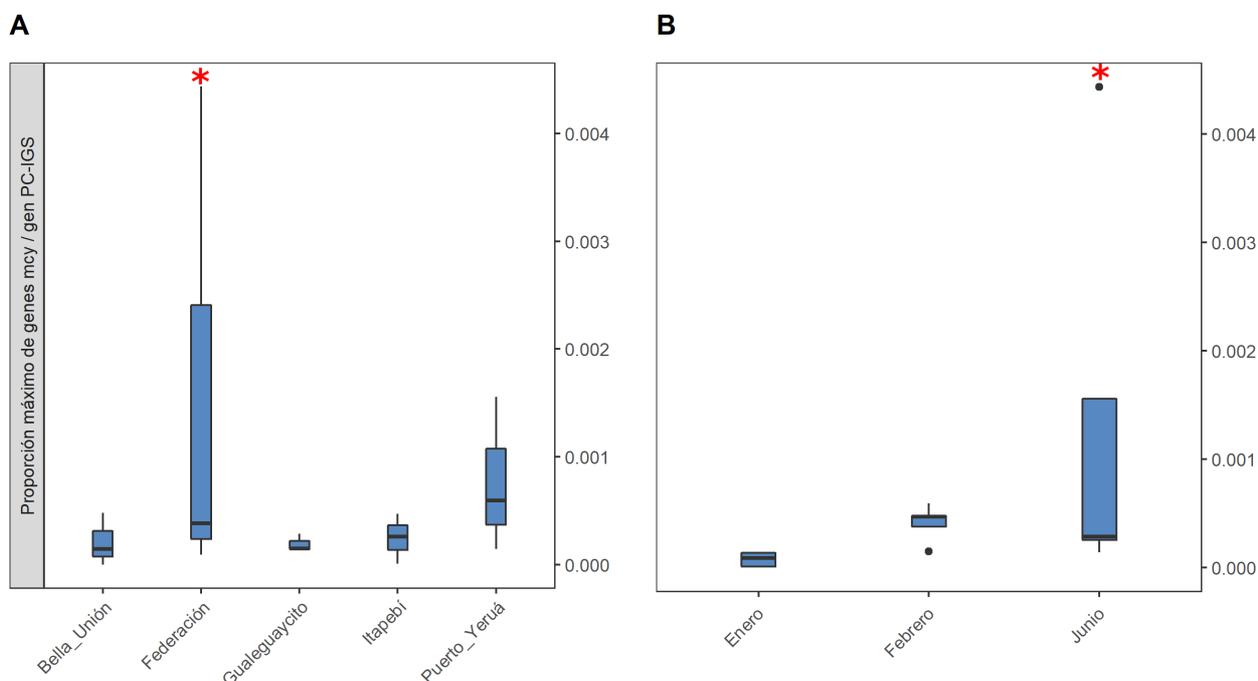


Figura 3.9. Box-plot que muestran las medianas, los rangos intercuartiles, el máximo, mínimo y valor atípico de la variación espacial (A) y temporal (B) de la proporción de genotipos tóxicos calculada con el máximo de abundancia de genes *mcy*. El asterisco rojo marca la diferencia significativa de la proporción de genotipos tóxicos entre los sitios o meses de muestreo (LRT, Tukey $p < 0,05$).

3.6.8. Diversidad del CMA (tóxicas y no tóxicas)

- Descripción de la comunidad

Mediante secuenciación del amplicón de PC-IGS se detectaron en total 2337 OTUs (unidad taxonómica operativa). Todos los sitios compartieron la misma OTU dominante (OTU 6396) (**Figura 3.10**), tanto en verano como en invierno, la cual presentó homología (98 %) con secuencias del espaciador PC-IGS de una cepa de *Microcystis aeruginosa*. Además, en verano se encontró otra OTU en alta abundancia en todos los sitios (OTU 12331) (**Figura**

3.10) que se asoció con una cepa de *Microcystis weissenbergii* (97 % identidad). Por otro lado, se encontraron otras dos OTUs que aumentan su abundancia al pasar de verano a invierno (OTU 9918 y 5027), las cuales presentaron homología con *Microcystis panniformis* y *Microcystis flos aquae*, respectivamente.

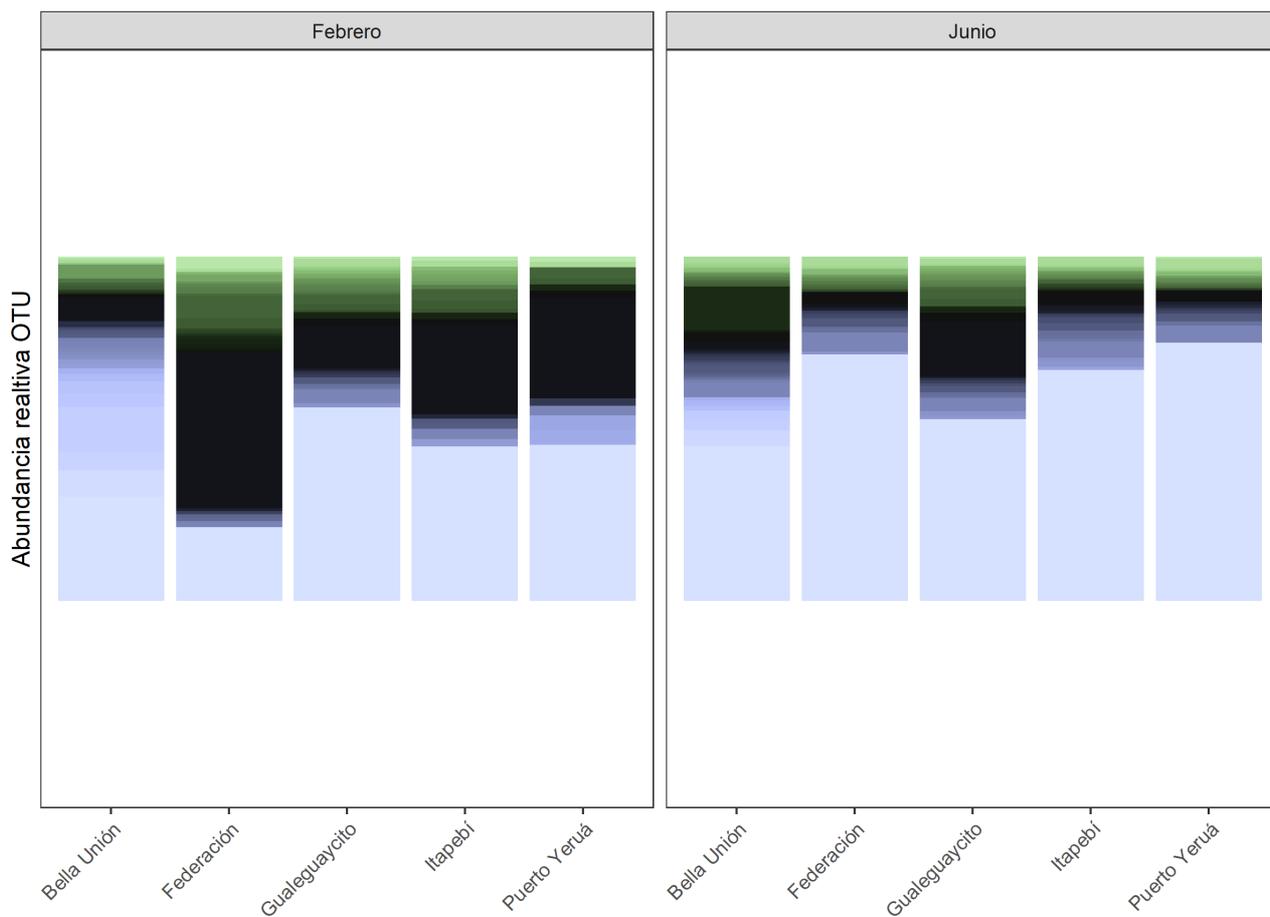


Figura 3.10. Abundancia relativa de las OTUs presentes en cada sitio de muestreo (Bella Unión, Federación, Gualeguaycito, Itapebí y Puerto Yerúa) por mes, febrero (izquierda) y junio (derecha).

OTUs a destacar:
 OTU 6396
 OTU 12331
 OTU 5027
 OTU 9918

- Riqueza y diversidad del CMA

La riqueza (número de OTUs) fue significativamente mayor en invierno en todos los sitios. En verano, el rango fue de 915 a 1505 OTUs y en invierno entre 1241 y 1551 (LRT, $p < 0,05$). El valor máximo de riqueza se encontró en Bella Unión durante el mes de invierno (1551) y el valor mínimo se halló en Puerto Yeruá en verano (915) (**Figura 3.11**). Los índices de diversidad de Shannon y de equitatividad presentaron el mismo patrón temporal, mayores valores en el mes de febrero y menores en junio, a excepción del sitio Gualeguaycito. Sin embargo, solo la equitatividad presentó diferencias significativas (LRT, $p < 0,05$) (**Figura 3.11**). Es decir, que si bien en invierno aumentó el número de especies, existirían algunas cuya abundancia relativa aumenta de manera importante, disminuyendo drásticamente la equitatividad.

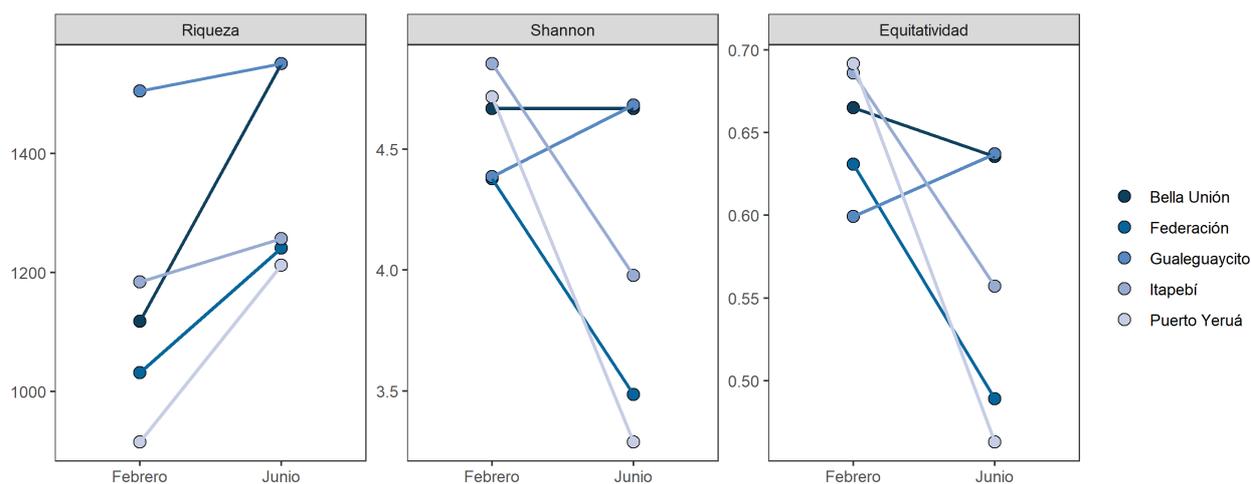


Figura 3.11. Valores de riqueza (número de OTUs), índice de diversidad de Shannon y equitatividad, por mes de muestreo (febrero y junio) y por sitio (Bella Unión, Federación, Gualeguaycito, Itapebí y Puerto Yeruá).

En suma, la abundancia de transcritos de los cuatro genes *mcy* fue máxima en el embalse de Salto Grande, aunque se observaron diferencias temporales en los niveles de expresión, sugiriendo que la toxicidad del CMA estaría presente durante todo el año.

3.7. Discusión

La influencia de los factores ambientales sobre la síntesis de microcistinas todavía es un tema en discusión. Ya que la información disponible sobre cómo influyen las variables ambientales en la síntesis de toxina se basan en experimentos con cultivos, en este trabajo se realizó un estudio *in situ* espacial y temporal de la expresión de genes *mcy*, involucrados en la síntesis de microcistinas. El mismo se centró en el embalse de Salto Grande, cubriendo sitios dentro del embalse, aguas arriba y aguas abajo del mismo tanto en verano como en invierno. Los modelos lineales generalizados revelaron que las variables ambientales, turbidez y conductividad afectaron negativamente la transcripción de los genes *mcy* y la abundancia de células con genotipo tóxico. Asimismo, el embalse, como modificación física, tuvo un efecto sobre las comunidades tóxicas del CMA así como también sobre la expresión de las toxinas. Entre los hallazgos más relevantes se destaca que la estacionalidad tuvo efectos sobre la estructura comunitaria de la fracción tóxica del CMA.

Si bien la diversidad del CMA presentó cambios espaciales y temporales en todos los sitios y meses de muestreo, la comunidad estuvo dominada por dos OTUs. Se destaca que hubo una disminución de una de las OTUs dominantes al pasar de verano a invierno, la cual presenta homología con una cepa de *Microcystis aeruginosa*. Tanto en verano como en invierno la diversidad del CMA se mantuvo en Bella Unión (aguas arriba del embalse), mientras que los sitios dentro (Itapebí y Federación) y aguas abajo del embalse (Puerto Yeruá) disminuyó la diversidad en invierno. Comparando con otros estudios, Song *et al.* (2015) analizaron la diversidad genética del espaciador intergénico transcrito (ITS) de *Microcystis* spp. del lago Erhai y reportaron que la diversidad genética estaba negativamente correlacionada con los nutrientes (fósforo y nitrógeno total). Esto indicaría que niveles bajos de eutrofización favorecen una mayor diversidad de las poblaciones de *Microcystis* (Song *et al.*, 2015). Similares hallazgos han sido reportados por Huo *et al.* (2018) para el río Haihe y el reservorio Yuqiao, quienes determinaron mediante secuenciación masiva de la región ITS que la diversidad genética de *Microcystis* spp. estuvo negativamente correlacionada con el nivel de eutrofización. Estos reportes concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que el sistema acuático embalse de Salto Grande se clasifica como un sistema eutrófico (Chalar, 2006; Chalar, 2009; O'Farrell, *et al.*, 2012; Kruk *et al.*, 2015), motivo por el cual la comunidad del CMA presentó una baja diversidad.

La baja turbulencia generada por los embalses provoca disminución en la resuspensión de sedimentos y por lo tanto disminuye la turbidez (Roberts, 2001). En este sentido, dentro del embalse de Salto Grande se observó que la turbidez fue menor en comparación con el sitio aguas arriba. Si bien la turbidez puede ser indicador de biomasa de cianobacterias, en el embalse esta variable ambiental no estaría cumpliendo ese rol ya que no se correlacionó positivamente con ningún indicador de cianobacterias: clorofila-a, abundancia de cianobacterias, abundancia de organismos del CMA (PC-IGS), genotipos tóxicos. Por lo tanto, la turbidez sería un indicador de las partículas en suspensión y estaría relacionado con la penetración de la luz en el cuerpo de agua. Esta variable afectó negativamente a la abundancia de genotipos tóxicos, afirmando la suposición de que la turbidez no sería un indicador de biomasa.

La transcripción de los cuatro genes *mcy* analizados fue afectada negativamente por la turbidez probablemente debido a que interfiere con la penetración de luz (Chandler, 1942; Quiros & Luchini, 1982). Existen varios trabajos que analizan la relación de diferentes intensidades de luz y la expresión de genes *mcy* mediante experimentos con cultivos unialgales de *Microcystis aeruginosa* (Kaebernick *et al.*, 2000; Sevilla *et al.*, 2012; Pineda-Mendoza *et al.*, 2016). Pineda-Mendoza *et al.* (2015) observaron que intensidades de luz de 50 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inducen la expresión del gen *mcyA* en dos cepas de *M. aeruginosa*. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde reportan que al incrementar la intensidad de la luz aumentan los niveles de transcripción de *mcyB* (16 - 68 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Kaebernick *et al.*, 2000) y *mcyD* (16 - 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Kaebernick *et al.*, 2000; Sevilla *et al.*, 2012). En este sentido, Kaebernick *et al.* (2000) han sugerido que la síntesis de microcistinas esta regulada por la intensidad de luz mediante secuencias reguladoras ubicadas en la región promotora entre los operones *mcyA-C* y *mcy D-J* (Kaebernick *et al.*, 2000). Los resultados previamente descritos concuerdan con los hallados en este trabajo, donde el aumento de la turbidez tiene efecto negativo sobre la abundancia de genotipos tóxicos y sobre la expresión de genes *mcy*.

El rango de conductividad observado en el embalse de Salto Grande fue de 54 a 110 $\mu\text{S/cm}$, variación que no se asoció con otros indicadores de cianobacterias pero sí afectó negativamente a la abundancia de células con genotipo tóxico. Estos resultados no eran esperables, ya que los valores de conductividad observados se encuentran dentro del ran-

go del agua dulce; sin embargo, mínimos cambios de conductividad afectaron a los genotipos tóxicos. Asimismo, esta variable tuvo un efecto negativo sobre la transcripción de los cuatro genes *mcy* analizados. Dado que no existe información sobre la relación entre la expresión de genes *mcy* y la conductividad en rangos de agua dulce, estos hallazgos aportan información novedosa sobre el efecto de la conductividad en la expresión de genes involucrados en la síntesis de toxinas (Lepillanca *et al.*, 2018). Lo que sí se ha reportado es que el aumento de la conductividad afecta negativamente las tasas de respiración, la toxicidad celular por iones, las tasas de fotosíntesis y la permeabilidad de las membranas celulares (0 a 500 mM de NaCl, equivalente a 0 a 0,53 de salinidad) (Zhang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015). De hecho, diversos estudios han abordado el efecto de la salinidad sobre la síntesis de micocistinas mediante experimentos con cultivos. Por ejemplo, Tonk *et al.* (2007) reportaron que el aumento de la salinidad (>10) estimuló la lisis celular y por lo tanto la liberación de toxinas al medio. Además, se ha reportado que los niveles de expresión del gen *mcyD* disminuyen con el incremento de la salinidad (de 0 a 0,53) (Chen *et al.*, 2015; Ross *et al.*, 2019). Aunque en estos estudios se evalúan salinidades que superan los valores de conductividad del agua dulce, los resultados están en concordancia con los hallados en este trabajo. Por lo tanto, esta tesis aporta información sobre la transcripción de *mcy* en un nuevo rango de conductividad que involucra únicamente el agua dulce y que afectaría negativamente la expresión de genes *mcy*. Una posible interpretación a todos estos hallazgos es que existiría una regulación transcripcional de los genes *mcy* dependiente de la conductividad en los rangos encontrados en el agua dulce, mientras que a valores mayores el efecto sobre la síntesis de toxinas sería atribuible a los efectos adversos que tiene el aumento de la presión osmótica sobre el metabolismo celular. Queda aún pendiente describir la regulación transcripcional de los operones *mcy* y dilucidar qué compuestos son los inductores de la expresión génica.

La temperatura del agua presentó una tendencia espacial, donde las mayores temperaturas se detectaron dentro del embalse, lo cual es una de las consecuencias del embalsamiento de los ríos (Roberts, 2001, Liermann *et al.*, 2012). Por otro lado esta variable presentó estacionalidad, siendo menor en el mes de invierno (15 °C) y mayor en verano (31 °C). Sin embargo, no afectó a la abundancia ni a la transcripción de genes *mcy*. Este mismo comportamiento se observó para los otros indicadores de cianobacterias que se analizaron: clorofila-a, abundancia de cianobacterias y abundancia del espaciador PC-IGS. Cabe destacar que los valores de temperatura registrados en el mes de invierno se clasificaron

como valores anómalos, superiores a la media anual de invierno (Alcántara, 2019). Asimismo, las temperaturas de los días previos a la toma de la muestra también fueron elevadas (16-17 °C), esto podría explicar la presencia de las altas abundancias de organismos del CMA en el mes de invierno. En general, se piensa que *Microcystis* spp. reduce sus tasas metabólicas y no crecen cuando las temperaturas del agua están por debajo de 10-15 °C (Takamura *et al.*, 1984; Robarts & Zohary, 1987). Sin embargo, en el lago Taihu (China), Ma *et al.* (2016) han reportado la permanencia de floraciones de *Microcystis* spp. a temperaturas inferiores a 10 °C. Ellos proponen que estas poblaciones de invierno serían un remanente de las floraciones observadas en otoño, las cuales se han acumulado en concentraciones altas (a nivel de floración) debido a las condiciones hidrológicas y meteorológicas favorables durante el invierno (Ma *et al.*, 2016). En este sentido, las condiciones ambientales (días soleados, intensidad de luz adecuada y temperaturas altas) días antes y durante el muestro favorecieron la permanencia de los organismos del CMA y la concomitante expresión de genes *mcy*.

Por otro lado, dentro del embalse de Salto Grande la temperatura del agua resultó ser la única variable ambiental en determinar la diversidad de genotipos tóxicos. Este resultado coincide con los reportados en el Capítulo 2, donde se determinó que la temperatura es una de las principales variables ambientales en determinar la diversidad de genotipos tóxicos en el gradiente ambiental río Uruguay-Río de la Plata definiendo diferentes ecotipos. En este estudio el umbral de temperatura de 21 °C define dos ecotipos dentro del embalse, uno de verano y otro de invierno. Tanto la abundancia de genotipos tóxicos como la transcripción de genes *mcy* no presentaron diferencias entre los ecotipos. Estudios en el lago Taihu han reportado la existencia de cepas de *Microcystis* spp. tolerantes al frío (10 °C), pero que no pueden crecer lo suficientemente rápido como para formar grandes biomasas (Ma *et al.*, 2016). En este sentido, a pesar de no haber afectado a la abundancia y niveles de transcripción de los genes *mcy*, la temperatura fue la variable de más peso en definir la composición de genotipos tóxicos, detectándose genotipos tóxicos tolerantes a bajas temperaturas (~15 °C). Si bien la temperatura no afectó a la abundancia de células portadoras de genotipo tóxico, la proporción de éstas en la comunidad del CMA tendió a ser mayor en invierno, lo cual implica una disminución relativa de la fracción no tóxica a bajas temperaturas. Cabe destacar que la OTU dominante en verano y que disminuye su abundancia el invierno tiene similitud con una cepa de *Microcystis wesenbergii*, especie que se ha descrito como no tóxica (Watanabe, 1996). Este hallazgo, junto al del aumento en la

proporción de poblaciones no tóxicas dentro del embalse sugiere que éstas proliferan preferentemente a altas temperaturas y en aguas quietas. Resulta tentador por tanto hipotetizar acerca del rol de las microcistinas en la adecuación del CMA a condiciones no óptimas, ya que las poblaciones que logran sobrevivir a altas conductividades, bajas temperaturas y bajos tiempos de residencia serían mayormente tóxicas.

Los cambios en la estructura de la comunidad del CMA detectados en el embalse entre los diferentes meses ha sido ya reportado para otros ecosistemas por Sabart *et al.* (2009), quienes estudiaron los cambios espaciales y temporales de la diversidad genética de *Microcystis* en embalses, estanques y ríos y mostraron que en la transición de verano a invierno se generaban grandes cambios en la composición de genotipos de *Microcystis*, donde el genotipo dominante durante el verano era reemplazado por nuevos genotipos en invierno. Ellos sugieren que estos cambios se relacionaron con cambios en la temperatura y mezcla del cuerpo de agua, generando una selección en las poblaciones de *Microcystis* bajo esas nuevas condiciones ambientales (Sabart *et al.*, 2009). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo son concordantes con lo mencionado por Sabart *et al.* (2009).

Además del efecto de las variables ambientales en la expresión de los genes *mcy* hay que destacar el efecto que genera el embalse de Salto Grande como modificación física. Como se ha mencionado los embalses constituyen una amenaza importante para la diversidad de especies de agua dulce (Vörösmarty *et al.*, 2010). Estas alteraciones de los cursos de agua presentan impacto a nivel de la biodiversidad como: alteración y fragmentación del hábitat, inhibición de la migración de organismos, entre otros, lo que lleva a una pérdida de biodiversidad de los organismos acuáticos (Roberts, 2001; Hall *et al.*, 2011; Liermann *et al.*, 2012). Los embalses crean cuerpos de agua lénticos, lo que afecta, por ejemplo, a los regímenes de flujo y temperatura, el transporte de sedimentos y de las comunidades de especies (Roberts, 2001; Vörösmarty *et al.*, 2010; Liermann *et al.*, 2012). La baja turbulencia, bajo recambio de agua y aumento del tiempo de resiliencia, así como el aumento de la temperatura, son algunos de los factores ambientales que tienen un efecto positivo en el crecimiento de cianobacterias (Paerl & Otten, 2013). En este sentido, los resultados observados de las variables biológicas y la expresión de genes en la escala espacial son concordantes. Los indicadores clásicos de cianobacterias, clorofila-a y abundancia de cianobacterias, así como también la abundancia de la comunidad del CMA (espaciador PC-IGS) y genotipos

tóxicos (genes *mcy*) presentaron máximos valores en los sitios dentro del embalse al igual que la expresión de genes *mcy*.

Los cambios ambientales que conlleva la generación del embalse provocó cambios en la estructura de la comunidad del CMA, aguas arriba del embalse la comunidad presenta mayor diversidad y luego cuando esa comunidad entra al embalse se dan las condiciones para la dominancia de algunos genotipos. Este efecto del embalse sobre la comunidad se ve reflejado en sitios aguas abajo, donde la estructura de la comunidad del CMA es similar a la del embalse y por lo tanto el potencial tóxico también es arrastrado aguas abajo. Estos cambios en la diversidad del CMA coinciden con los cambios observados en la comunidad tóxica del CMA. Por lo tanto se podría sugerir que dentro del embalse de Salto Grande la OTU que aumenta su abundancia en el mes de invierno sería un genotipo tóxico adaptado a temperaturas bajas y que estaría expresando genes *mcy*. Existe una tendencia a aumentar la temperatura en los sitios dentro del embalse, sin embargo el aumento no es significativo. Por otro lado, las variables turbidez y conductividad no se ven alteradas por el represamiento.

Por lo tanto, la baja turbulencia y poco recambio de agua, como consecuencia del aumento del tiempo de residencia del agua que se asocia al represamiento serían las variables ambientales que generan los resultados observados, generando las condiciones ambientales óptimas para que haya un alto potencial tóxico dentro del embalse durante todo el año.

3.8. Conclusiones

Se observaron cambios en la diversidad del CMA entre ambas estaciones del año, presentando mayor riqueza en invierno que en verano y generando cambios en la dominancia de las diferentes OTUs. La fracción tóxica (genotipos *mcy*) estuvo condicionada por la temperatura del agua, definiéndose dos ecotipos, uno con preferencias ambientales de verano y otro de invierno. Tanto en verano como en invierno hay poblaciones tóxicas del CMA expresando genes *mcy* con tendencia a aumentar en

invierno. En base a los análisis estadísticos, la conductividad y turbidez del agua fueron las variables que afectaron negativamente la expresión de los genes *mcy* en el embalse de Salto Grande (**Figura 3.12**).

Los sitios ubicados dentro del embalse presentaron mayor abundancia de organismos del CMA, mayor abundancia de genotipos tóxicos y expresión de genes *mcy*. Además, se generan cambios a nivel de la estructura de la comunidad del CMA, disminuyendo la diversidad y favoreciendo la dominancia de algunos genotipos. Por lo tanto, el embalse de Salto Grande constituye un lugar favorable para el crecimiento de genotipos tóxicos del CMA y su concomitante expresión de toxinas (**Figura 3.12**). Estudios adicionales mediante experimentos con condiciones controladas son necesarios para comprender mejor cómo responden los ecotipos definidos a los cambios ambientales.

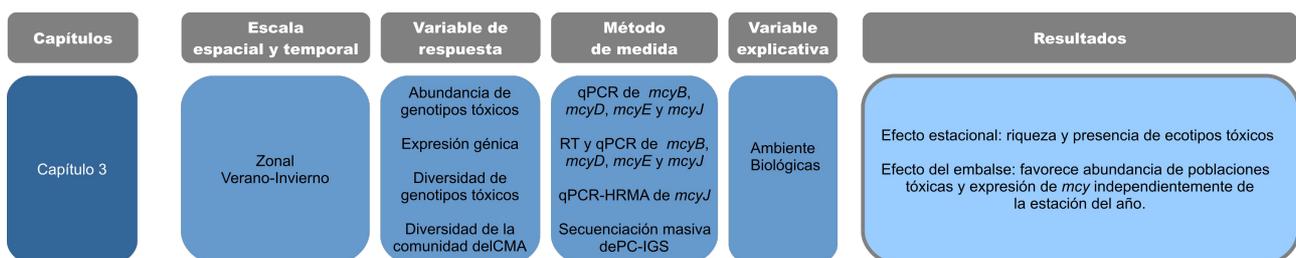


Figura 3.12. Esquema de trabajo, indicando la escala espacial y temporal, variables de respuesta estudiadas y su método de análisis, las variables explicativas utilizadas en el Capítulo 3 y sus principales resultados.

Este capítulo esta actualmente siendo traducido al inglés para ser publicado en la revista internacional *Water Research*.

Capítulo 4

Efectos de la salinidad y temperatura sobre la toxicidad del complejo *Microcystis aeruginosa*: una aproximación experimental

4.1. Resumen

El complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) integra varios ecotipos tóxicos con diferentes preferencias ambientales del gradiente (río Uruguay-Río de la Plata). Éstos tienen distintas abundancias y toxicidad de acuerdo a las condiciones de temperatura, conductividad y turbidez, así como también a la presencia o no de embalses. Entre estas variables se ha demostrado que la salinidad y la temperatura son las más relevantes. En este capítulo se pondrá a prueba la hipótesis de que altas temperaturas y bajas salinidades favorecen la toxicidad del CMA a través del incremento del crecimiento de poblaciones tóxicas y de producción de toxinas. Para ello, se empleó una aproximación experimental en la que se expuso a comunidades naturales del CMA provenientes del embalse de Salto Grande a distintas temperaturas (10, 21 y 30 °C) y salinidades (0, 5, 10 y 25) y se evaluaron los cambios en la abundancia de células portadoras de genotipo tóxico, en la transcripción de genes *mcy* y en la producción de microcistinas, así como en la diversidad y proporción de genotipos tóxicos.

Tanto la abundancia de genotipos tóxicos como la transcripción de genes *mcy* se vieron afectadas negativamente por el aumento de la salinidad inhibiéndose la síntesis de toxinas a 25. Además, a altas salinidades se seleccionaron determinadas poblaciones tóxicas del CMA. La producción de microcistinas mostró diferencias a nivel de variantes entre tratamientos, a salinidad 10 se sintetizó un mayor número de variantes (MC-RR y MC-WR) que en el control. Estos resultados sugieren que a salinidades estuarinas y marinas se seleccionan poblaciones capaces de producir otras variantes de microcistinas diferentes a la LR.

La temperatura no tuvo un efecto significativo sobre la abundancia de genes *mcy* pero sí sobre su transcripción, que disminuyó en el tiempo a 10 y 21 °C y aumentó a 30 °C. Se seleccionaron diferentes poblaciones tóxicas del CMA a distintas temperaturas y la proporción de poblaciones tóxicas aumentó a los diez días de incubación a temperaturas fuera del óptimo de crecimiento del CMA (10 y 30 °C). Este alejamiento del óptimo también afectó a las variantes de microcistinas producidas al séptimo día de incubación, cuando se observaron altas concentraciones de diferentes variantes (MC-RR, MC-WR y MC-YR). Estos resultados pueden trasladarse a la interpretación de lo observado en las diferentes estaciones del año, detectándose la presencia de genotipos tóxicos y cambios en la estructura de la comunidad con la temperatura. En verano (30 °C) la comunidad de genotipos tóxicos aumenta la síntesis de microcistinas mientras que en invierno (10 °C), la

expresión de genes *mcy* disminuye pero aumenta la producción de toxinas, indicando el gran potencial tóxico del CMA durante todo el año.

Ambas variables, temperatura y salinidad, afectaron la producción de toxinas de distintas maneras; la combinación de estos resultados experimentales con los resultados de campo contribuirán a la construcción de un modelo hacia la definición de los principales mecanismos que modulan la presencia de floraciones que permitirá mejorar la predicción de los efectos de las mismas.

4.2. Introducción

Para conocer qué factores son los que determinan la presencia y abundancia de microcistinas en los ecosistemas acuáticos, es necesario evaluar los distintos mecanismos asociados a su producción, desde la presencia de organismos del CMA con genes que codifican para la toxina, hasta su expresión y la traducción de distintas variantes de toxinas en diferentes condiciones ambientales.

La biosíntesis de las microcistinas se realiza de manera no ribosomal por un complejo enzimático (Fischbach & Walsh, 2006), el cual está codificado por el *cluster* genético *mcy* de 55 kb conteniendo 10 genes (*mcyA-J*). Cabe destacar que la toxina podría ser liberada al medio extracelular ya que se ha reportado que el gen *mcyH* presenta homología con transportadores ABC, por lo tanto se propone que este gen codifica para una proteína responsable del transporte transmembrana de microcistinas (Tillet *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2004).

La producción de microcistinas es determinante para la ecología y fisiología de estos organismos ya que representa más del uno por ciento del peso seco en muestras de cianobacterias (Sivonen & Jones, 1999). Las hipótesis propuestas sobre el rol de la microcistina y cuáles son los factores ambientales que podrían influir en su síntesis, se han resumido en diversas revisiones (Sivonen & Jones, 1999; Neilan *et al.*, 2013; Harke *et al.*, 2016). En cuanto al rol de las microcistinas, uno de los más mencionados tiene que ver con su efecto de inhibición de las proteínas fosfatasa de organismos eucariotas, que podría indicar que la toxina actúa como defensa contra sus consumidores como el zooplancton (Jang *et al.*, 2003, 2007). Sin embargo, los genes involucrados en la síntesis de microcistina son antiguos, incluso son anteriores a la aparición del linaje eucariota (Rantala *et al.*, 2004). Por lo tanto, esta hipótesis como explicación del origen de la toxina tendría poco sustento. Por otro lado, se plantea que la presencia de microcistinas fuera de las células podría servir como infoquímico ya que se ha observado que la adición de microcistinas a cultivos de *Microcystis* spp. estimula su producción (Schatz *et al.*, 2007). Por otra parte, algunos autores sugieren que la producción de microcistina tiene un efecto alelopático sobre los genotipos no tóxicos inhibiendo su crecimiento (Lei *et al.*, 2015; Schatz *et al.*, 2007).

Asimismo, existen varios estudios que han analizado los efectos de los gradientes ambientales, como ser la concentración nutrientes, la intensidad luz, la temperatura, la salinidad y el pH, sobre la síntesis de microcistinas (Tonk *et al.*, 2007; Bar-Yosef *et al.*, 2010; Harke *et al.*, 2016). En algunos casos, los mecanismos que se postulan como determinantes de los efectos y respuestas de las comunidades del CMA tóxicas y no tóxicas al ambiente tienen que ver con aspectos energéticos, ya que se postula que la síntesis de toxinas tiene altos costos energéticos. Esto generaría desventajas competitivas de las poblaciones no tóxicas respecto de las tóxicas y explicaría sus diferentes preferencias a condiciones ambientales (Kardinaal *et al.*, 2007a). En este marco, la temperatura y salinidad generan los gradientes ambientales que más afectan a la dinámica de producción de toxinas por *Microcystis* (e.g. Tonk *et al.*, 2007; Giannuzzi *et al.*, 2016).

- Efecto de la salinidad sobre organismos del CMA

El aumento de la salinidad afecta negativamente las tasas de respiración y fotosíntesis, la permeabilidad de las membranas celulares y la toxicidad celular por iones (Zhang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015). La mayoría de las cianobacterias de agua dulce no sobreviven en agua salobre, sin embargo las especies del CMA presenta una alta tolerancia a variaciones en la salinidad (Orr *et al.*, 2004; Tonk *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha demostrado que *Microcystis aeruginosa* puede reproducirse a salinidades de 10-14 (Prinsloo & Pieterse, 1994; Orr *et al.*, 2004; Verspagen *et al.*, 2006; Tonk *et al.*, 2007; Kruk *et al.*, 2017) y sobrevivir estando presentes y activas en salinidades marinas hasta por lo menos 29 (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017; Kruk *et al.*, 2017; Kruk *et al.*, 2019). Asimismo, se ha observado que el biovolumen celular de los organismos del CMA y la producción de microcistinas por las poblaciones tóxicas disminuyen cuando la salinidad excede valores de 10 (Tonk *et al.*, 2007) aumentando el tamaño de las colonias y tasa de recuperación en la superficie del agua (Kruk *et al.*, 2017; Kruk *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos mediante experimentación sugieren que poblaciones tóxicas del CMA expuestas a una creciente salinidad pueden tener ventajas competitivas y menor toxicidad que en ambientes dulceacuícolas, hasta disminuir cuando la salinidad excede valores de 10 (Robson & Hamilton, 2003; Tonk *et al.*, 2007). En este sentido, en el río Uruguay y Río de la Plata se observó una mayor abundancia de organismos con genotipo tóxico en la zona de agua dulce (salinidad 0) y menor en la estuarina, donde las salinidades exceden valores de 20 (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017). Sin embargo, poco se conoce sobre la respuesta de las poblaciones tóxicas cuando son transportados del río Uruguay (agua dulce) hacia el Río

de la Plata (agua salobre), donde enfrentan un gradiente de salinidad desde valores de 0 a 30 (Kruk *et al.*, 2019). Asimismo, los resultados experimentales se basan en cepas aisladas de *Microcystis* en general en forma de células individuales y no formando colonias como se observa en la naturaleza.

Escasos estudios han evaluado el efecto de la salinidad sobre la expresión de genes *mcy*. Estos han utilizado experimentos con cultivos monoespecíficos de diferentes cepas y los resultados reportados en algunos casos no son concordantes, incluso aquellos estudios que analizan el mismo gen *mcy* (Martín-Luna *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Ross *et al.*, 2019). Por un lado, Chen *et al.* (2015) observaron que tanto el tratamiento con NaCl (0, 50, 200 y 500 mg/L, correspondiente a 0; 0,053; 0,213; 0,533 de salinidad respectivamente) como el tiempo de incubación (12 días) afectó negativamente la expresión del gen *mcyD*. Sin embargo, Ross *et al.* (2019), que utilizaron concentraciones mucho mayores de sal, no encontraron efecto ni de la salinidad (0, 3, 7 y 10 de salinidad) ni del tiempo de incubación (11 días) sobre la expresión del gen *mcyD*.

- Efecto de la temperatura sobre organismos del CMA

Existen varios estudios que analizan los efectos de la temperatura y sus valores óptimos de crecimiento y fotosíntesis del CMA (Konopka & Brock, 1978; Reynolds, 2006; O'Neil *et al.*, 2012; Kruk *et al.*, 2017). Sin embargo, la información con respecto a cómo las poblaciones con genotipos tóxicos y no tóxicos del CMA y su producción de toxinas se verán afectadas por los cambios de temperatura del agua, es escasa. Mediante experimentos, Davis *et al.* (2009) encontraron que un aumento en la temperatura de 4 °C respecto al ambiente (23 °C) resulta en tasas de crecimiento significativamente más altas en células con genotipos tóxicos respecto de los no tóxicos. Asimismo, en el río Uruguay y Río de la Plata, se ha demostrado que la abundancia de genotipos tóxicos es favorecida con el aumento de temperatura (de 11 a 34 °C) (Capítulo 1) (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017). En conjunto, estos estudios sugieren que el aumento de la temperatura favorecería la proliferación de poblaciones tóxicas. Sin embargo, otros autores no han encontrado una relación significativa entre la temperatura y la abundancia de genotipos tóxicos (Rinta-Kanto *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Te & Gin, 2011; Guedes *et al.*, 2014). Además, estudios teóricos han predicho que las floraciones del CMA dominarán con el aumento de la temperatura debido al cambio climático (O'Neil *et al.*, 2012). Por estas razones es fundamental analizar la respuesta de los genotipos tóxicos a los cambios de estación de año, por lo tanto a los

cambios de temperatura.

Los trabajos donde se evalúa el efecto de la temperatura sobre la expresión de genes *mcy* se realizan mediante experimentos con cultivos uni-específicos de diferentes cepas de *Microcystis* y en general en forma de células individuales (Kim *et al.*, 2005; Scherer *et al.*, 2017), lo que limita la comparación de los resultados. Kim *et al.* (2005) encontraron que cepas tóxicas cultivadas a 30 °C presentaban menor nivel de expresión del gen *mcyB* que las cultivadas a 20 °C. Por otro lado, Scherer *et al.* (2017) observaron que el aumento de la temperatura (de 20 a 30 °C) provocó un aumento significativo en la expresión del gen *mcyB* pero no del gen *mcyD* luego de 3 días de incubación.

Son escasos los estudios experimentales que abordan los efectos de la salinidad y temperatura conjuntamente, por lo que los resultados surgen principalmente de resultados de campo. En particular, en los estudios previos realizados en esta tesis en el embalse de Salto Grande se pudo determinar que mínimos aumentos de conductividad dentro del rango del agua dulce provoca una disminución de la abundancia de transcritos de cuatro genes *mcy* (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*). A su vez, dicha transcripción no es afectada por la temperatura (verano: 30 °C, invierno: 15 °C).

Nuestra hipótesis general de trabajo se basa en que los cambios en la producción de toxinas frente a cambios ambientales están asociados a los mayores costos energéticos que conlleva la producción de microcistinas por parte de los genotipos tóxicos respecto de los no tóxicos. Por ello esperamos distintas respuestas a los cambios en la temperatura y salinidad, incluyendo diferencias en los valores óptimos y rangos tolerados para el crecimiento de poblaciones tóxicas y no tóxicas para la transcripción y diversidad genética, así como también para la selección de distintos ecotipos tóxicos y producción de variantes de microcistinas.

4.3. Objetivo

Evaluar el efecto de la temperatura y la salinidad sobre la dinámica de genotipos tóxicos, su toxicidad (concentración y variantes de microcistinas) y diversidad mediante una aproximación experimental..

4.4. Estrategia de investigación

Para cumplir con el objetivo se realizaron experimentos en laboratorio utilizando comunidades naturales del CMA. Se evaluó el efecto a de distintos valores de temperatura y salinidad sobre la abundancia de la población tóxica y expresión de genes *mcy* involucrados en la síntesis de microcistinas, la proporción de genotipos tóxicos y su diversidad (**Figura 4.1**). Además, se evaluó la expresión del espaciador intergénico de ficocianina (PC-IGS) como un *proxy* del estado fisiológico de la comunidad del CMA. La selección de los tiempos de incubación y de la frecuencia de toma de muestras durante el experimento tuvo en cuenta la velocidad estimada de los cambios biológicos y variables consideradas. Los cambios fisiológicos (i.e. expresión de genes funcionales tales como los genes involucrados en la síntesis de microcistinas y ficocianina) de los organismos ocurren en horas a pocos días de exponer a las comunidades a los cambios ambientales, mientras que los cambios poblacionales y comunitarios ocurren mas lentamente, de pocos a varios días (i.e. crecimiento). La abundancia de la población tóxica (gen *mcyE*) y la expresión de genes (*mcyE*, *mcyH* y PC-IGS) se evaluó mediante qPCR, la diversidad de la fracción tóxica mediante qPCR y HRMA del gen *mcyJ*, complementándose con la técnica de DGGE. Además, para conocer si los tratamientos inducen cambios en el tipo de toxinas producidas, se evaluaron las concentraciones de cuatro variantes de microcistinas, mediante LC-MS.

La estructura de este capítulo se presenta de la siguiente manera: primero se detalla la metodología utilizada para ambos experimentos, luego se presentan los resultados y discusión del experimento de salinidad, a continuación se presentan los resultados y discusión del experimento de temperatura, para luego generar una discusión y conclusiones del capítulo.



Figura 4.1. Esquema de trabajo del presente capítulo, indicando la escala espacial y temporal de la aproximación, las variables de respuesta estudiadas, sus respectivos métodos de análisis, y las variables explicativas utilizadas.

4.5. Metodología

4.5.1. Diseño experimental

Se realizaron dos experimentos por separado para evaluar el efecto de la temperatura y la salinidad sobre comunidades naturales de organismos del CMA. El experimento de salinidad se llevó a cabo en las instalaciones del IIBCE, mientras que el de temperatura se realizó en el CURE-Rocha.

A) Efectos de la salinidad: para evaluar los efectos de la salinidad se realizaron cuatro tratamientos: 0, 5, 10 y 25 de salinidad a una temperatura de incubación de 21 °C. Estas salinidades fueron seleccionadas en base al conocimiento sobre la capacidad de las especies del CMA de crecer entre salinidades de 0 a 6 (Wangwibulkit *et al.*, 2008), tolerar salinidades hasta 10 y que a mayores valores de salinidades comienza a ocurrir la lisis celular (Liu, 2006), así como también al conocimiento de la distribución del CMA y sus poblaciones tóxicas en el gradiente de río Uruguay - Río de la Plata (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017; Kruk *et al.*, 2017). Se emplearon diferentes concentraciones de solución de sal marina (*Sera Marin Salt*), estas fueron de 6, 10 y 25 g/L, las cuales corresponden a 5, 10 y 25 de salinidad respectivamente.

B) Efectos de la temperatura: para evaluar los efectos de la temperatura se realizaron tres

tratamientos: 10, 21 y 30 °C a salinidad 0. Éstas fueron seleccionadas de acuerdo a la temperatura observada en las diferentes estaciones del año en nuestro país y de acuerdo a lo esperado para las respuestas de CMA (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017; Kruk *et al.*, 2017). Por otro lado, las cianobacterias del CMA presentan una temperatura óptima de crecimiento y fotosíntesis de 21 - 25 °C (Konopka & Brock, 1978; Reynolds, 2006; Paerl & Huisman, 2008; Kruk *et al.*, 2017).

4.5.2. Condiciones generales

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y tuvieron una duración total de 10 días. Se utilizaron frascos Schott de 500 ml y con un volumen total de cultivos de 300 ml. Los frascos se agitaron manualmente tres veces al día y se cambiaron de posición aleatoriamente todos los días durante el experimento. En todos los casos se mantuvo a los organismos con una intensidad de luz aproximada de 30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$, bajo la cual las especies del CMA presentan una tasa de crecimiento máxima (Briand *et al.*, 2012) con foto período de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

4.5.3. Inóculo

La muestra para preparar el inóculo provino del embalse de Salto Grande y fue tomada en verano en dos instancias: una en diciembre (temperatura del agua = 25 °C) y otra en febrero (temperatura del agua = 26 °C), para los experimentos de salinidad y temperatura, respectivamente. La muestra se obtuvo con una red de 100 μm , concentrando una alta densidad de organismos del CMA. Los organismos obtenidos se mezclaron en agua del embalse filtrada a través de filtros de policarbonato estériles de 0,45 μm de diámetro de poro. La preparación del inóculo tuvo un volumen de aproximadamente 2 litros y se aclimató durante 24 horas a 21 °C en las condiciones de luz a la que se desarrollaron los experimentos (30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Los frascos fueron llenados con agua filtrada del embalse y se vertió un volumen de la preparación del inóculo hasta llegar a 300 ml. Para minimizar las diferencias en la composición inicial de la comunidad en los experimentos, la preparación del inóculo se colocó en un balón de vidrio y el volumen total de inóculo inicial vertido en cada frasco fue tomado en 3 veces. La concentración inicial del CMA en los experimentos fue de aproximadamente 1×10^4 organismos/ml determinada mediante conteo en microscopio utilizando cámaras de sedimentación.

4.5.4. Muestreo de los experimentos

En ambos experimentos (temperatura y salinidad) se tomaron muestras para los distintos análisis al inicio, durante y al final de los mismos (**Tabla 4.1**). Estos fueron tomados de la superficie antes de mezclar para que resultara representativa de una floración superficial. Para la extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) se tomó un mililitro de la superficie de cada réplica de cada tratamiento en los tiempos: T0 (10 min luego de colocar el inóculo en el frasco), T1 (a las 4 horas), T2 (a las 18hs), T4 (a los 4 días, 96hs), T7 (a los 7 días, 168hs) y T10 (tiempo final, 10 días 240hs).

Tabla 4.1. Actividades realizadas, muestras tomadas y análisis realizados durante el desarrollo e incubación de los experimentos.

Actividades	Tiempo en horas											
	0	0,17	4	18	96	120	144	168	192	216	240	
Preparación del inóculo	x											
Inoculación e inicio		x										
Toma de muestra cuantificación genotipos tóxicos del CMA (ADN, qPCR)		x	x	x	x			x				x
Toma de muestra expresión génica (ARN, qPCR)		x	x	x	x			x				x
Toma de muestra para análisis de diversidad de genotipos tóxicos (HRMA y DGGE)		x										x

4.5.5. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ADN se empleó un método físicoquímico puesto a punto previamente en esta tesis para muestras de agua (ver Capítulo 3). Para la extracción de ARN la muestra fue sometida inmediatamente para la extracción utilizando el kit Pure Link RNA (Life Technologies). La muestra se colocó en tubos estériles con *beads* de cerámica de 2 mm de diámetro, junto con 800 ul del buffer de extracción y 10ul de b-mercaptoetanol cada 1 ml de buffer de extracción. Luego se homogeneizaron durante 40s a 6 m/s en el equipo *fastprep* (MP Biomedicals) y se centrifugaron a 5000 g por 1 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó el mismo volumen de etanol absoluto (100%). Luego se con-

tinuó con el protocolo descrito para el kit Pure Link RNA (Life Technologies). El ARN extraído fue sometido a tratamiento con DNasa I, siguiendo el protocolo descrito en el kit (Invitrogen) utilizando 5 μ l del ARN extraído. Luego este fue sometido a RT para la producción de ADNc (kit High Capacity RNA to cDNA, Invitrogen). Durante todo el proceso de obtención del ADNc las muestras se mantuvieron en frío. La pureza del ADN y ARN se determinó por espectrofotómetro para micro-volúmenes (Nanodrop). Para la extracción de ADN y ARN se partió de una muestra de 1 ml de la espuma de cianobacterias de cada frasco.

4.5.6. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Se cuantificó la abundancia de genotipos tóxicos (gen *mcyE*, sugerido como el mejor indicador de genotipos tóxicos, Capítulo 1) utilizando el mismo procedimiento y equipamiento descrito en el Capítulo 1. Para cuantificar a la población total del CMA (genotipos tóxicos + genotipos no tóxicos) se amplificó el espaciador intergénico del operón ficocianina (PC-IGS) por qPCR de acuerdo a la metodología puesta a punto en el Capítulo 3. Asimismo, se diseñaron *primers* para la amplificación del gen *mcyH* involucrado en la síntesis de microcistinas por la técnica qPCR y se pusieron a punto las condiciones de la misma (*primers: forward* 5'-ACAACCCGTGAAATGACCGA-3' y *reverse* 5'-TCCCAAGGAACTTCCGCATC-3'). Para las reacciones se usó el kit Power SYBR Green PCR (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20 μ l: 9,5 μ l de agua, 0,5 μ l de BSA (30 mg/ml), 7,76 μ l de mix (Power SYBR Green PCR), 0,12 μ l de cada primer (50 μ M) y 2 μ l de ADN de la muestra. El termociclador utilizado para los ensayos de qPCR fue TouchTM Real-Time PCR Detection System (BIO RAD) y las condiciones de ciclado fueron 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C. Al final se realizó la curva de *melting* desde 65 °C a 95 °C, en incrementos de 1 °C cada 4 seg. para confirmar la especificidad del fragmento amplificado. Asimismo, se cuantificó la abundancia de transcritos (expresión) de los genes *mcyE* y *mcyH* involucrados en la síntesis de microcistinas y la del espaciador PC-IGS el cual se utilizó como indicador del estado fisiológico de la comunidad del CMA (fracción tóxica y no tóxica). Los análisis de expresión se realizaron utilizando la técnica qPCR siguiendo el procedimiento y con el equipamiento utilizado en el Capítulo 3.

- Curva de calibración y cuantificación del número de copias del gen

La eficiencia de amplificación de los genes fue determinada empleando vectores (plásmidos) que contienen los fragmentos del gen clonados. Para la clonación del gen

mcyH se utilizó una muestra conocida del embalse de Baygorria dominada por una única mofro-especie del género *Microcystis*, el vector TOPO 2.1 (TOPO-TA cloning kit, Invitrogen) y células competentes *Escherichia coli* (Apéndice 1). Para cuantificar el número de copias de cada gen en las muestras se realizaron diluciones seriadas de 1/10 a 1/100000 de los genes clonados, se realizó el ajuste de la curva y se determinó el número de copias por microlitro. Una vez conocido el número de copias génicas que contenía cada reacción de PCR se calculó el número original de copias en la muestra. Este procedimiento se realizó tanto para la cuantificación de la abundancia del gen *mcyE* y del espaciador PC-IGS, así como también para la cuantificación de los transcritos de los mismos.

4.5.7. Análisis de la variabilidad del gen *mcyJ*

Se analizó la variabilidad del gen *mcyJ* y se empleó como *proxy* de la diversidad genotípica del CMA tóxico. Para ello, se utilizaron dos metodologías complementarias, qPCR y HRMA para estudiar los cambios a nivel de toda la comunidad y DGGE para evaluar la diversidad de genotipos tóxicos presente en cada tratamiento. En ambas metodologías se analizó el mismo fragmento del gen *mcyJ* y se compararon el tiempo final de cada tratamiento con el tiempo inicial (inoculo) del experimento.

- *High Resolution Melting Analysis* (HRMA)

Se aplicó la misma metodología de HRMA del gen *mcyJ* desarrollada en el Capítulo 2. Como variables explicativas se utilizaron los valores de salinidad o temperatura de cada tratamiento.

- Electroforesis de geles en gradiente desnaturalizante (DGGE)

Se amplificó mediante PCR en tiempo final el gen *mcyJ* utilizando los mismos *primers* que en qPCR, conteniendo el *primer forward* una secuencia GC o "grampa": 5' CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3', para evitar la completa desnaturalización de los amplicones. Los productos de amplificación obtenidos se corrieron en un gel de acrilamida (8 %) con un gradiente de urea de 60 % a 40 %, a 70 V y 60 °C por 16 horas en buffer TAE 1X (Apéndice 1). Estas condiciones de corrida del gel fueron ajustadas en base a los resultados obtenidos en la puesta a punto de la técnica. Luego de la corrida los geles se tiñeron con SYBR green (agente intercalante) y se tomaron fotos en el escáner de geles FujiFilm Starion FLA 9000 Image Scanner (EquipNet). Las

imágenes de los geles de DGGE se analizaron con el programa GelCompare II (versión 6.5, Applied Maths). Cada banda que presenta la misma posición de migración en el gel se asume que es la misma unidad taxonómica operacional (OTU) o el mismo genotipo. Se realizaron dendrogramas utilizando el método UPGMA y distancia Jaccard (Jaccard, 1901). Se calculó la riqueza de genotipos en cada muestra como el número de bandas.

4.5.8. Cuantificación de toxinas

Se cuantificó la concentración de cuatro variantes de microcistina (MC): MC-LR, MC-WR, MC-RR y MC-YR mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS), utilizando los estándares de cada variante (pasantía en la empresa estatal Agua y Saneamiento Argentinos S.A., Argentina, Buenos Aires). Mediante curvas de calibración con cada estándar se cuantificó la concentración de cada variante de la toxina en las muestras.

4.5.9. Análisis de datos

Se estudió la distribución de las variables de respuesta: abundancia de genotipos tóxicos (gen *mcyE*) y abundancia de transcritos de genes involucrados en la síntesis de microcistinas (genes *mcyE* y *mcyH*) y ficocianina (PC-IGS), diversidad de genotipos tóxicos (*mcyI*) y proporción de genotipos tóxicos (gen *mcyE*/PC-IGS). Se realizaron correlaciones no paramétricas, Spearman, entre las variables de respuesta. Para conocer si el tiempo de incubación y el tratamiento afectó la abundancia de genotipos tóxicos del CMA (gen *mcyE*), la abundancia de transcritos de *mcyE*, *mcyH* y PC-IGS, así como la producción de las diferentes variantes de microcistinas, se aplicaron modelos lineales utilizando mínimos cuadrados generalizados (GLS). En estos modelos se utilizó el tratamiento y los tiempos de incubación como variables explicativas categóricas (factores). Debido a que la varianza no fue homogénea y que las variables presentaron correlación temporal se ensayaron diferentes modelos GLS teniendo en cuenta estos aspectos. Los modelos fueron comparados en base a el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham & Anderson, 2002) y se seleccionó aquel modelo que presentó menor valor de AIC. Para evaluar el efecto de la temperatura y salinidad sobre la proporción de genotipos tóxicos se aplicó el método LRT para cada tratamiento.

Para describir la relación entre la diversidad de genotipos tóxicos del CMA y los diferentes

tratamientos se utilizó el método desarrollado en el Capítulo 2, que clasifica las curvas de *melting* obtenidas del HRMA utilizando árboles de clasificación y regresión funcional (*f*CART) (ver Capítulo 2). Para ello se utilizaron como variables explicativas los valores de salinidad o temperatura de cada tratamiento. Además, se realizaron dendrogramas para conocer las similitudes entre las muestras a partir de la presencia-ausencia de bandas obtenido de la técnica DGGE utilizando la distancia Jaccard y el método UPGMA (Jaccard, 1901).

Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico R versión 3.5.3 utilizando los paquetes {vegan}, {rpart}, {fda}, {nlme} y {PMCMR} (Oksanen *et al.*, 2009; R Core Team, 2013; Pinheiro *et al.*, 2014; Pohlert, 2014; Ramsay *et al.*, 2014; Therneau *et al.*, 2015).

4.6. Resultados: efecto de la salinidad

4.6.1. Dinámica temporal de la abundancia de poblaciones tóxicas

La abundancia de células portadoras de genotipo tóxico mostró el mismo patrón en todos los tratamientos. Este incluyó una etapa de estabilización (del inicio a 18 hs), una de crecimiento (de 18 hs a 7 días) y una de saturación (del día 7 al final), similar a lo esperado en el crecimiento poblacional, confirmando que las condiciones de crecimiento experimentales fueron adecuadas (**Figura 4.2**).

El modelo que mejor se ajustó a estos datos (seleccionado en base al menor valor de AIC) fue la combinación del tratamiento con salinidad y el tiempo. Se observó que durante lo que sería la fase exponencial de crecimiento hubo un aumento de la abundancia de genotipos tóxicos en todos los tratamientos excepto en el de salinidad 25 (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.2**). A partir de las 18 hs y hasta el final del experimento se observó un efecto negativo de la salinidad, observándose un mayor efecto a salinidades más altas (10 y 25) (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.2**).

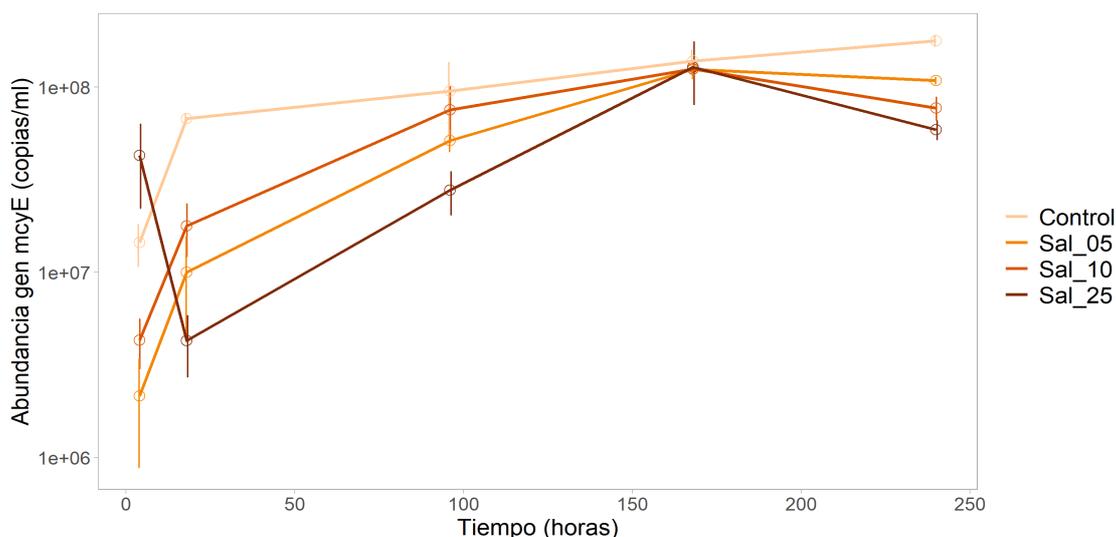


Figura 4.2. Valores de abundancia de genotipos tóxicos (gen *mcyE*, copias/ml) para cada tratamiento en función del tiempo de incubación (horas). Eje Y logaritmizado en base 10.

4.6.2. Dinámica de la transcripción de genes *mcy*

Se cuantificó la expresión de los genes *mcyE* y *mcyH* en los distintos tratamientos y a diferentes tiempos durante el experimento. La expresión de ambos genes presentó el mismo comportamiento en los tratamientos de salinidad durante los diez días de incubación (**Figura 4.3**) (r_s : 0,90, $p < 0,05$, Apéndice 2). El modelo que mejor se ajustó a estos datos (menor AIC) fue mediante la suma del tratamiento y el tiempo.

En relación al efecto de la salinidad sobre la abundancia de transcritos *mcy* a lo largo del tiempo de incubación (**Figura 4.3**), se observó un efecto negativo de la salinidad 10 y 25 (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) en relación al tratamiento control pero no a salinidad de 5 (GLS, $p > 0,05$, Apéndice 2). EL patrón de las curvas fue similar entre tratamientos, excepto entre el inicio hasta las 18 horas en el tratamiento con la mayor salinidad donde la expresión disminuyó (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.3**). Hacia el cuarto día 4 (96 hs) los niveles disminuyeron significativamente en todos los tratamientos en relación al tiempo inicial, volviendo a aumentar a las 168 hs (7 días) (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.3**). Al final del experimento (10 días, 240 hs) se observaron mayores abundancias de transcritos a salinidad 0 y 5, y menores abundancias a 10 y 25 de salinidad.

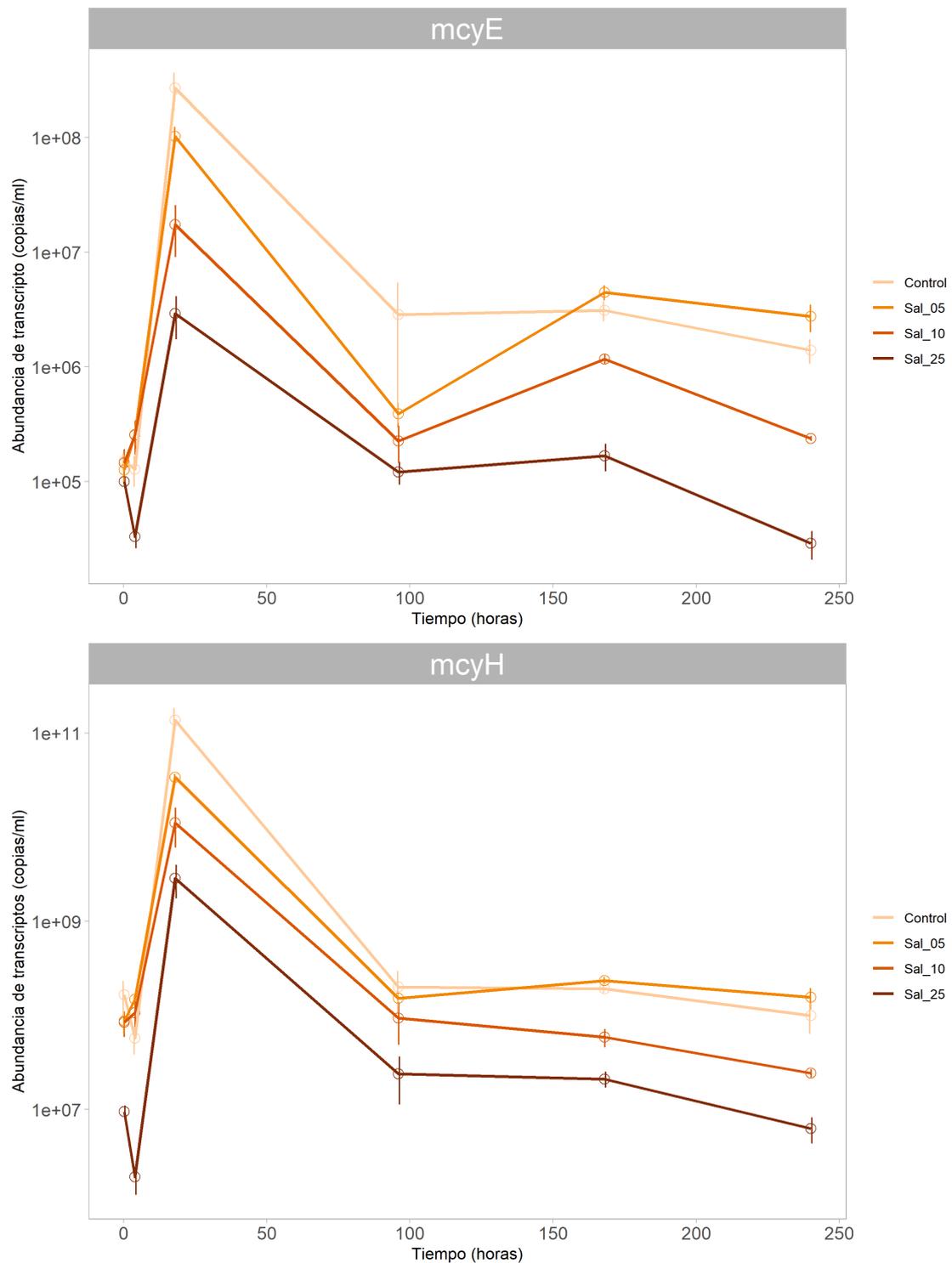


Figura 4.3. Valores de abundancia transcritos (copias/ml) de los genes *mcyE* (superior) *mcyH* (inferior) para cada tratamiento en función del tiempo de incubación (horas). Eje Y logaritimizado en base 10.

4.6.3. Actividad del CMA: abundancia de transcritos del espaciador PC-IGS

La transcripción del espaciador PC-IGS se utilizó como indicador del estado fisiológico de la comunidad total del CMA, incluyendo a ambas fracciones: tóxica y no tóxica. Este *proxy* de actividad mostró el mismo patrón a lo largo la incubación en todos los tratamientos con una primera bajada y luego dos picos (**Figura 4.4**). El modelo que se ajustó mejor a estos datos (según criterio AIC) fue la suma del tratamiento y el tiempo. Si bien analizados individualmente se observó un aumento en los niveles de transcritos en todos los tratamientos (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2), se detectó también que la salinidad en todas sus concentraciones tuvo un efecto negativo en todos los tiempos (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.4**).

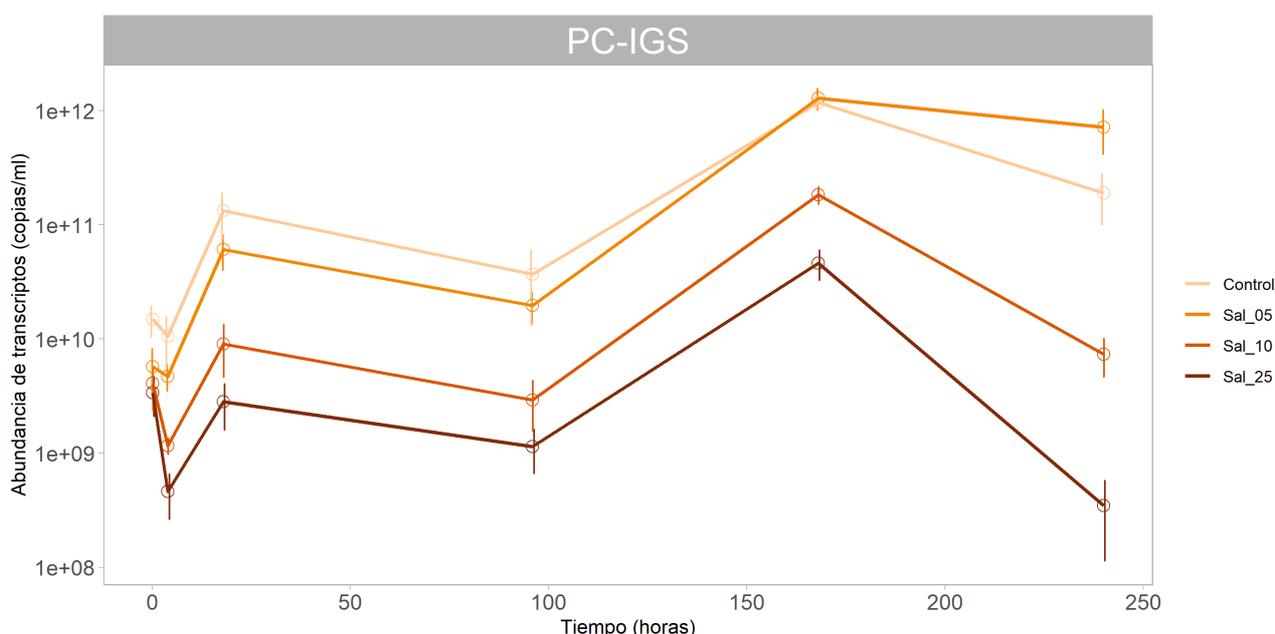


Figura 4.4. Valores de abundancia transcritos (copias/ml) del espaciador intergénico de ficocianina (PC-IGS) para cada tratamiento en función del tiempo de incubación (horas). Eje Y logaritimizado en base 10.

4.6.4. Diversidad de poblaciones tóxicas del CMA

Se aplicaron los métodos de HRMA y f CART (Capítulo 3) y DGGE para evaluar conjuntamente los cambios en la diversidad de genotipos tóxicos al inicio y final del experimento y entre tratamientos.

- HRMA del gen *mcyJ*

En primer lugar, se obtuvieron las curvas de *melting* al inicio del experimento y el tiempo final de cada tratamiento, las que se normalizaron en la región de *melting* (75 - 82 °C) para aplicar el *f*CART. Como resultado del *f*CART se obtuvo un árbol de cuatro hojas cuyo error fue significativamente menor al calculado en la permutación aleatoria (LRT, $p < 0.05$). La variable explicativa utilizada fueron los valores de salinidad en los tratamientos y el primer valor umbral de salinidad seleccionado fue de 2,5, luego 7,5 y por último se seleccionó un valor de 17,5 (**Figura 4.5**). Entre el tratamiento control al final y el inicio del experimento la diversidad de genotipos tóxicos no presentaron diferencias, mientras que las réplicas de los tratamientos con sal se separaron claramente (**Figura 4.5**). Esto significa que en distintas concentraciones de sal se seleccionan diferentes poblaciones tóxicas adaptadas a las distintas salinidades.

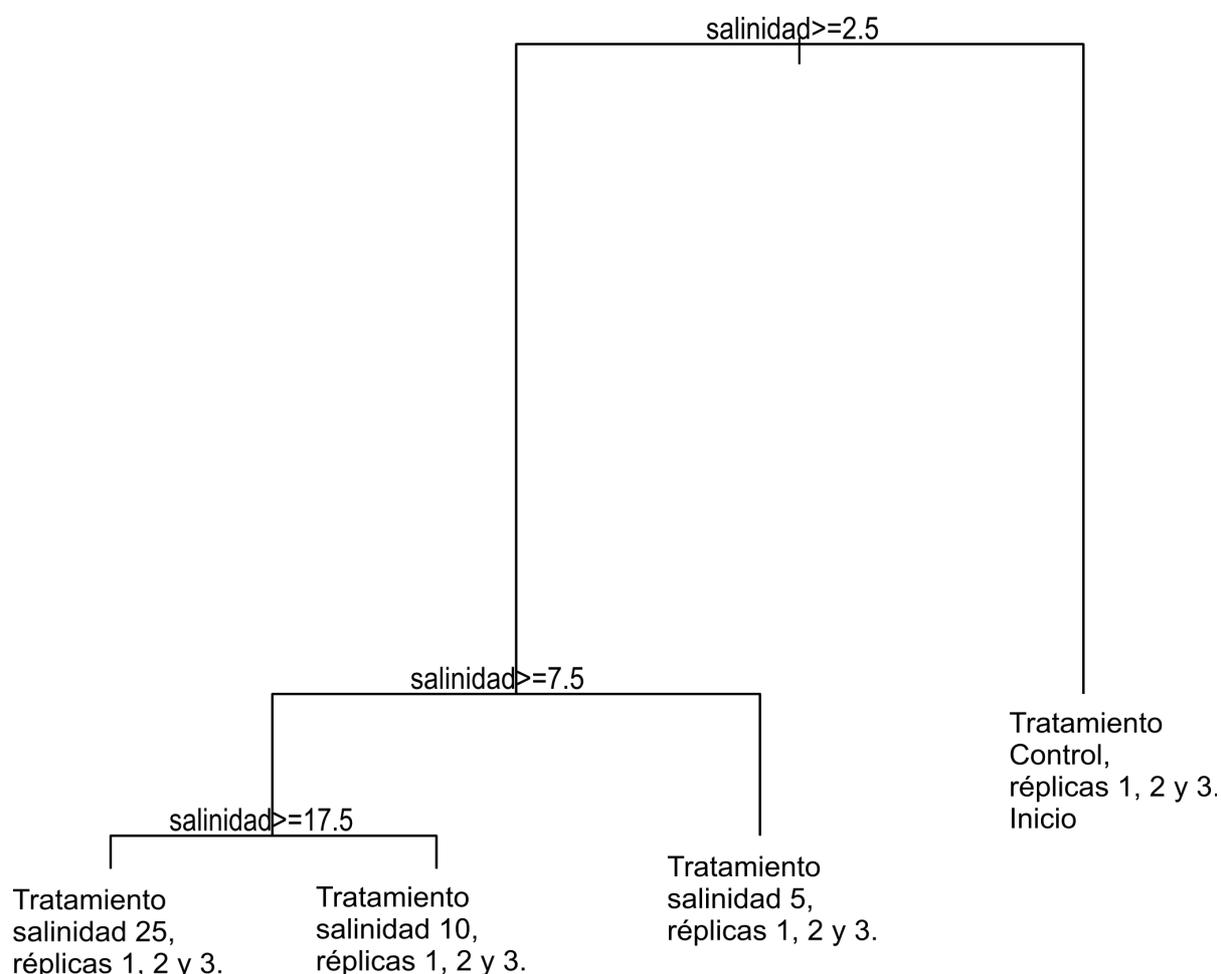


Figura 4.5. Árbol de regresión funcional que muestra las principales variables ambientales que explican la diversidad de perfiles de genotipos tóxicos. En cada nodo se muestra la variable ambiental y su valor umbral. Al final de cada rama se presenta el nombre de la muestra (tratamiento y réplica) que fue agrupada. Las muestras corresponden al tiempo final de cada tratamiento y el tiempo inicial (inicio).

- DGGE del gen *mcyJ*

La riqueza (número de bandas), entendida como número de OTUs o genotipos *mcyJ* diferentes, fue mayor en el control y en el tratamiento de salinidad 5 (riqueza = 10), siendo igual al inicio del experimento. En los tratamientos de 10 y 25 la riqueza fue de 8, observándose una disminución de la riqueza genotípica.

El análisis de *cluster* basado en las bandas obtenidas del DGGE (presencia/ausencia) mostró el mismo patrón de bandas en el inicio, control y salinidad 5 (100 % similitud, **Figura 4.6**). Por otro lado, los tratamientos de salinidad 10 y 25 presentaron 80 % de similitud con el tratamiento 5, el control e inicio (**Figura 4.6**), mientras que el porcentaje de similitud entre los patrones de bandas del tiempo final del tratamiento de salinidad de 25 con el tratamiento de salinidad de 10 fue de 78 % (**Figura 4.6**). Estos resultados coinciden con los obtenidos con el HRMA y *f*CART.

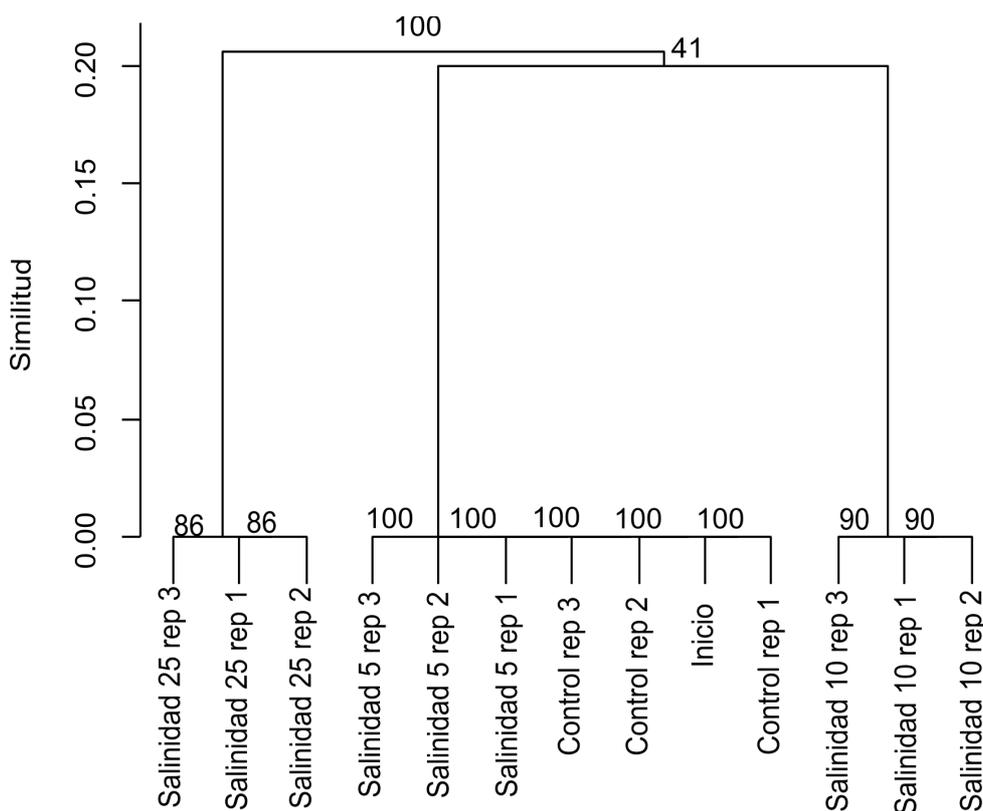


Figura 4.6. Dendrograma realizado en base a la presencia ausencia de bandas obtenidas de la técnica DGGE. Al final de cada rama se presenta la el nombre de la muestra (tratamiento y réplica) que fue agrupada. Las muestras corresponden al tiempo final de cada tratamiento y el tiempo inicial (inicio). Distancia utilizada Jaccard, método UPGMA.

4.6.5. Variación de la proporción de genotipos tóxicos / no tóxicos

La proporción de genotipos tóxicos (*mcyE* / PC-IGS) disminuyó hacia el final de todos los tratamientos con sal (LRT, $p < 0,05$). En la **Figura 4.7** se presenta el nivel de cambio en la proporción de genotipos tóxicos al final del experimento en relación al inicio, calculada como: proporción de genotipos tóxicos final / proporción de genotipos tóxicos inicial. Como se puede observar, los tratamientos con salinidad presentan menor nivel de cambio en comparación con el tratamiento control. Es decir, que la proporción de genotipos tóxicos disminuyó al final del experimento en los tratamientos con salinidad y se mantuvo constante en el tratamiento control.

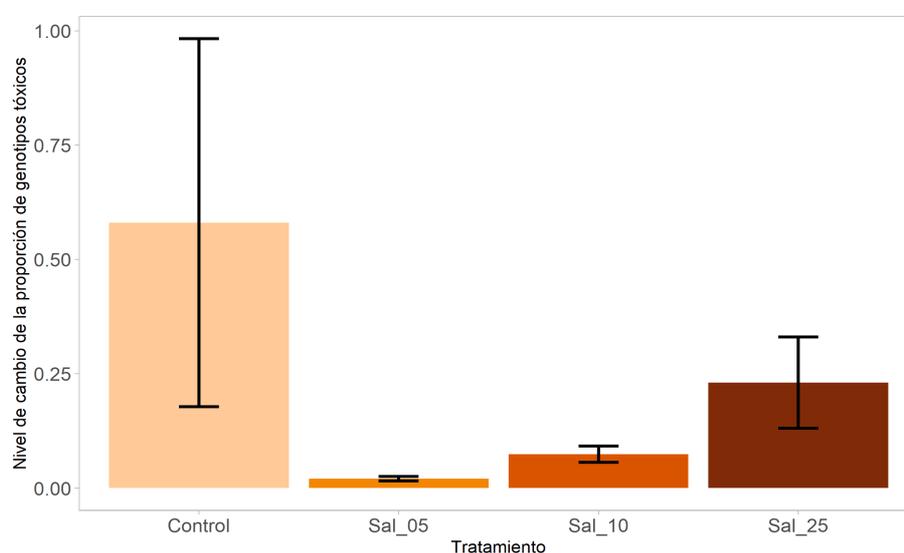


Figura 4.7. Valores del cambio en la proporción de genotipos tóxicos calculada como: proporción de genotipos tóxicos final / proporción de genotipos tóxicos inicial, para cada tratamiento.

4.6.6. Producción de toxinas

Las cuatro variantes de MC analizadas (LR, YR, RR y WR) fueron registradas en todos los casos analizados. Se detectaron concentraciones altas de MCs, sin embargo son concordantes a concentraciones encontradas en una floración (Bonilla *et al.*, 2105; Kruk *et al.*, 2019). Entre estas, la MC-LR presentó los valores de concentración más altos (rango: 23,57 - 5648,03 $\mu\text{g/L}$) y la variante que se detectó en menor rango de concentración fue MC-YR (rango: 0,98 - 76.68 $\mu\text{g/L}$). Mientras que las variantes MC-RR y MC-WR presentaron rangos

intermedios de 2,97 a 1119,06 $\mu\text{g/L}$ y 0,61 a 214,18 $\mu\text{g/L}$ respectivamente (**Figura 4.8**). Las cuatro variantes de microcistina se correlacionaron positiva y significativamente entre ellas (r_s : entre 0,45 y 0,92, $p < 0,05$, Apéndice 2), indicando que todas aumentaron entre el inicio y el final de los experimentos.

Los modelos que mejor se ajustaron a estos datos en base al menor valor de AIC fue la suma del tratamiento y el tiempo. La suma de las cuatro variantes de la toxina se vio afectada positivamente por el tiempo de incubación y negativamente por la salinidad (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2). Sin embargo, cuando se realizaron los modelos para cada variante de la toxina se hallaron diferentes repuestas. La variante MC-LR se asoció negativamente con la salinidad y positivamente con el tiempo de incubación (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2), mientras que MC-RR solo se vio afectada positivamente por el tiempo de incubación (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2). La concentración de la variante MC-YR a salinidad 10 primero disminuyó a las 4 hs de incubación y luego aumentó hacia el final de la incubación (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2). La concentración de la variante MC-WR sólo se vio disminuida luego de 4 horas de incubación (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2), luego no se registraron cambios significativos (GLS, $p > 0,05$, Apéndice 2).

Por otro lado se destaca el comportamiento de las variantes WR, YR y RR en el tratamiento de salinidad de 10, donde tuvieron mayor concentración al inicio en comparación con los demás tratamientos (**Figura 4.8**). Además, al séptimo día aumentó la concentración de MC-RR a 10 de salinidad en comparación con el tratamiento de 25 (**Figura 4.8**).

En suma, la producción de las variantes de MC por la comunidad tóxica del CMA fue generalmente mayor a salinidad 0. No obstante, a salinidades mayores comienzan a aumentar su concentración diferentes variantes, destacándose la MC-RR, WR y YR a salinidad de 10.

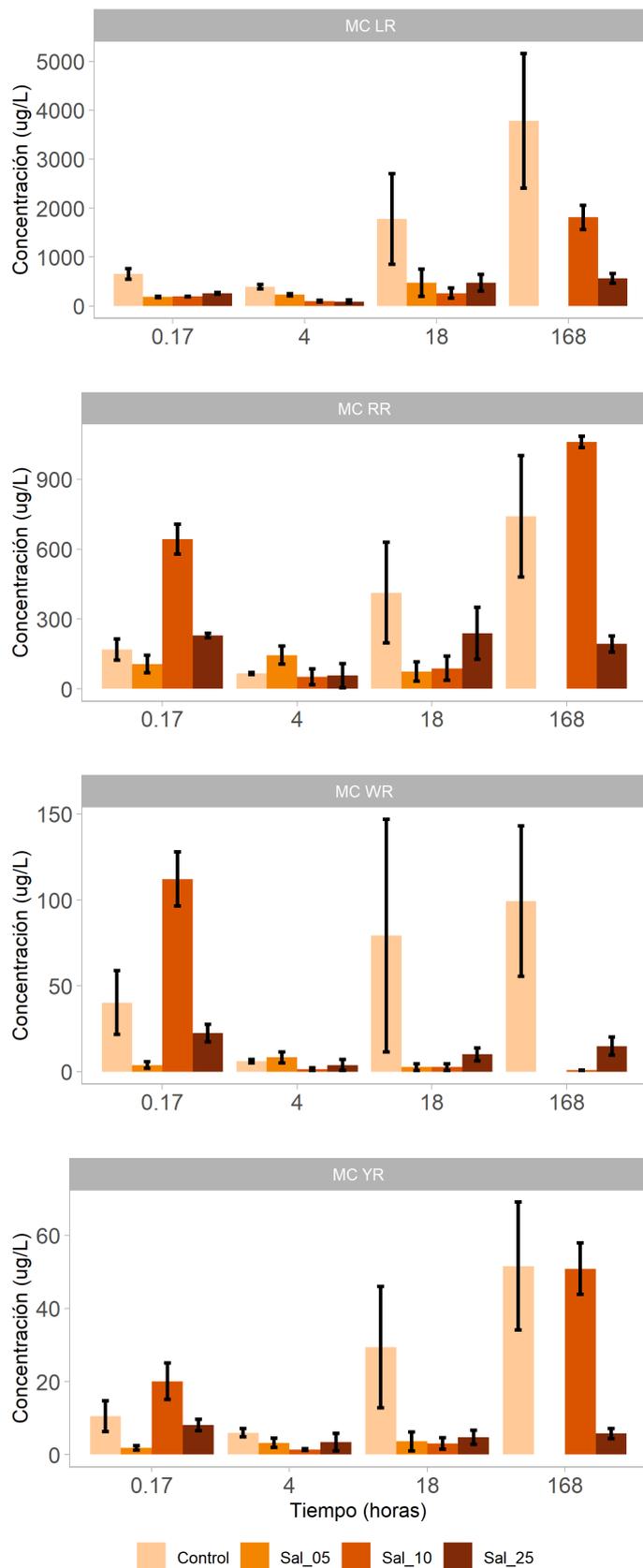


Figura 4.8. Concentraciones de las cuatro variantes de microcistina analizadas (µg/L) en función del tiempo (horas) para cada tratamiento. De arriba hacia abajo: MC-LR, MC-RR, MC-WR y MC-YR. Se destacan las diferencias en las escalas de los ejes Y.

4.6.7. Relación entre las diferentes variables analizadas

Los niveles de expresión del gen *mcyE* no se asociaron con la abundancia del mismo gen (r_s , $p > 0,05$). Por otro lado, la suma de las toxinas analizadas se asociaron positivamente con los niveles de expresión del gen *mcyE* pero no con el *mcyH* (r_s : 0,48, $p < 0,05$; $p > 0,05$ respectivamente, Apéndice 2).

4.7. *Discusión: efecto de la salinidad*

Los organismos del CMA son considerados especies de agua dulce, sin embargo, como se ha visto en el Capítulo 1, estos organismos también se encuentran en ambientes estuarinos donde la salinidad alcanza valores de 25. En este trabajo fue posible analizar los efectos de la salinidad en distintas etapas y dimensiones sobre una comunidad del CMA provenientes de agua dulce, identificando distintas respuestas con las diferentes salinidades y con el tiempo de exposición a las mismas. Se analizaron diversas variables biológicas (abundancia), fisiológicas (expresión de genes *mcy* y producción de toxinas) y variaciones en la diversidad genética a diferentes escalas de tiempo. Las respuestas observadas tuvieron que ver con la velocidad de los procesos involucrados. Los cambios fisiológicos (e.g., expresión de genes) de los organismos ocurrieron en horas a pocos días de exponer a las comunidades a los cambios ambientales, mientras que los cambios comunitarios ocurrieron mas lentamente en lapsos de pocos a varios días. En términos general existió un efecto negativo de la salinidad sobre la toxicidad y una selección de distintos ecotipos tóxicos y diversidad genotípica. Estos resultados aportan a entender como organismos del CMA, considerados especies de agua dulce, pueden desarrollarse y generar toxicidad en ambientes estuarinos donde la salinidad alcanza valores de 25.

4.7.1. Efecto de la salinidad en la abundancia de poblaciones tóxicas

Altos valores de salinidad afectaron negativamente la abundancia de células con genotipo tóxico luego de 18 hs de exposición, sin embargo, el tiempo de incubación afectó positivamente. Ross *et al.* (2019) reportaron tasas de crecimiento positivas a salinidades de 3 y 7 de la cepa *M. aeruginosa* (LB 2385). Sin embargo, a salinidad 10 la abundancia de

células se mantuvo constante durante 11 días de incubación (Ross *et al.*, 2019). Por otro lado, Tonk *et al.* (2007) utilizando la cepa *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 evaluaron el efecto de distintos niveles de salinidad, entre 10 y 18, y encontraron que a salinidades más altas (16 y 18), la tasa de crecimiento disminuyó significativamente ($\mu = 0,1 \text{ días}^{-1}$), sobreviviendo solamente durante 5 días a dichas salinidades (Tonk *et al.*, 2007). Los resultados del presente trabajo no solo muestran que los organismos tóxicos sobreviven a altas concentraciones de salinidad (25) sino que además pueden crecer en estas condiciones, representando uno de los estudios con valores más extremos publicados utilizando experimentos de laboratorio. Una de las causas puede ser que en general los experimentos son realizados con cepas y con organismos en forma unicelular.

En ambientes naturales los organismos de *Microcystis* spp. se encuentran formando colonias con sus células embebidas en mucílago, el cual brinda protección a las células del ambiente exterior (Liu *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en estudios que emplean cultivos de *Microcystis* en forma unicelular podría llevar a una subestimación de la capacidad de tolerar salinidades más altas en un ambiente natural, protegidas por el mucílago (Kurmayer *et al.*, 2003; Via-Ordorika *et al.*, 2004; Gan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Kruk *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). Asimismo, la comunidad de CMA utilizada correspondió a las tallas mayores de colonias, concentradas con red de 100 μm , éstas tienen respuestas diferentes a las de menor tamaño y toleran mayores salinidades asociada a su mayor cantidad de mucílago y tasa de respuespensión (Kruk *et al.*, 2017). Verspagen *et al.* (2006) utilizando comunidades naturales de *Microcystis* determinaron que la tasa de crecimiento no se ve afectada por salinidades < 10 pero disminuye a salinidades > 17 . Por otro lado, mediante estudios de campo, Robson & Hamilton (2003) determinaron que la tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{max}} = 1,2 \text{ días}^{-1}$) de *Microcystis* ocurre a a salinidad de 4 y que a partir de salinidad de 25 la tasa de crecimiento se vuelve negativa. Orr *et al.* (2004), experimentando con muestras obtenidas de una floración de *Microcystis*, observaron que la misma presentó tolerancia hasta 10 de salinidad y una vida media de 0,33 días ($\mu = -2,1 \text{ días}^{-1}$) a 23 de salinidad. Estos autores concluyen que la población de *Microcystis* utilizada para el experimento no era un monocultivo homogéneo, sino una mezcla de genotipos con diferente tolerancia a la salinidad y toxicidad (Orr *et al.*, 2004). Al igual que en el presente trabajo, se utilizaron comunidades naturales de *Microcystis* compuestas por mezcla de genotipos, en la que puede haber algunos capaces de tolerar salinidad cercanas a 25, valor más alto a lo reportado en los otros estudios. Esto implica

que en la naturaleza existirían poblaciones con genotipo tóxico capaces de tolerar salinidades estuarinas durante varios días.

4.7.2. Efectos de la salinidad sobre la estructura comunitaria de la fracción tóxica del CMA

En este trabajo se observaron cambios en la estructura de la comunidad tóxica del CMA inducidos por la salinidad. En general, salinidades mayores a 0 provocaron una disminución en la proporción de genotipos tóxicos y en su riqueza, siendo esta última especialmente afectada a salinidades de 10 y 25. Esto sugiere que a medida que aumenta la salinidad mayores son los efectos sobre el CMA, especialmente sobre la fracción tóxica. Más aún, las comunidades de los tratamientos a salinidad 10 y 25 mostraron mayor similitud entre ellas que en relación al tratamiento a salinidad 5 y al control. Por otro lado y en concordancia con lo reportado en el Capítulo 1, en el que se demuestra la presencia de genotipos tóxicos en el Río de la Plata con rangos de salinidad de 17 a 30 (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017), los hallazgos indican que existirían poblaciones tóxicas del CMA capaces de tolerar condiciones estuarinas durante al menos 10 días y que son genotipos diferentes a los hallados en agua dulce.

Un mecanismo importante que brinda a las bacterias la capacidad de tolerar altas salinidades es la acumulación de moléculas osmoprotectoras de bajo peso molecular denominadas solutos compatibles (Le Rudulier *et al.*, 1984). Mediante la acumulación de solutos compatibles el potencial del agua dentro de las células disminuye y de esta forma pueden evitar la diferencia de presión osmótica y la deshidratación (Roberts, 2005). En cianobacterias se ha reportado la síntesis y acumulación de diversos solutos osmoprotectores, principalmente sacarosa y α -glucosilglicerol (Hagemann, 2011). Sin embargo, en *Microcystis* los genes involucrados en la síntesis de sacarosa se han detectado hasta el momento en solo tres cepas (Sandrini *et al.*, 2015; Tanabe *et al.*, 2018). En este sentido, Tanabe *et al.* (2018) han demostrado que estas cepas han adquirido los genes para la síntesis de sacarosa mediante eventos recientes de transferencia horizontal de genes. Melero-Jimenez *et al.* (2019) proponen que la adaptación de *Microcystis* spp. al aumento de salinidad podría darse también por mutaciones espontáneas. Esto sugiere que, en el presente experimento, el cambio de una comunidad dulceacuícola a condiciones de mayor presión osmótica (salinidades 10 y 25) habría inducido cambios en la estructura

comunitaria. Estos cambios podían deberse ya sea al aumento del crecimiento de poblaciones portadoras de genes responsables para la síntesis de sacarosa que les permitieron sobrevivir y presentar cierta actividad durante el tiempo que duró el experimento, o debido a la proliferación de poblaciones portadoras de mutaciones espontáneas.

4.7.3. Efectos de la salinidad sobre la transcripción

Al evaluar el efecto de la salinidad sobre la expresión de los genes *mcyE* y *mcyH*, involucrados en la síntesis de microcistinas se vio que aunque ambos tuvieron la misma respuesta frente a los tratamientos con salinidad, ésta fue diferente a la encontrada para el espaciador PC-IGS (región intergénica del operón de ficocianina) utilizado como *proxy* del estado fisiológico de la comunidad del CMA. Esto indica que la salinidad afecta diferencialmente a las distintas funciones fisiológicas del organismo. Escasos estudios han evaluado el efecto de la salinidad sobre la expresión de genes *mcy*, sumado a que las salinidades evaluadas difieren mucho entre los estudios y que los experimentos son realizados con aislamientos, por lo tanto los resultados reportados en algunos casos no son concordantes. Por ej., Chen *et al.* (2015) evaluaron la expresión del gen *mcyD* en cultivos tratados con diferentes concentraciones de NaCl (desde 0 a 0,53 de salinidad) durante 12 días de incubación. Como resultado obtuvieron que tanto el tratamiento con NaCl como el tiempo de incubación afectaron negativamente la expresión. Por otro lado, Ross *et al.* (2019) realizaron experimentos con cultivos de una cepa de *Microcystis aeruginosa* a la cual sometieron a diferentes salinidades: 0, 3, 7 y 10 durante 11 días. Entre otras variables, cuantificaron el nivel de expresión del gen *mcyD* a diferentes tiempos, el cual no fue afectado significativamente ni por el tratamiento ni por el tiempo de incubación, sin embargo a los siete días de incubación detectaron niveles de expresión cercanos a cero en todos los tratamientos (Ross *et al.*, 2019). Los autores justifican estos hallazgos en base a que la salinidad podría inhibir la síntesis de toxinas, o bien que la activación de genes *mcy* podría estar más relacionada con el crecimiento bajo otras condiciones ambientales como elevadas temperaturas o cantidades excesivas de nitrógeno (Ross, *et al.*, 2019; Kramer *et al.*, 2018).

En el estudio realizado por Martin-Luna *et al.* (2015) se evalúa el efecto de dos salinidades (6 y 9) sobre la expresión del gen *mcyD* a diferentes horas de incubación encontrando que

a ambas concentraciones la expresión disminuye a las cuatro horas en comparación con el tratamiento control. Luego a las 48 y 72 hs de incubación la expresión del gen *mcyD* aumentó, los autores atribuyen este aumento a la aclimatación del cultivo luego del estrés osótico causado por la salinidad (Martin-Luna *et al.*, 2015). En el presente estudio se observó un aumento de la expresión de ambos genes *mcy* a las 18hs de incubación en todos los tratamientos incluido el control, una posible explicación a este fenómeno podría deberse a la aclimatación de la comunidad del CMA al ambiente del experimento, en donde la síntesis de la toxina podría cumplir un rol (Schatz *et al.*, 2007). Luego de 18 hs de incubación, la transcripción de *mcyE* y *mcyH* disminuyó en todos los tratamientos, lo cual ha sido reportado anteriormente (Chen *et al.*, 2015; Martin-Luna *et al.*, 2015). De acuerdo a lo descrito el gen *mcyH* presenta homología con transportadores ABC, sugiriendo que codifica para una proteína responsable del transporte transmembrana de microcistinas hacia el medio extracelular (Tillet *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2004). En este sentido, la expresión del gen *mcyH* disminuyó pero nunca llegó a inhibirse, por lo que no se descarta la posibilidad de que las toxinas se estuvieran exportando.

4.7.4. Efecto de la salinidad sobre las variantes de microcistinas (MCs)

Existen pocos estudios que evalúen el efecto de la salinidad sobre la concentración de diferentes variantes de MCs y en general se realiza la cuantificación de MCs totales por la técnica de ELISA o solo se determina la variante MC-LR (e.g. Chen *et al.*, 2015; Martin-Luna *et al.*, 2015).

A diferencia de lo que ocurre con la abundancia de poblaciones tóxicas y la transcripción de genes *mcy*, en algunos trabajos se encuentra que tanto el contenido intracelular como extracelular de toxinas se incrementa al aumentar la salinidad (desde 0 a 0,53), al exponer a los cultivos durante 12 días (Chen *et al.*, 2015). Por otro lado, otras investigaciones muestran un efecto negativo de la salinidad en la concentración de toxinas. Martin-Luna *et al.* (2015) encuentran una disminución de la concentración de la variante MC-LR intracelular al aumentar la salinidad a 9 y la relacionan con la baja tasa de crecimiento y el efecto de la salinidad en la fotosíntesis. De acuerdo a Tonk *et al.* (2007), la producción de MCs detectadas por ELISA en experimentos con una cepa de *Microcystis* disminuye a 16 y 18 de salinidad, pero manteniendo durante una semana la capacidad de producir bajas concentraciones de MCs. Estos autores demostraron además un aumento en la

concentración extracelular de MCs a salinidad de 18, adjudicándolo a la liberación de las toxinas intracelulares debido a la lisis inducida por la alta presión osmótica (Tonk *et al.*, 2007). En otro estudio con cultivos de una cepa de *Microcystis aeruginosa* sometidos a tres salinidades (3, 7 y 10), se observó que a 10 se inducía un aumento significativo de la concentración extracelular de MCs (Ross *et al.*, 2019), por lo que los autores sugieren que habría un umbral de salinidad (~10) al cual las toxinas se liberarían al exterior. Asimismo, encuentran que la concentración de MC extracelular se correlacionó negativamente con la abundancia celular, confirmando la hipótesis de liberación de las MC debido a la lisis celular (Ross *et al.*, 2019). Las diferencias entre estos estudios podría deberse a el uso de cultivos de diferentes cepas de *Microcystis* y diferencias en el método de detección de las MCs. Cabe destacar que la cepa *M. aeruginosa* PCC 7806 utilizadas en algunos de los estudios previamente mencionados (e.g., Tonk *et al.*, 2007) posee genes que sintetizan para solutos compatibles (sacarosa) (Sandrini *et al.*, 2015) brindando la capacidad de tolerar altas salinidades.

Orr *et al.* (2004) analizaron el efecto de la salinidad en muestras naturales de floraciones de *Microcystis* del río Swan (Australia) y encontraron que cuando los organismos de *Microcystis* son expuestos a una salinidad de 22 ocurre lisis celular y aumento de las concentraciones extracelulares de MCs. En esta tesis y al igual que en algunos estudios antes mencionados, se detectó un efecto negativo de la salinidad sobre la producción de MCs, sin embargo debido al método de extracción de toxinas no se pudo determinar si eran intra- o extracelulares. En base a la homología que presenta el gen *mcyH* con transportadores ABC de membrana y a los niveles de transcripción que presentó este gen durante las incubaciones, existe la posibilidad de que la toxina detectada en nuestros experimentos se estuviera exportando a medida que se sintetizaba. Sin embargo, no se puede descartar que exista lisis celular debido a que la abundancia de células con genotipo tóxico disminuyó hacia el final del experimento en todos los tratamientos con salinidad y desde el inicio en el tratamiento con mayor salinidad.

Al evaluar distintas variantes de la toxina se pueden observar diferentes patrones, principalmente a salinidad de 10, en la que se sintetizan otras variantes de MCs en comparación con el control. Este cambio podría estar dado por cambios en la comunidad de genotipos tóxicos, favoreciendo aquellas poblaciones que producen otras variantes de MCs. En este sentido, algunos estudios han utilizado el concepto de quimiotipo para

clasificar a las poblaciones de *Microcystis* en base su perfil de síntesis de oligopéptidos, en los que se incluye a las variantes de MCs (Welker *et al.*, 2007; Agha *et al.*, 2013; Lezcano *et al.*, 2019). Lezcano *et al.* (2019) estudiaron la relación entre las variantes de MCs y la variabilidad del gen *mcyB*. Para ello clasificaron cepas y colonias aisladas de *Microcystis* de diferentes ambientes en quimiotipos basados en las variantes de MCs y la variabilidad genética del gen *mcyB* evaluada mediante la técnica RFLP (del inglés: *Restriction fragment length polymorphism*). Como resultado obtuvieron una baja correlación entre los genotipos de *mcyB* y los quimiotipos, indicando baja relación entre la diversidad de las variantes MCs y la variabilidad del gen *mcyB*, lo cual también fue reportado en otros estudios (Kurmayer *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la diversidad estructural de las MCs no es explicada solo con la variabilidad genética del *mcyB* (Lezcano *et al.*, 2019). Lezcano *et al.* (2019) sugieren que estos resultados apoyan la idea de que las condiciones ambientales son determinantes de la diversidad de las variantes de MCs así como también las modificaciones postranscripcionales (Agha *et al.*, 2013; Lezcano *et al.*, 2019). Por otro lado, Mikalsen *et al.* (2003) demostraron que existe una fuerte correlación entre las variantes de MCs y la variabilidad genética del módulo *mcyB1*, resultado de recombinaciones entre módulos, como por ejemplo entre *mcyB1* con *mcyC*. Los resultados del presente trabajo sugieren que la salinidad estaría modulando el perfil de producción de las diferentes variantes de Mcs debido a la selección de poblaciones resistentes y/o por ocurrencia de recombinación entre dichos módulos inducidos por la salinidad. El estrés osmótico podría inducir la expresión de otros genes *mcy* generando variantes genéticas y por lo tanto la síntesis de diferentes variantes de MCs.

En resumen, el aumento de la salinidad provoca una disminución en la abundancia de genotipos tóxicos y genera cambios en la estructura de la comunidad en diez días. En presencia de salinidad sobreviven y crecen aquellos genotipos tolerantes, los cuales expresan genes *mcy* y sintetizan diferentes variantes de microcistinas, dependiendo del valor de la salinidad.

4.8. Resultados: efecto de la temperatura

4.8.1. Dinámica temporal de la abundancia de poblaciones tóxicas

Las tendencias observadas en la abundancia de células portadoras de genotipo tóxico fueron diferentes para cada tratamiento (**Figura 4.9**). El modelo que mejor se ajustó a los datos (menor valor de AIC) fue la interacción entre tratamientos y tiempos de incubación. La dinámica de la abundancia de genotipos tóxicos a 21 °C fue similar a la del tratamiento a 10 °C (GLS, $p > 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.9**). A las 18 hs la abundancia de genotipos tóxicos mostró un aumento significativo en el tratamiento a 10 °C y una disminución significativa a 30 °C (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.9**). Luego de 18 hs de incubación, la abundancia se mantuvo constante a 10 y 21 °C (GLS, $p > 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.9**), pero disminuyó a 30 °C (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.9**).

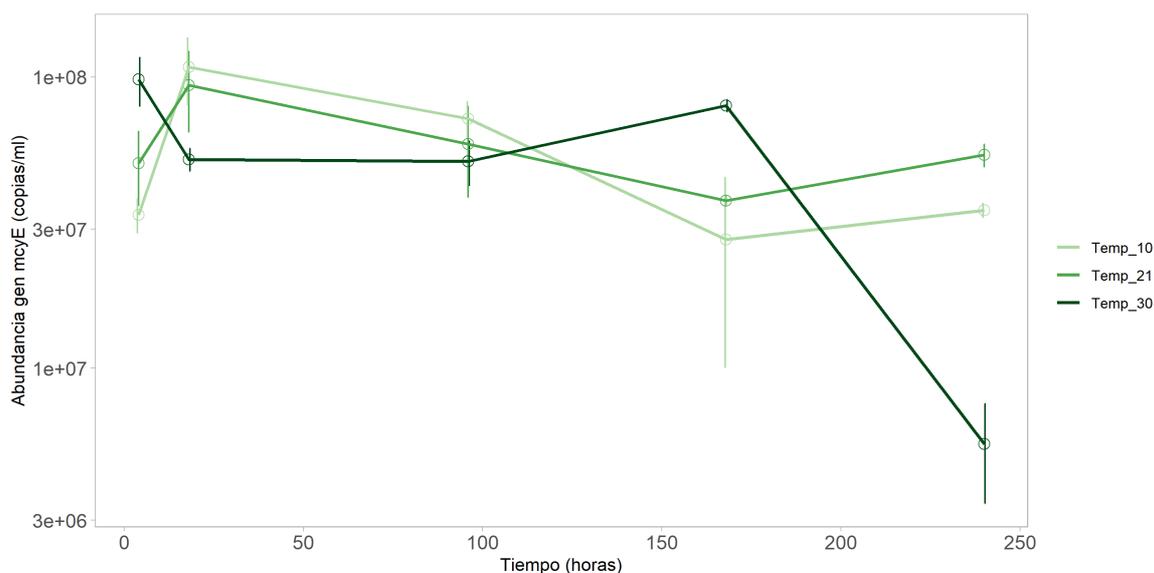


Figura 4.9. Valores de abundancia de genotipos tóxicos (gen *mcyE*, copias/ml) para cada tratamiento en función del tiempo de incubación (horas). Eje Y logarítmizado en base 10.

4.8.2. Dinámica de la transcripción de genes *mcy*

Las abundancias de transcritos de los genes *mcyE* y *mcyH* cuantificada en los distintos tratamientos y a diferentes tiempos de incubación presentaron un comportamiento similar (r_s 0,72, $p < 0,05$, Apéndice 2), con valores iniciales mayores dependiendo del tratamiento y una disminución hacia el fin del experimento (**Figura 4.10**).

El modelo que se ajustó mejor a estos datos en base al AIC fue la interacción de los tratamientos y los tiempos de incubación. La transcripción de ambos genes *mcy* disminuyó significativamente con el tiempo de incubación en los tratamientos a 10 y 21 °C (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.10**) pero aumentó hacia el final a 30 °C (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.10**).

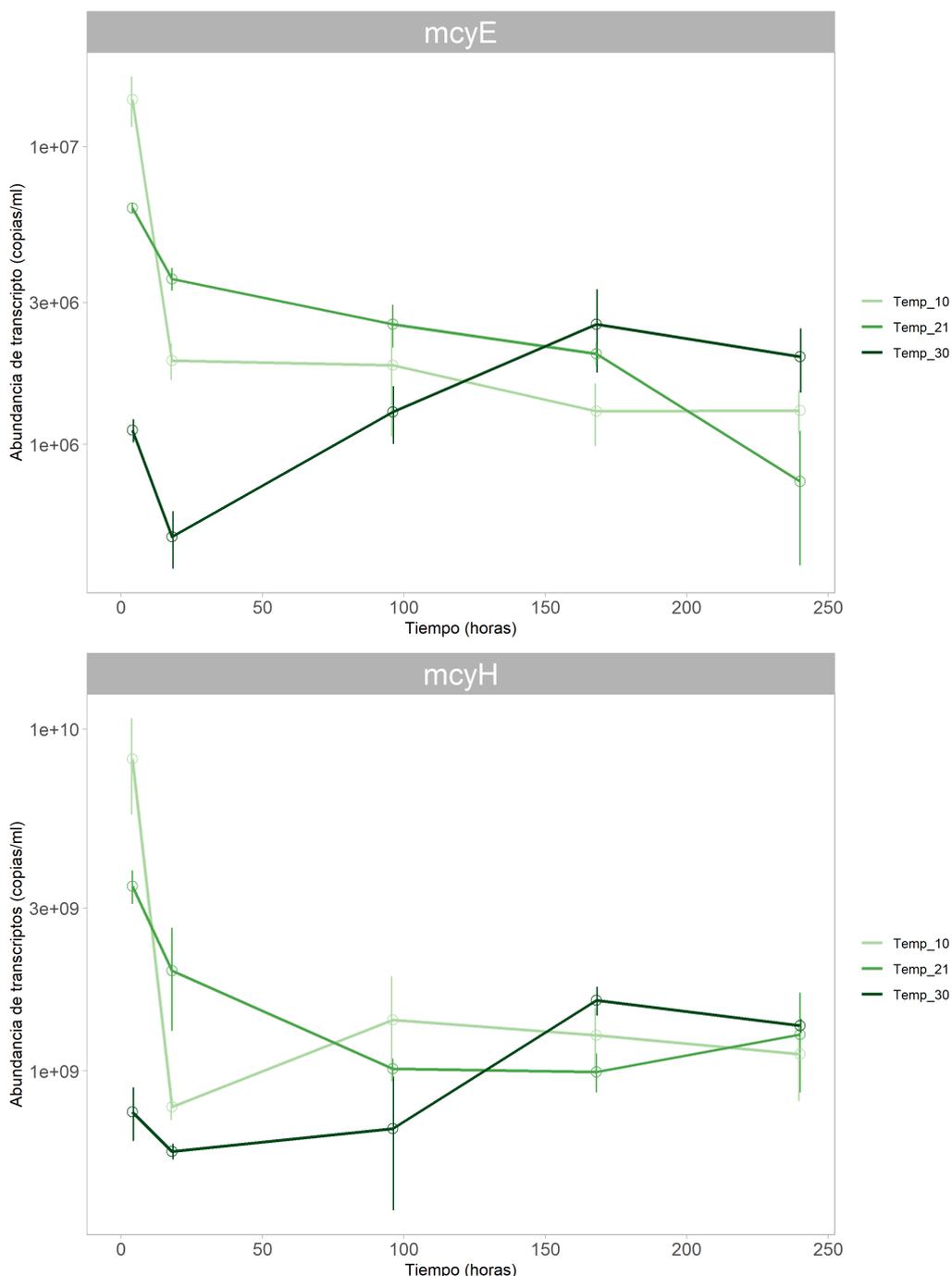


Figura 4.10. Valores de abundancia transcritos (copias/ml) de los genes *mcyE* (superior) *mcyH* (inferior) para cada tratamiento en función del tiempo de incubación (horas). Eje Y logaritmizado en base 10.

4.8.3. Actividad del CMA: estudio de la abundancia de transcritos del espaciador PC-IGS

La transcripción del operón ficocianina, analizada a través de la cuantificación de transcritos del espaciador PC-IGS, presentó el mismo patrón durante el tiempo de incubación en todos los tratamientos (**Figura 4.11**). El tiempo de incubación afectó positivamente los niveles de transcripción únicamente a 30 °C (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2). Por otro lado, al analizar el efecto de la temperatura a lo largo del tiempo se observó que el aumento de la temperatura afectó positivamente la expresión de PC-IGS a las 18 horas, 7 días y 10 días de incubación (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.11**).

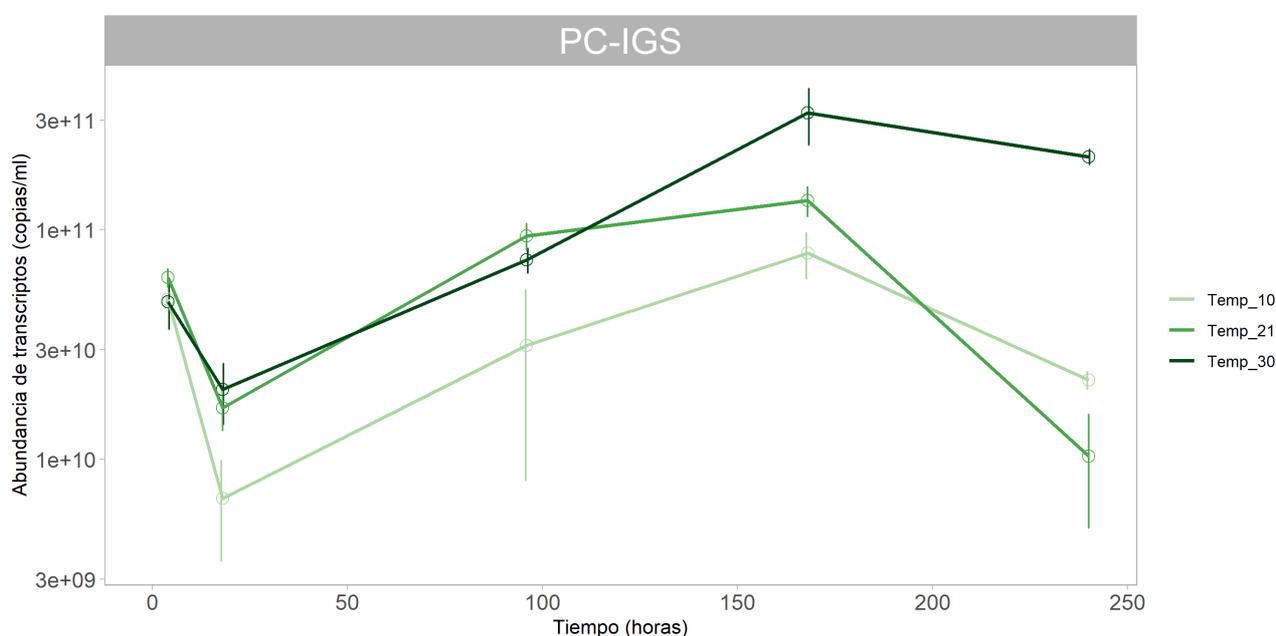


Figura 4.11. Valores de abundancia de transcritos (copias/ml) del espaciador intergénico de ficocianina (PC-IGS) para cada tratamiento en función del tiempo de incubación (horas). Eje Y logarítmico en base 10.

4.8.4. Diversidad de genotipos tóxicos

La metodología HRMA y *f*CART desarrollada previamente fue aplicada para estudiar los cambios de la diversidad de genotipos tóxicos al inicio y final del experimento de temperatura.

- HRMA del gen *mcyJ*

En la **Figura 4.11** se muestra el árbol obtenido con f CART al emplear los valores de temperatura como variable explicativa. Este árbol presenta tres hojas, cuyo error fue de significativamente menor al error calculado en la permutación aleatoria (LRT, $p < 0.05$). El primer valor umbral de temperatura seleccionado fue de 25,5 °C, a temperatura menor a 25,5 °C se seleccionó otro valor umbral de 15,5 °C (**Figura 4.12**). Esto se puede interpretar como un cambio en la estructura comunitaria de los genotipos tóxicos hacia el final del experimento en todos los tratamientos que a su vez fue diferente a la diversidad encontrada al inicio del experimento. Por otro lado, la diversidad de genotipos tóxicos observada al inicio del experimento fue similar a la observada en el tratamiento de 21 °C, temperatura más cercana a la encontrada en el embalse de Salto Grande, de donde provino la muestra con la que se realizó el experimento (25 °C) y que previamente fue aclimatada a 21 °C. (**Figura 4.12**). Se detectaron tres grupos diferentes de genotipos tóxicos, uno adaptado a cada temperatura empleada en los experimentos.

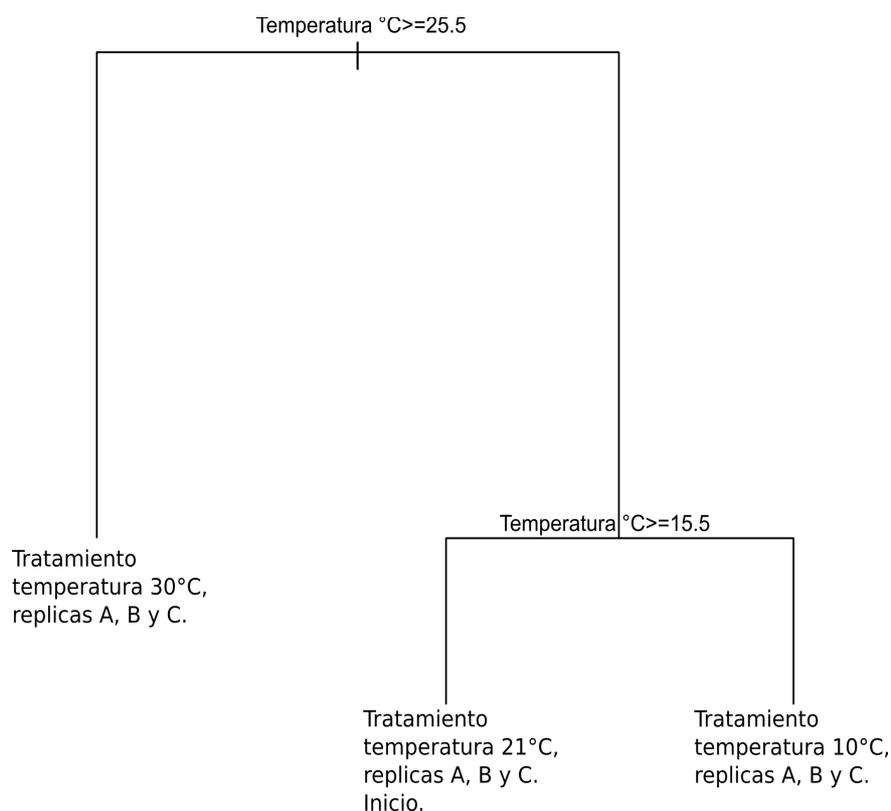


Figura 4.12. Árbol de regresión funcional que muestra las principales variables ambientales que explican la diversidad de perfiles de genotipos tóxicos. En cada nodo, se muestran la variable ambiental y su valor umbral. Al final de cada rama se presenta el nombre de la muestra (tratamiento y réplica) que fue agrupada. Las muestras corresponden al tiempo final de cada tratamiento y el tiempo inicial (inicio).

- DGGE del gen *mcyl*

El *cluster* de la presencia/ausencia de bandas mostró que tanto al inicio como al final de los tratamientos a 10 y 21 °C, los patrones de bandas presentaron mayor similitud, 76 a 93 % (**Figura 4.13**). El patrón de bandas obtenido al final del tratamiento a 30 °C fue el que presentó menor similitud en relación al resto de los tratamientos y al inicio del experimento, 57 y 47 % respectivamente (**Figura 4.13**).

La comunidad del CMA tóxico al inicio del experimento presentó mayor valor de riqueza (número de bandas = 17) en comparación con el tiempo final de los tratamientos de temperatura. Es decir, la riqueza de genotipos tóxicos disminuyó hacia el final de la incubación, con valores de riqueza de 13-14 y 14-15 a 10 y 21 °C, respectivamente. El menor valor se registró a tiempo final del tratamiento a 30 °C (número de bandas = 8).

En resumen, el aumento de la temperatura afectó negativamente a la diversidad de genotipos *mcyl* del CMA, siendo mayor el efecto a 30 °C.

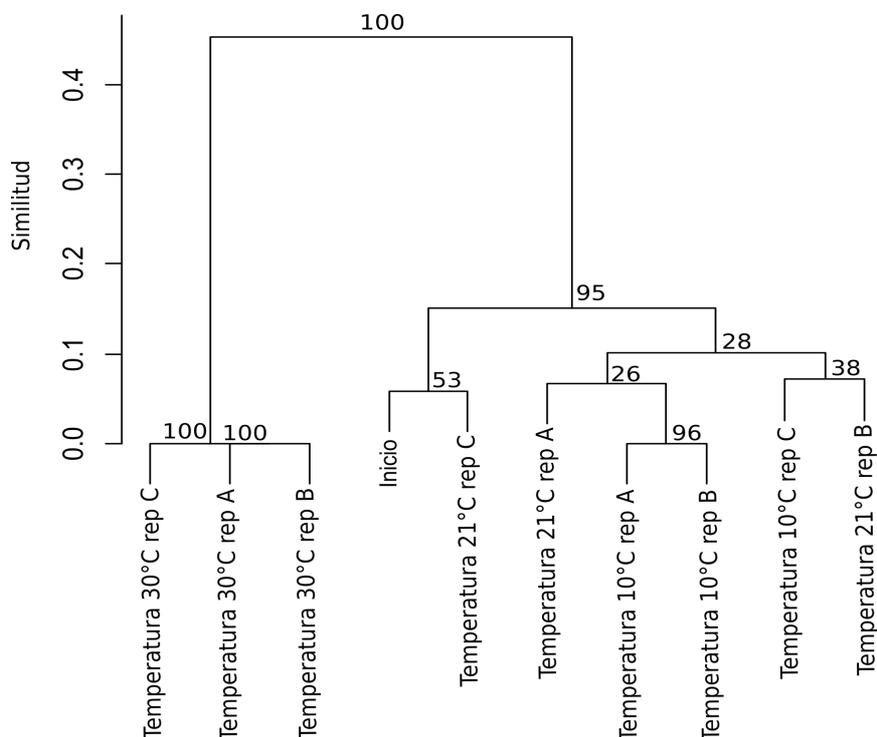


Figura 4.13. Dendrograma realizado en base a la presencia ausencia de bandas obtenidas de la técnica DGGE. Al final de cada rama se presenta la el nombre de la muestra (tratamiento y réplica) que fue agrupada. Las muestras corresponden al tiempo final de cada tratamiento y el tiempo inicial (inóculo). Distancia utilizada Jaccard, método UPGMA.

4.8.5. Variación de la proporción de genotipos tóxicos / no tóxicos

La proporción de genotipos tóxicos (abundancia del gen *mcyE* / abundancia del espaciador PC-IGS) a 21 °C se mantuvo constante durante el experimento (~0,08 proporción de genotipos tóxicos). En cambio, a 10 °C esta proporción fue significativamente mayor a los diez días de incubación (LRT, $p < 0,05$). Se calculó el nivel de cambio en la proporción de genotipos tóxicos hacia el final del experimento en relación al inicio para cada tratamiento: proporción de genotipos tóxicos final / proporción de genotipos tóxicos inicial. El valor de cambio en la proporción de genotipos tóxicos fue mayor en los tratamientos de 10 y 30 °C y menor en la temperatura más cercana al óptimo (**Figura 4.14**). Es decir, al final del tiempo de incubación aumentó la proporción de genotipos tóxicos en los tratamientos de 10 y 30 °C y se mantuvo constante a 21 °C.

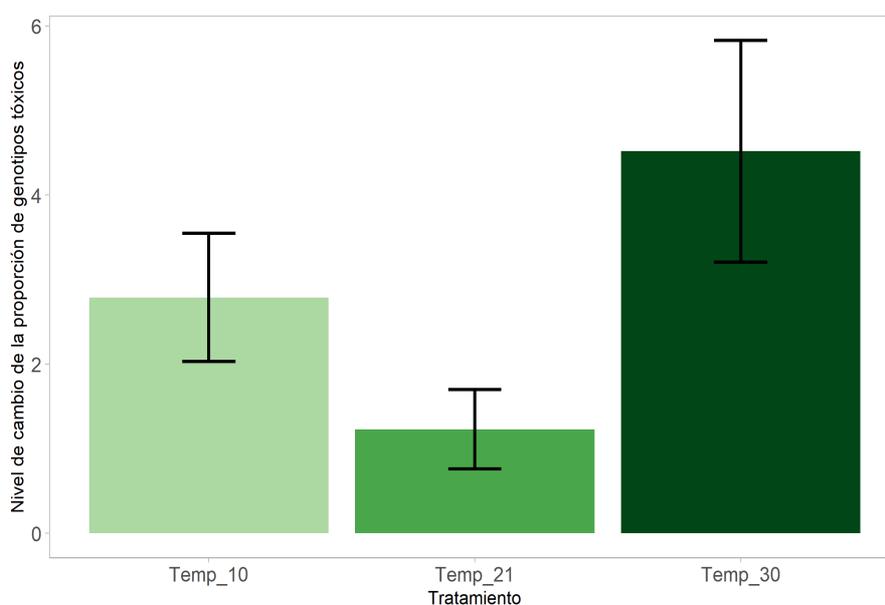


Figura 4.14. Valores de cambio en la proporción de genotipos tóxicos calculada como: proporción de genotipos tóxicos final / proporción de genotipos tóxicos inicial, para cada tratamiento.

4.8.6. Concentración de microcistinas

Al analizar si la temperatura afecta a la concentración y variantes de toxinas producidas se encontró que la variante MC-LR fue la que presentó los valores más altos de concentración (rango: 1056 - 6711 $\mu\text{g/L}$), mientras que la variante que se detectó en menor rango de concentración fue la MC-YR (rango: 1,2 - 42 $\mu\text{g/L}$) (**Figura 4.15**). Las variantes MC-RR y MC-WR presentaron rangos de 32,61 a 446,89 $\mu\text{g/L}$ y 0,97 a 303,49 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Las cuatro variantes de microcistina analizadas (LR, RR, YR, WR) se correlacionaron positiva y significativamente entre ellas (r_s : 0,54 - 0,87, $p < 0,05$, Apéndice 2).

El modelo que mejor se ajustó a estos datos en base al AIC fue la suma de tratamiento y tiempo. La suma de las cuatro variantes de la toxina se vio afectada negativamente por el tiempo de incubación y por la temperatura (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2). Cuando se realizaron los modelos para cada variante por separado se observó en general una disminución en el tiempo hasta las 18 hs pero a partir de entonces las respuestas para 21 vs 10 y 30°C cambiaron para las distintas variables. La concentración de la variante MC-LR disminuyó con el tiempo de incubación y con la temperatura a las 18 y 168 hs (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) en los tres tratamientos (**Figura 4.15**). La concentración de MC-RR disminuyó significativamente a las 18hs, sin embargo a temperaturas 10 y 30 °C la concentración de toxina es mayor en comparación con el tratamiento a 21 °C (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.15**). La variante MC-WR, que disminuyó significativamente a las 18hs en los tres tratamientos pero aumentó a las 168 hs (7 días) sólo a 10 y 30 °C (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.15**). El tiempo de incubación afectó negativamente a la variante MC-YR, los tratamientos a 10 y 30 °C presentaron el mismo comportamiento, aumentando a las 168 hs (7 días) de incubación en comparación con el tratamiento a 21 °C (GLS, $p < 0,05$, Apéndice 2) (**Figura 4.15**).

En suma, la producción de las variantes de MC por la comunidad tóxica del CMA fue generalmente mayor a 30 °C. No obstante, a temperaturas menores a la óptima de crecimiento del CMA (21-25 °C) comienzan a aumentar su concentración otras variantes, destacándose la MC-RR, WR y YR a temperatura de 10 °C.

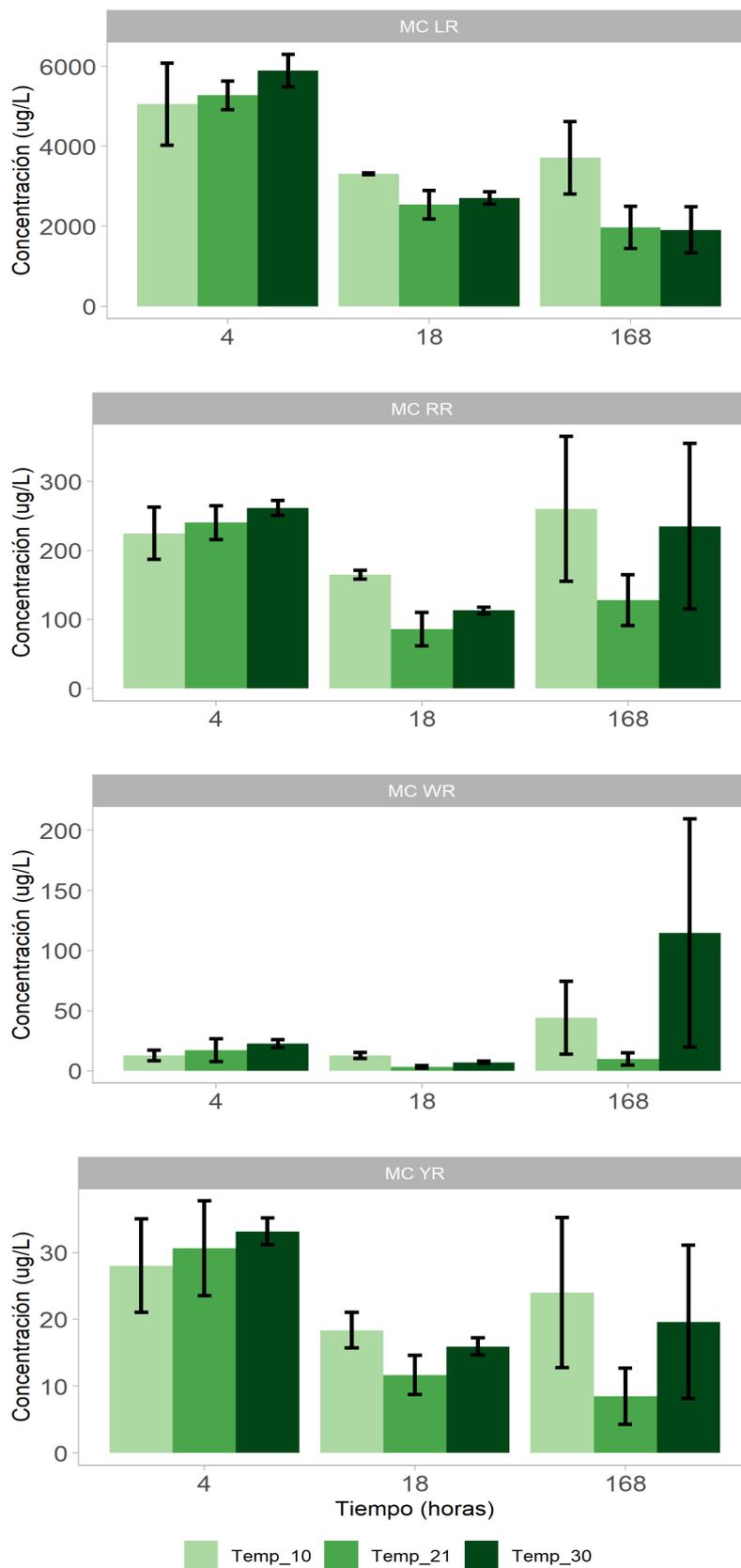


Figura 4.15. Concentraciones de las cuatro variantes de microcistina analizadas (µg/L) en función del tiempo (horas) para cada tratamiento. De arriba hacia abajo: MC-LR, MC-RR, MC-WR y MC-YR. Se detacan las diferencias en las escalas de los ejes Y.

4.8.7. Relación entre variables

En primer lugar, la abundancia de transcripción del gen *mcyE* no se asoció con la abundancia del mismo gen (Spearman, $p > 0,05$). De la misma manera, la suma de las concentraciones de las variantes de las toxinas analizadas no se asociaron con la abundancia de transcritos de los genes *mcy* (*mcyE* y *mcyH*) (Spearman, $p > 0,05$, Apéndice 2).

4.9. *Discusión: efecto de la temperatura*

Los resultados obtenidos permitieron analizar los efectos de los cambios en la temperatura sobre los distintos procesos involucrados en la producción de toxinas. Como se observa aquí y en los capítulos anteriores de la tesis la temperatura fue una de las principales determinantes de la toxicidad de las cianobacterias del CMA, afectando su crecimiento y generando cambios en la estructura comunitaria. Los experimentos realizados con comunidades naturales dominadas por organismos del CMA característicos de floraciones superficiales con colonias de gran tamaño, permitieron determinar que el aumento de temperatura provoca una disminución de la abundancia de células con genotipos tóxicos del CMA luego de diez días de incubación. Si bien no se observó efecto en la transcripción de los genes *mcy* generó cambios en la concentración de las diferentes variantes de MCs.

4.9.1. Efecto de la temperatura sobre la abundancia de poblaciones tóxicas

En general la abundancia disminuyó a lo largo del experimento, con diferencias en los distintos tratamientos de temperatura. Estas podrían deberse a efectos de las distintas temperaturas sobre las respuestas enzimáticas y tasas celulares (Gillooly *et al.*, 2001). A mayor temperatura al inicio hay una menor abundancia pero esta se recupera a lo largo del experimento resultando en que a 30 °C la actividad celular aumenta en comparación con 21 y 10 °C. Además de las tasas de crecimiento se podrían acelerar otros procesos, como ser la degradación por las bacterias que acompañan la floración (Worm & Søndergaard, 1998). En este sentido es que a 30 °C la abundancia de poblaciones tóxicas tienden a aumentar rápidamente hasta los siete días de incubación, luego a los diez días disminuye de forma significativa en comparación con las otras temperaturas (10 y 21 °C).

You *et al.* (2018) han evaluado el efecto de diferentes temperaturas (de 5 a 35 °C, cada 5 °C) sobre la tasa de crecimiento de una cepa de *Microcystis aeruginosa*. Los principales resultados incluyen la disminución de la duración de la fase exponencial al aumentar la temperatura (fase exponencial a 10 °C: 7 días, a 30 °C: 3 días) y el aumento de la tasa de crecimiento a 20 °C es aproximadamente el doble que a 10 °C (0,57 días⁻¹ y 0,24 días⁻¹ respectivamente). Cabe destacar que los resultados reportados por You *et al.* (2018) fueron obtenidos mediante experimentos con cultivos de una cepa unicelular de *Microcystis aeruginosa*, lo cual dificulta su comparación con el presente estudio en el cual se utilizan comunidades naturales del CMA y donde se inicia el experimento con abundancias relativamente altas de inóculo ($\sim 1 \times 10^4$ colonias del CMA/ml vs $\sim 1 \times 10^5$ células/ml). Sin embargo, a 30 °C los resultados experimentales son similares el ambos trabajos, su abundancia aumentó más rápidamente en comparación con los otros tratamientos, alcanzando la fase estacionaria (en caso de los cultivos) o disminución de la abundancia (en caso de las comunidades naturales) también más rápidamente (You *et al.*, 2018). Similares resultados han sido reportados por Giannuzzi *et al.* (2016) los cuales observaron que a temperaturas altas (29 °C) la tasa de crecimiento de una cepa de *Microcystis aeruginosa* era mayor que a temperaturas mas bajas (23 y 26 °C). En el mismo estudio observaron a partir del cuarto día de incubación una disminución de la abundancia celular en todos los tratamientos, atribuyéndolo a la elevada concentración celular en el inóculo y al consecuente rápido consumo de nutrientes (Giannuzzi *et al.*, 2016). En este sentido, la disminución de abundancia de genotipos tóxicos a 30 °C que se observa en este trabajo también se puede atribuir al consumo de nutrientes, tanto por el CMA como por las bacterias heterótrofas presentes (Dziallas & Grossart, 2011; Giannuzzi *et al.*, 2016) las cuales pueden además acelerar los procesos de degradación (Berlemont & Martiny, 2015). Por lo tanto, los genotipos tóxicos sobreviven y mantienen su abundancia a bajas temperaturas (10 °C) y a temperaturas medias (21 °C), pero a 30 °C aumenta rápidamente su abundancia (7 días) para rápidamente disminuir, acelerando la dinámica en su conjunto.

4.9.2. Efectos de la temperatura sobre la estructura comunitaria de la fracción tóxica del CMA

La temperatura afectó la estructura de la comunidad del CMA tóxico al final del experimento. Se observaron diferencias en la variabilidad genética en los tratamientos a 30 y 10 °C en comparación con la comunidad del tratamiento control (21°C) y la del inóculo. Esto sugiere que temperaturas altas (30 °C) y bajas (10 °C) alteran la composición de genotipos tóxicos del CMA respecto a temperaturas cercanas a las óptimas de crecimiento (21°C). Mowe *et al.* (2015) evaluaron las tasas de crecimiento de cinco especies diferentes de *Microcystis* a cuatro temperaturas (27 °C, 30 °C, 33 °C y 36 °C). Como resultado, encontraron que tres especies (*M. ichthyoblabe* (TG), *M. aeruginosa* y *M. viridis*) no presentaban diferencias en las tasas de crecimiento para las diferentes temperaturas (Mowe *et al.*, 2015). Sin embargo, *M. ichthyoblabe* (LP) y *M. flos-aquae* presentaban mayores tasas de crecimiento a 33 °C y 30 °C respectivamente (Mowe *et al.*, 2015). Esto podría indicar que a diferentes temperaturas algunas morfo-especies de *Microcystis* presentan ventajas competitivas sobre otras cepas (Mowe *et al.*, 2015).

Por otro lado, Rouco *et al.* (2011) realizaron un experimento utilizando 15 aislamientos de *M. aeruginosa* a las cuales las sometieron a propagaciones simultáneas y a un aumento de la concentración de nutrientes y de temperatura durante aproximadamente 87 generaciones (12 meses). Como resultado, reportaron aumentos en la tasa de crecimiento durante las propagaciones en las nuevas condiciones ambientales de nutrientes y temperatura, este resultado lo asocian principalmente con la adaptación de los organismos dada por nuevas mutaciones las cuales se fueron seleccionando y por lo tanto desplazando al genotipo ancestral (Rouco *et al.*, 2011).

Los cambios observados en la estructura comunitaria de genotipos tóxicos en este trabajo se podrían atribuir a la existencia de diferentes morfo-especies de *Microcystis* con distintas preferencias a las temperaturas estudiadas o a cambios fisiológicos y selección de aquellos organismos más exitosos. En los tratamientos a 10 y 30 °C la proporción de genotipos tóxicos presentó una tendencia a aumentar hacia el final del experimento, sin embargo a 21 °C no presentó alteraciones. Esto coincide con el resultado reportado en el Capítulo 1, donde se detectaron genotipos tóxicos *mcyD* con afinidad a temperaturas bajas. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de la proliferación de poblaciones portadoras

de mutaciones espontáneas que les permitan crecer mejor a temperaturas diferentes a la óptima para *Microcystis*.

4.9.3. Efectos de la temperatura sobre la transcripción

La transcripción de los genes *mcy* analizados (*mcyE* y *mcyH*) sólo aumentó en el tratamiento de mayor temperatura (30 °C) disminuyendo en los tratamientos a 10 y 21 °C. Esta respuesta fue distinta a la obtenida para abundancia de genotipos tóxicos y su estructura comunitaria. Scherer *et al.* (2017) evaluaron el efecto del aumento de la temperatura en 10 °C (de 20 a 30 °C) sobre la expresión de dos genes *mcy* (*mcyB* y *mcyD*) en 3 días de incubación. Como resultado observaron un aumento significativo en la expresión del gen *mcyB* pero no del gen *mcyD*, diferencia que asociaron a la ubicación de estos genes en diferentes operones del *cluster mcy* sujetos a diferente regulación (Scherer *et al.*, 2017). Kim *et al.* (2005) observaron una disminución en la expresión del gen *mcyB*, determinada mediante la técnica RT-PCR competitivo, cuando el cultivo de la cepa *M. aeruginosa* NIER10039 se expuso a 30 °C en comparación con 20 °C y 25 °C (Kim *et al.*, 2005). En base a estudios previos que sugieren que la producción de toxinas es mayor en condiciones óptimas de crecimiento del organismos (Sivonen & Jones, 1999), Kim *et al.* (2005) justifican los resultados obtenidos en base a que la temperatura óptima de crecimiento de la cepa *M. aeruginosa* NIER10039 es de 23 °C y disminuye al aumentar la temperatura. Por lo tanto, los niveles altos de expresión del gen *mcyB* observados a 25 °C lo atribuyen a que esa temperatura se asemeja a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa (Kim *et al.*, 2005). Otro de los genes *mcy* que ha sido evaluado a diferentes temperaturas es el gen *mcyA* en dos cepas de *Microcystis* (Pineda-Mendoza *et al.*, 2016). Pineda-Mendoza *et al.* (2015) reportaron que en ambas cepas la expresión del gen *mcyA* es menor a baja temperatura (20 °C) y mayor a alta temperatura (30 °C). En este contexto, los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que los genes *mcyE* y *mcyH* respondieron de igual forma a las diferentes temperaturas, sugiriendo que estos genes estarían igualmente regulados por la temperatura por estar en el mismo operón y, por lo tanto, el potencial de síntesis de microcistinas sería mayor a temperaturas altas (30 °C). Hasta el momento no se registra ningún reporte de evaluación de la expresión de genes a temperaturas bajas ~10 °C. En este sentido, en el presente trabajo se registraron niveles de expresión de genes *mcy* a 10 °C similares a 21 °C. Asimismo y como ya se ha mencionado, la estructura de la comunidad de genotipos tóxicos se vio afectada por la temperatura presentando mayor proporción de

genotipos tóxicos a menor y mayor temperatura (10 y 30 °C) e implica que a bajas temperaturas también existe un potencial tóxico del CMA y alerta acerca del riesgo en estaciones invernales. Esto está en línea con lo encontrado *in situ*, en el embalse de Salto Grande, donde la toxicidad estuvo presente tanto en invierno como en verano (Capítulo 3).

4.9.4. Efectos de la temperatura sobre las variantes de microcistinas (MCs)

Existen pocos estudios que evalúen el efecto de la temperatura sobre la concentración de diferentes variantes de MC (e.g., Amé & Wunderlin, 2005; Mowe *et al.*, 2015). En este trabajo, se evaluaron cuatro variantes de la toxina microcistina, de las cuales la MC-LR fue la dominante en todos los tiempos y tratamientos mientras que la MC-YR fue la variante encontrada en menor concentración. A pesar de las diferencias en las concentraciones, todas presentaron respuestas similares a los diferentes tratamientos de temperatura en el tiempo. Se ha reportado que existen diferencias en la proporción de las distintas variantes de toxinas a diferentes temperaturas y para diferentes cepas y especies de *Microcystis* (e.g., Amé & Wunderlin, 2005; Mowe *et al.*, 2015). Amé & Wunderlin, (2005) han evaluado el efecto de dos temperaturas (20 °C y 28 °C) sobre la producción de dos variantes de microcistinas (MC-LR y MC-RR) de una comunidad natural de *Microcystis* en cultivos semi-continuos durante 20 días. Uno de los principales resultados es que a 28 °C la proporción de MC-LR y MC-RR se mantuvo constante durante los 20 días de duración del experimento (Amé & Wunderlin, 2005). Por el contrario, en el tratamiento a 20 °C, la variante MC-RR aumentó significativamente con el tiempo llegando a ser la dominante al final del experimento (Amé & Wunderlin, 2005). Debido a que el aumento de la variante MC-RR a 20 °C fue muy alto (~82 veces más que la MC-LR), Amé & Wunderlin (2005) sugieren que este cambio podría explicarse por cambios en la composición de la comunidad de genotipos en lugar de una respuesta fisiológica de los organismos (Amé & Wunderlin, 2005). En este sentido, Mowe *et al.* (2015) observaron que el aumento de la temperatura de 27 °C a 33 °C genera un aumento en la concentración de MC en dos cepas de *Microcystis* (*M. ichthyoblabe* y *M. flos-aquae*) pero no en *M. aeruginosa* y *M. viridis*. Sin embargo, en todas las cepas analizadas la concentración de MC total disminuía a temperatura de 36 °C (Mowe *et al.*, 2015). Asimismo, las diferentes cepas analizadas por Mowe *et al.* (2015) presentaron diferencias en la relación MC-LR:MC-RR. Las cepas *M. ichthyoblabe* y *M. flos-aquae* presentaron alta proporción de MC-LR:MC-RR durante los 28 días de incubación, mientras que las otras cepas (*M. aeruginosa* y *M. viridis*) la relación MC-LR:MC-RR fue muy baja (Mowe *et*

al., 2015). Además, en este mismo estudio reportan que para la cepa *M. ichthyoblabe* (TG) a temperaturas altas (33 °C y 36 °C) la relación MC-LR : MC-RR fue mayor que a temperaturas más bajas (27 °C), lo cual no fue observado para la cepa *M. flos-aquae* (Mowe *et al.*, 2015). En contexto de cambio climático con proyecciones de aumento de entre 1,4 y 6 °C en la temperatura del agua (Corlett, 2012; Trewin, 2014) estos resultados indicarían una mayor producción de MC en especies de *Microcystis* (Mowe *et al.*, 2015).

En concordancia con estos resultados, Giannuzzi *et al.* (2016) utilizando una cepa de *Microcystis aeruginosa* observaron que diferentes temperaturas (23, 26 y 29 °C) inducen un cambio significativo en el perfil de las diferentes variantes de MC y que la proporción de MC-LR aumenta a 29 °C luego de cuatro días de incubación. Por lo tanto, demuestran que una misma cepa de *M. aeruginosa* puede producir diferentes variantes de MC y que la composición de estas variantes cambia según la temperatura a la cual es sometida el cultivo (Giannuzzi *et al.*, 2016). Como explicación para estos resultados, los autores sugieren que la temperatura podría generar cambios conformacionales en el lugar de unión al sustrato del módulo *mcyABC*, lo que podría generar cambios en la especificidad al sustrato y por lo tanto sintetizar diferentes variantes (Giannuzzi *et al.*, 2016). Alternativamente, sugieren que el aumento de la temperatura podría generar cambios en la disponibilidad de aminoácidos, favoreciendo la producción de distintas variantes de MC (Giannuzzi *et al.*, 2016).

Contrario a los trabajos antes mencionados, Pineda-Mendoza *et al.* (2015) han reportado mayor concentración de MC en dos cepas de *Microcystis* en condiciones de temperatura media (20 °C) en comparación con alta temperatura (30 °C) luego de 15 días de incubación. En el presente trabajo la variante MC-LR fue dominante en todos los tratamientos de temperatura y en todos los tiempos analizados. Sin embargo, a 30 °C aumentó la concentración de las otras variantes MC-RR, MC-YR y MC-WR.

Nuestros resultados podían deberse a diferentes factores que podían actuar en simultáneo. Por un lado cambios comunitarios en composición de especies (Amé & Wunderlin, 2005; Mower *et al.* 2015) que muestran que diferentes especies de *Microcystis* sintetizan diferentes variantes de MC en respuesta a cambios en la temperatura y el tiempo de exposición. En este sentido, luego de siete días de incubación son más importantes los cambios comunitarios en relación a las respuestas fisiológicas de los organismos, por lo tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían estar indicando que a 30 °C se selec-

cionan genotipos productores de diferentes variantes de MC. Si bien no se ha encontrado ningún trabajo que evalúe el efecto de bajas temperaturas (~ 10 °C), como nuestros resultados coinciden con lo observado a 30 °C, se podrían considerar similares justificaciones. Los cambios comunitarios generados luego de siete días de incubación a 10 °C provocaron una selección de genotipos productores de toxinas, principalmente la variante MC-LR pero también se seleccionaron aquellos que producen otras variantes. Por otro lado, no se descarta la hipótesis de la generación de cambios conformacionales y la disponibilidad de aminoácidos para la formación de las distintas variantes de MC (Giannuzzi *et al.* 2016) para explicar los resultados obtenidos.

En resumen, los cambios de temperatura, tanto por debajo como por encima del óptimo de crecimiento descrito para *Microcystis* (10 y 30 °C, respectivamente) generan cambios principalmente en la estructura comunitaria de genotipos tóxicos del CMA, aumentando su proporción y seleccionando a aquellos que sintetizan diversas variantes de MC. Estos resultados coinciden además con lo observado en el campo, aportando a identificar los mecanismos que explican la existencia de un elevado potencial tóxico por parte de los organismos del CMA durante todo el año en nuestro país.

4.10. Discusión general del Capítulo 4

Poniendo en contexto los resultados obtenidos en base al rol de la microcistina, algunos autores proponen que éstas tienen como función la eliminación de radicales libres, los cuales son tóxicos para los organismos (Zilliges *et al.*, 2011; Dziallas & Grossart, 2011; Chen *et al.*, 2015). Tanto el aumento de la salinidad como las temperaturas extremas (10 y 30 °C) llevan a las células a una condición de estrés oxidativo (Zilliges *et al.*, 2011; Dziallas & Grossart, 2011; Chen *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno son responsables de la degradación de la clorofila-a y de la disminución de la actividad del fotosistema II de fitoplancton (Saison *et al.*, 2010). En este sentido, en un estado de estrés oxidativo dado por diferentes variables ambientales (e.g., temperatura, salinidad) se esperaría un aumento en la producción de toxinas. Se ha reportado que a altas temperaturas aumenta la producción de microcistinas en un cultivo de *Microcystis* (Zilliges *et al.*, 2011; Dziallas & Grossart, 2011; Giannuzzi *et al.*, 2016) y que el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el contenido de clorofila-a y sobre la tasa de crecimiento fue menor en cepas tóxicas de *Microcystis* en comparación con no-tóxicas (Zilliges *et al.*, 2011; Dziallas & Grossart, 2011). Asimismo, Chen *et al.* (2015) reportan un aumento de la producción y secreción de microcistinas al aumentar la salinidad, lo cual lo relacionan con el posible rol de las toxinas para la eliminación de radicales generados por la salinidad. Asimismo, Zilliges *et al.* (2011) propusieron un mecanismo sobre cómo las microcistinas son favorecidas a células productoras de toxinas expuestas a estrés oxidativo. Las microcistinas podrían unirse a algunas ficobilinas y, por lo tanto, las protegería de la degradación por especies reactivas de oxígeno (Zilliges *et al.*, 2011). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el Capítulo 4 apoyarían la hipótesis del rol de la microcistina como moléculas protectoras y eliminadoras de radicales libres de oxígeno, ya que a salinidad de 10 aumentan todas las variantes de microcistinas analizadas y a temperatura de 10 °C y 30 °C a los 7 días se observa mayor concentración de las diferentes variantes de microcistinas en comparación con 21 °C, temperatura a la cual las células no estarían estresadas.

4.11. Conclusiones generales del Capítulo 4

El aumento de la salinidad genera una disminución de genotipos tóxicos y cambios en su estructura comunitaria. Las poblaciones que toleran altas salinidades pueden expresar genes *mcy* en niveles bajos sintetizando diferentes variantes de microcistinas según el valor de salinidad (**Figura 4.16**).

Tanto las bajas y altas temperaturas (10 °C y 30 °C respectivamente) mantienen constante la abundancia de genotipos tóxicos, sin embargo generan cambios en la estructura comunitaria del CMA tóxico aumentando su proporción. Durante la incubación a estas temperaturas se van seleccionando aquellos genotipos tóxicos que sintetizan diversas variantes de MC (**Figura 4.16**).

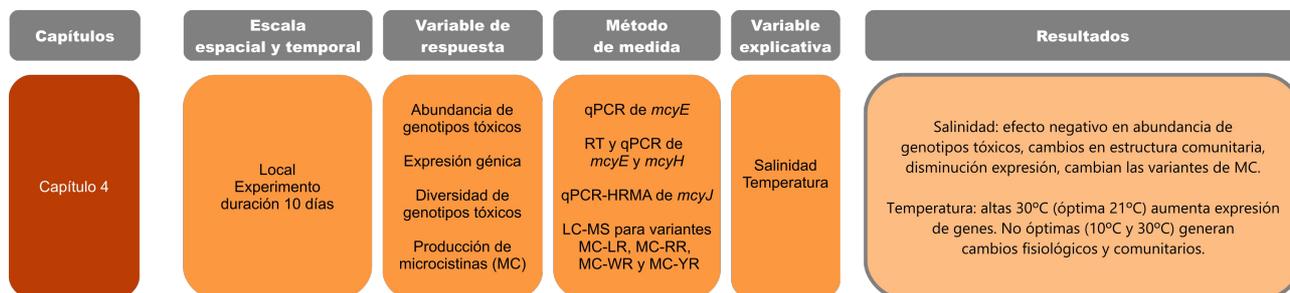


Figura 4.16. Esquema de trabajo, indicando la escala espacial y temporal, variables de respuesta estudiadas y su método de análisis, las variables explicativas utilizadas en el Capítulo 4 y los principales resultados obtenidos en el mismo.

En breve este capítulo será traducido al inglés para realizar dos publicaciones, una por cada experimento, las mismas serán publicadas en una revista internacional, e.g. *Harmful Algae*.

Conclusiones finales y modelo conceptual sobre la dinámica del CMA en el río Uruguay y el Río de la Plata

El principal objetivo de esta tesis fue profundizar en el conocimiento acerca de la ecología del complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA). El énfasis fue desentrañar los mecanismos que condicionan su toxicidad en gradientes ambientales, como por ejemplo el río Uruguay y el Río de la Plata. Para cumplir con dicha meta, se realizaron estudios de campo combinados con experimentos de laboratorio en condiciones controladas.

En el gradiente ambiental río Uruguay-Río de la Plata, se analizó la distribución, dinámica y diversidad de las poblaciones tóxicas del CMA y la importancia de las variables ambientales que condicionan dichos atributos (Capítulo 1 y 2). Uno de los resultados a destacar fue la presencia de organismos tóxicos en todas las fechas y estaciones de muestreo, presentando mayores abundancias en el embalse de Salto Grande en verano. Los modelos aplicados determinaron que las variables más importantes en explicar la distribución de los genotipos tóxicos fueron la temperatura y salinidad del agua. Sin embargo, los cuatro genes no presentaron la misma asociación con las variables ambientales, en este caso se destaca el gen *mcyD*, el cual se asoció negativamente con la temperatura, los demás genes presentaron una asociación positiva. Esto indica la existencia de genotipos tóxicos con diferentes preferencias ambientales, en este caso las bajas temperaturas (invierno) favorecen a un grupo de genotipos tóxicos que contienen al menos el gen *mcyD*. Estos resultados confirman la primera hipótesis planteada en la tesis, la cual ponía a prueba la existencia de diferentes respuestas de poblaciones tóxicas del CMA a distintos factores ambientales, prediciendo que la salinidad y la temperatura serían las variables ambientales más relevantes.

Estos resultados nos llevan a plantear la segunda hipótesis de esta tesis: la fracción tóxica del CMA está compuesta por una diversidad de poblaciones tóxicas con diferente adecuación biológica al ambiente, lo que permite su éxito en un amplio rango ambiental y que dicha diversidad puede ser identificada a través de sus genotipos *mcy*. Para afirmar esta hipótesis se desarrolló un procedimiento que combina una técnica molecular altamente sensible (HRMA) y análisis de datos funcionales con métodos de aprendizaje automático

(fCART) aplicado a el gen *mcyJ*. De esta forma se determinó la existencia diversidad de poblaciones tóxicas con diferentes preferencias ambientales de temperatura, salinidad y turbidez del agua. En este sentido se definieron seis ecotipos con diferentes preferencias ambientales, lo que demuestra la capacidad de adaptación de los organismos del CMA a diferentes ambientes y por lo tanto su proliferación en todo el mundo. Por lo tanto se confirma la hipótesis planteada.

Para conocer más acerca de la producción de las toxinas y su relación con las variables ambientales se realizaron estudios *in situ* sobre la transcripción de genes involucrados en la síntesis de microcistinas (genes *mcy*) en el embalse de Salto Grande con el fin de comprobar la tercera hipótesis (Capítulo 3). Como resultado se determinó que diferentes variables ambientales tuvieron efectos a diferentes niveles ecológicos del CMA. La temperatura afectó a nivel comunitario, provocando cambios en la estructura de la comunidad de genotipos tóxicos y de todo el CMA al pasar de verano a invierno. A nivel fisiológico (expresión de genes *mcy*) la conductividad y turbidez del agua presentaron un efecto negativo sobre la expresión de genes *mcy*. Además, el embalse como modificación física del ecosistema disminuye la diversidad del CMA y aumenta la abundancia de genotipos tóxicos y expresión de genes *mcy*. En este sentido se puede afirmar la hipótesis propuesta, la cual se basa en que las poblaciones tóxicas de CMA son más exitosas en condiciones de aguas quietas y alta carga de nutrientes, condiciones que brinda el embalse de Salto Grande.

En base a dichos hallazgos se estudiaron los efectos de dos variables ambientales (salinidad y temperatura) sobre una comunidad natural del CMA mediante experimentos controlados, donde se analizó la abundancia y diversidad de genotipos tóxicos, así como también la expresión de genes *mcy* y la concentración de microcistinas (Capítulo 4). Ambas variables tuvieron efecto sobre la estructura de la comunidad de genotipos tóxicos. El aumento de la salinidad provoca una disminución de la abundancia y proporción de genotipos tóxicos y de la expresión de genes *mcy* (*mcyE* y *mcyH*). La producción de las variantes de microcistina fue diferente según el tratamiento de salinidad, destacándose la salinidad de 10 la cual indujo la producción de otras variantes respecto al control. Con los resultados obtenidos se puede confirmar la hipótesis y predicción planteada: salinidades altas afectan el metabolismo celular, incluyendo la síntesis de toxinas, provocando menor transcripción de genes *mcy* en muestras con salinidad mayores a 0.

Por otro lado, tanto bajas como altas temperaturas (10 y 30 °C, respectivamente) mantienen constante la abundancia de genotipos tóxicos, sin embargo, la proporción de éstos aumenta a 10 y 30 °C. La expresión de los genes *mcyE* y *mcyH* disminuye en los tratamientos de 10 y 21 °C y aumenta a 30 °C. Durante la incubación los principales cambios en las concentraciones de las variantes de MC se observan en los tratamientos de 10 y 30 °C donde aumentan diferentes variantes. La hipótesis que se planteó con la temperatura fue que las poblaciones tóxicas tienen mayores temperaturas óptimas para contrarrestar los mayores gastos metabólicos de la producción de toxinas. En este sentido se predice que a temperaturas mayores existirá una dominancia de poblaciones con genotipos tóxicos y a temperaturas menores se favorecerán las poblaciones con genotipo no tóxico. Sin embargo, los resultados obtenidos contradicen en parte la hipótesis planteada, ya que la proporción de genotipos tóxicos dominó en relación a los no tóxicos tanto en altas como en bajas temperaturas (10 y 30 °C, respectivamente). Estos experimentos tienen como limitante el estudio la variación de un sólo factor (salinidad o temperatura), lo que resulta poco adecuado la extrapolación de los resultados al ambiente. En este sentido, la realización de experimentos donde se combinen la variación de temperatura y salinidad, generaría información más certera de como los organismos responseen en el ambiente natural.

Capítulos	Escala espacial y temporal	Variable de respuesta	Método de medida	Variable explicativa	Resultados
Capítulo 1	Gradiente regional Un año	Abundancia de genotipos tóxicos	qPCR de <i>mcyB</i> , <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> y <i>mcyJ</i>	Ambiente Biológicas	Temperatura efecto positivo Salinidad efecto negativo Correlación positiva con otros indicadores de cianobacterias
Capítulo 2	Gradiente regional Un año	Diversidad de genotipos tóxicos	qPCR-HRMA de <i>mcyJ</i>	Ambiente	Temperatura, conductividad y turbidez: determinantes y moduladores de ecotipos del CMA
Capítulo 3	Zonal Verano-Invierno	Abundancia de genotipos tóxicos Expresión génica Diversidad de genotipos tóxicos Diversidad de la comunidad delCMA	qPCR de <i>mcyB</i> , <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> y <i>mcyJ</i> RT y qPCR de <i>mcyB</i> , <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> y <i>mcyJ</i> qPCR-HRMA de <i>mcyJ</i> Secuenciación masiva dePC-IGS	Ambiente Biológicas	Efecto estacional: riqueza y presencia de ecotipos tóxicos Efecto del embalse: favorece abundancia de poblaciones tóxicas y expresión de <i>mcy</i> independientemente de la estación del año.
Capítulo 4	Local Experimento duración 10 días	Abundancia de genotipos tóxicos Expresión génica Diversidad de genotipos tóxicos Producción de microcistinas (MC)	qPCR de <i>mcyE</i> RT y qPCR de <i>mcyE</i> y <i>mcyH</i> qPCR-HRMA de <i>mcyJ</i> LC-MS para variantes MC-LR, MC-RR, MC-WR y MC-YR	Salinidad Temperatura	Salinidad: efecto negativo en abundancia de genotipos tóxicos, cambios en estructura comunitaria, disminución expresión, cambian las variantes de MC. Temperatura: altas 30°C (óptima 21°C) aumenta expresión de genes. No óptimas (10°C y 30°C) generan cambios fisiológicos y comunitarios.

Figura 1. Esquema de trabajo de la tesis, indicando la escala espacial y temporal, variables de respuesta estudiadas y el método de análisis, y las variables explicativas utilizadas en cada capítulo y los principales resultados obtenidos de los mismo.

En base a la información obtenida mediante las diferentes aproximaciones aplicadas en esta tesis se podría realizar una aproximación de un modelo conceptual de la ecología de los organismos del CMA, particularmente de los genotipos tóxicos, en el ecosistema río Uruguay-Río de la Plata.

El sitio más al norte estudiado fue Bella Unión (agua arriba del embalse de Salto Grande) donde se encontró baja abundancia y producción de toxinas y una alta diversidad de la comunidad del CMA. Estos organismos llegarían al embalse donde las condiciones físicas son favorables para su proliferación, provocando un aumento de la abundancia de poblaciones tóxicas y cambiando la estructura comunitaria del CMA. Esto tendría como consecuencia que pasaran a dominar pocos genotipos con una gran actividad de transcripción de genes involucrados en la síntesis de microcistinas. Dentro del embalse, la temperatura es una variable clave en determinar la estructura de la comunidad del CMA y de la fracción tóxica. Al pasar de verano (27 °C - 30 °C) a invierno (10 °C - 15 °C), la estructura de la fracción tóxica (al igual que toda la comunidad del CMA) cambia, viéndose favorecidas aquellas poblaciones que producen activamente la toxina.

Inmediatamente aguas abajo del embalse (ej: Puerto Yeruá) la abundancia de poblaciones con genotipo tóxico disminuye, al igual que su toxicidad, sin embargo, la estructura comunitaria del CMA se mantiene similar a la del embalse. Durante su trayecto aguas abajo, hacia el estuario, diversas variables ambientales influyen sobre las poblaciones tóxicas. Por ej. la temperatura aumenta la abundancia de células con genotipo tóxico, mientras que la salinidad las afecta negativamente. A su vez, también se ve afectada la estructura comunitaria, la cual se modifica durante la migración de los organismos debido a cambios de las variables ambientales tales como temperatura, salinidad y turbidez. Dado que existen ecotipos tóxicos del CMA con diferentes preferencias ambientales, la distinta combinación de estas variables a lo largo del gradiente selecciona a aquellos cuyas preferencias ambientales son las óptimas para su proliferación.

Por tanto, los ecotipos de agua dulce expuestos al agua del estuario disminuyen su abundancia y proporción, siendo reemplazados en su dominancia por ecotipos capaces de sobrevivir y sintetizar a corto plazo otras variantes de microcistina además de la MC-LR (MC-WR, MC-RR y MC-YR). Luego de siete días en condiciones estuarinas aumenta la concentración de otras variantes (MC-LR, MC-RR y MC-YR) y, aún cuando la salinidad llegue a 25 (aproximado a valores del océano) y la transcripción disminuya, la síntesis de toxinas continúa durante al menos diez días. Por otro lado, los cambios de temperatura del agua debidos a las estaciones del año o a la influencia del océano en el estuario también provocan cambios fisiológicos en la comunidad del CMA. Al aumentar la temperatura (~30 °C), como por ejemplo en verano, aumenta la proporción y toxicidad de células con genotipo tóxico, sintetizándose diversas variantes de microcistina. En invierno, por otro lado (~10 °C), si bien la transcripción disminuye drásticamente al cabo de siete días de exposición a bajas temperaturas, aumentan las concentraciones de las diferentes variantes de microcistinas. En suma, tanto el aumento de la salinidad como variaciones en la temperatura generan una diversificación en el perfil de producción de microcistinas por el CMA.

La información generada en esta tesis permitió profundizar en el conocimiento de la ecología del CMA en el sistema río Uruguay-Río de la Plata. Empleando métodos moleculares de alta resolución se generó conocimiento original sobre los cambios de la estructura comunitaria del CMA tóxico y la expresión y síntesis de toxinas provocados por el ambiente.

Perspectivas

El presente trabajo de tesis genera nuevas preguntas enfocadas a diferentes temáticas. Una de las temáticas está relacionada al estudio de los mecanismos que estructuran las comunidades microbianas utilizando como modelo de estudio al CMA en los sistemas río Uruguay y Río de la Plata. En este sentido, contamos con un proyecto Fondo Clemente Estable (FCE) financiado por la ANII con el objetivo de evaluar los mecanismos que estructuran las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva del espaciador intergénico de ficocianina (PC-IGS). De esta forma se continuará con los estudios acerca de los mecanismos que generan los ecotipos del CMA. Como siguiente paso sería relevante evaluar el modelo generado en la tesis en otros ecosistemas acuáticos y de esta forma caracterizar mejor a los ecotipos.

Por otro lado, seguir profundizando en conocer el rol que cumplen las toxinas (microcistinas) realizando experimentos controlados de laboratorio variando y combinando diferentes condiciones ambientales (e.g., temperatura y salinidad) y biológicas, y evaluando la expresión de genes *mcy* y producción de diferentes variantes de las toxinas. Sería interesante realizar los mismos experimentos utilizando comunidades del CMA (inóculo) provenientes de otros ambientes, como por ejemplo de Montevideo donde las características ambientales, principalmente de salinidad, son diferentes al embalse de Salto Grande.

Con los resultados obtenidos de los experimentos sería relevante generar un modelo mecanicista para estudiar las condiciones óptimas de crecimiento de las poblaciones tóxicas y no tóxicas del CMA, de esta forma aportar a un modelo de predicción de las diferentes poblaciones del CMA. Esto aportará a prevenir los riesgos sobre la salud humana y animal. En este sentido, relacionar la presencia de floraciones tóxicas con información de la salud poblacional es de suma importancia ya que en Uruguay existe poco información de esta relación.

Por último, una temática poco estudiada y que no fue abordado en esta tesis, es el estudio del rol de la microbiota heterótrofa asociada al mucílago de las cianobacterias. Particularmente el CMA contiene en su mucílago alta abundancia de bacterias heterótrofas y sería muy relevante conocer las interacciones que existen entre estas bacterias. En este sentido la Dra. Claudia Piccini ha postulado un proyecto relacionado a esta temática a los llamados FCE de la ANII.

Referencias bibliográficas

- Adams, D.G., Carr, N.G. & Wilcox, M. (1981) The developmental biology of heterocyst and akinete formation in cyanobacteria. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, **9**, 45–100.
- Agha, R., Cirés, S., Wörmer, L. & Quesada, A. (2013) Limited stability of microcystins in oligopeptide compositions of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria): Implications in the definition of chemotypes. *Toxins*, **5**, 1089–1104.
- Alcántara, I. (2019) Niveles de riesgo de exposición a floraciones de cianobacterias en el río Uruguay: forzantes ambientales y modelos de predicción. Tesis de Maestría, área Geociencias, PEDECIBA.
- Alcántara, I., Piccini, C., Segura, A.M., Deus, S., González, C., Martínez de la Escalera, G. & Kruk, C. (2018) Improved biovolume estimation of *Microcystis aeruginosa* colonies: A statistical approach. *Journal of Microbiological Methods*, **151**, 20–27.
- Alfonso, M., Perewoska, I. & Kirilovsky, D. (2001) Redox control of ntcA gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Nitrogen availability and electron transport regulate the levels of the NtcA protein. *Plant physiology*, **125**, 969–981.
- Amé, M.V. & Wunderlin, D.A. (2005) Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* population. *Water, Air, and Soil Pollution*, **168**, 235–248.
- Arrigo, K. (2005) Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, **437**, 349–355.
- Aubriot, L., Conde, D., Bonilla, S. & Sommaruga, R. (2004) Phosphate uptake behavior of natural phytoplankton population during exposure to solar ultraviolet radiation in a shallow coastal lagoon. *Marine Biology*, **144**, 623–631.
- Bar-Yosef, Y., Sukenik, A., Hadas, O., Viner-Mozzini, Y. & Kaplan, A. (2010) Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Current biology*, **20**, 1557–1561.
- Berlemont, R. & Martiny, A.C. (2015) Genomic Potential for Polysaccharide Deconstruction in Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 1513–1519.
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Birv©, R., Krys, S. & Fontaine, J.J. (2003) Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environmental Toxicology*, **18**, 176–186.
- Berry, M.A., White, J.D., Davis, T.W., Jain, S., Johengen, T.H., Dick, G.J., Sarnelle, O. & Deneff, V.J. (2017) Are Oligotypes Meaningful Ecological and Phylogenetic Units? A Case Study of *Microcystis* in Freshwater Lakes. *Frontiers in Microbiology*, **08**.
- Beversdorf, L.J., Chaston, S.D., Miller, T.R. & McMahon, K.D. (2015) Microcystin *mcyA* and *mcyE* Gene Abundances Are Not Appropriate Indicators of Microcystin Concentrations in Lakes. *PLOS ONE*, **10**,

e0125353.

- Bittencourt-Oliveira, M.D.C., De Oliveira, M.C. & Bolch, C.J. (2001) Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). *Journal of Phycology*, **37**, 810–818.
- Blottière, L., Rossi, M., Madricardo, F. & Hulot, F.D. (2014) Modeling the role of wind and warming on *Microcystis aeruginosa* blooms in shallow lakes with different trophic status. *Theoretical Ecology*, **7**, 35–52.
- Bolch, C.J. & Blackburn, S.I. (1996) Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. *Journal of Applied Phycology*, **8**, 5–13.
- Bolch, C.J., Orr, P.T., Jones, G.J. & Blackburn, S.I. (1999) Genetic, morphological, and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, **35**, 339–355.
- Bonilla, S. (ed.). (2009) Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. P. in.: *PHI-VII Documento Técnico N 16*, UNESCO, Montevideo, 94 pp.
- 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*, **31**, 63–74.
- Bonilla, S., Pérez, M. & De León, L. (1995) Cianofíceas Planctónicas del Lago Ton-Ton, Canelones, Uruguay. *Hoehnea*, **21**, 185–192.
- Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L., Rodríguez-Gallego, L., Piccini, C., Meerhoff, E., Rodríguez, L., Gómez, P. & Machado, I. (2006) Procesos estructuradores de las comunidades biológicas en lagunas costeras de Uruguay. Pp. 611–630 in: *Bases Para La Conservación y El Manejo de La Costa Uruguaya* (R. Menafrá, L. Rodríguez-Gallego, F. Scarabino & D. Conde, editors). Vida Silvestre/US-Fish Wildlife Service, Montevideo.
- 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., Aubriot, L. (2015) Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *Innotec*, 9–22.
- Breiman, L., Friedman, J., Stone, C.J. & Olshen, R.A. (1984) Classification and regression trees. P. in.: *CRC press*.
- Brena, B. & Bonilla, S. (2009) Producción de Toxinas y Otros Metabolitos. P. in: *Cianobacterias Planctónicas Del Uruguay. Manual Para La Identificación y Medidas de Gestión*. (S. Bonilla, editor). UNESCO, Uruguay.
- Briand, E., Escoffier, N., Straub, C., Sabart, M., Quiblier, C. & Humbert, J.-F. (2009) Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *The ISME Journal*, **3**, 419–429.
- Briand, E., Bormans, M., Quiblier, C., Salençon, M.-J. & Humbert, J.-F. (2012) Evidence of the Cost of the Production of Microcystins by *Microcystis aeruginosa* under Differing Light and Nitrate Environmental Conditions. *PLoS ONE*, **7**, e29981.
- Burnham, K.P. & Anderson, D.R. (2002) Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. P. in.: *2nd ed. Springer*, New York, 488 pp.

- Calliari, D., Gómez, M. & Gómez, N. (2005) Biomass and composition of the phytoplankton in the Río de la Plata: large-scale distribution and relationship with environmental variables during a spring cruise. *Continental Shelf Research*, **25**, 197–210.
- Calliari, D., Brugnoli, E., Ferrari, G. & Vizziano, D. (2009) Phytoplankton distribution and production along a wide environmental gradient in the South-West Atlantic off Uruguay. *Hydrobiologia*, **620**, 47–61.
- Carmichael, W. (1992) Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, **72**, 445–459.
- Chalar, G. (2006) Eutrophication dynamics on different temporary scales: Salto Grande Reservoir (Argentina-Uruguay). P. in: *Eutrofização Na América Do Sul: Causas, Conseqüências e Tecnologias Para Gerenciamento e Controle* (J. Tundisi, T. Tundisi-Matsumura & T. Sidagis, editors). Instituto Internacional de Ecologia–IIE, São Paulo.
- Chalar, G. (2009) The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, **39**, 200–208.
- Chandler, D.C. (1942) Limnological Studies of Western Lake Erie: II. Light Penetration and Its Relation to Turbidity. *Ecology*, **23**, 41–52.
- Chen, L., Mao, F., Kirumba, G.C., Jiang, C., Manefield, M. & He, Y. (2015) Changes in metabolites, antioxidant system, and gene expression in *Microcystis aeruginosa* under sodium chloride stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, **122**, 126–135.
- Chorus, I. (2012) Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries, 63-2012. *Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt), Germany, Dessau*.
- Chorus, I. & Bartram, J. (eds.). (1999) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. P. in.: *E & FN Spon*, London; New York, 416 pp.
- Cohan, F.M. (2002) What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*, **56**, 457–487.
- Cohan, F.M. (2006) Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **361**, 1985–1996.
- Cohan, F.M. (2011) Are species cohesive?—a view from bacteriology. P. in.: *ASM Press*: Washington, DC, USA.
- Cohan, F.M. & Perry, E.B. (2007) A Systematics for Discovering the Fundamental Units of Bacterial Diversity. *Current Biology*, **17**, R373–R386.
- Cohan, F.M. & Ward, D. (2005) Microbial diversity in hot spring cyanobacterial mats: pattern and prediction.
- Conde, D. & Rodríguez-Gallego, L. (2002) Problemática ambiental y gestión de las lagunas costeras atlánticas de Uruguay. P. 15 pp in: *Perfil Ambiental Del Uruguay* (A. Domínguez & R. Prieto, editors). Nordan-Comunidad, Montevideo.
- Conde, D., Aubriot, L., Bonilla, S. & Sommaruga, R. 240: 57-70. (2002) Marine intrusions in a coastal lagoon enhance the negative effect of solar UV radiation on phytoplankton photosynthetic rates. *Marine Ecology Progress Series*, **240**, 57–70.

- Corlett, R.T. (2012) Climate change in the tropics: the end of the world as we know it? *Biological Conservation*, **151**, 22–25.
- Cutler, D.R., Edwards Jr, T.C., Beard, K.H., Cutler, A., Hess, K.T., Gibson, J. & Lawler, J.J. (2007) Random forests for classification in ecology. *Ecology*, **88**, 2783–2792.
- 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. *This issue contains the special section on "Strains,"* **8**, 715–725.
- De León, L. (2000) Composición y dinámica de la comunidad fitoplanctónica de un embalse subtropical (Salto Grande, Uruguay-Argentina).
- De León, L. & Chalar, G. (2003) Abundancia y diversidad del fitoplancton en el Embalse de Salto Grande (Argentina-Uruguay). Ciclo estacional y distribución espacial. *Limnetica*, **22**, 103–113.
- De Leon, L. & Yunes, J.S. (2001) First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environmental Toxicology*, **16**, 110–112.
- De'ath, G. (2002) Multivariate regression trees: a new technique for modeling species–environment relationships. *Ecology*, **83**, 1105–1117.
- DeVries, S., Galey, F., Namikoshi, M. & Woo, J. (1993) Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **5**, 403–408.
- DINAMA. (2009) Floración de Cianobacterias del río Uruguay el 4 febrero de 2009. *DINAMA*, Montevideo.
- Dittmann, E., Fewer, D.P. & Neilan, B.A. (2013) Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**, 23–43.
- Dokulil, M. (2000) Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, **438**, 1–12.
- Dziallas, C. & Grossart, H.-P. (2011) Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. *PLoS One*, **6**, e25569.
- Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Froscio, S.M., Tozer, G.J. & Hawkins, P.R. (1999) Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss Albino mice. *Environmental Toxicology*, **14**, 143–150.
- Falkowski, P.G., Laws, E.A., Barber, R.T. & Murray, J.W. (2003) Phytoplankton and their role in primary, new, and export production. Pp. 99–121 in: *Ocean Biogeochemistry: The Role of the Ocean Carbon Cycle in Global Change* (M.J.R. Fasham, editor). Springer.
- Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical reviews*, **106**, 3468–3496.
- Fujii, M., Rose, A.L. & Waite, T.D. (2011) Iron uptake by toxic and nontoxic strains of *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 7068–7071.
- Furukawa, K., Noda, N., Tsuneda, S., Saito, T., Itayama, T. & Inamori, Y. (2006) Highly sensitive real-time PCR

assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. *Journal of bioscience and bioengineering*, **102**, 90–96.

- Gademann, K. & Portmann, C. (2008) Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Current Organic Chemistry*, **12**, 326–341.
- Gan, N.Q., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z.X., Liu, J., Hu, C.L. & Song, L.R. (2012) The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environ. Microbiol.* **14**, 730–742.
- Ganopoulos, I., Argiriou, A. & Tsaftaris, A. (2011) Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control*, **22**, 532–541.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P. & Thompson, F.L. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 733.
- Giannuzzi, L., Krock, B., Minaglia, M.C.C., Rosso, L., Houghton, C., Sedan, D., Malanga, G., Espinosa, M., Andrinolo, D. & Hernando, M. (2016) Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **189**, 22–30.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., & Charnov, E. L. (2001). Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science*, **293**, 2248–2251.
- Ginn, H., Pearson, L. & Neilan, B. (2010) NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 4362–4368.
- van Gremberghe, I., Leliaert, F., Mergeay, J., Vanormelingen, P., Van der Gucht, K., Debeer, A.-E., Lacerot, G., De Meester, L. & Vyverman, W. (2011) Lack of Phylogeographic Structure in the Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Suggests Global Dispersal. *PLoS ONE*, **6**, e19561.
- Guedes, I.A., da Costa Leite, D.M., Manhães, L.A., Bisch, P.M., Azevedo, S.Mfo. & Pacheco, A.B.F. (2014) Fluctuations in microcystin concentrations, potentially toxic *Microcystis* and genotype diversity in a cyanobacterial community from a tropical reservoir. *Harmful Algae*, **39**, 303–309.
- Hagemann, M. (2011) Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS microbiology reviews*, **35**, 87–123.
- Hall, C.J., Jordaan, A. & Frisk, M.G. (2011) The historic influence of dams on diadromous fish habitat with a focus on river herring and hydrologic longitudinal connectivity. *Landscape Ecology*, **26**, 95–107.
- Harada, K., Tsuji, K., Watanabe, M.F. & Kondo, F. (1996) Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature. *Phycologia*, **35**, 83–88.
- 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.
- Hautala, H., Lamminmäki, U., Spoof, L., Nybom, S., Meriluoto, J. & Vehniäinen, M. (2013) Quantitative PCR detection and improved sample preparation of microcystin-producing *Anabaena*, *Microcystis* and

Planktothrix. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **87**, 49–56.

- Hayes, P.K. & Barker, G.L. (1997) Genetic diversity within baltic sea populations of *Nodularia* (cyanobacteria) 1. *Journal of Phycology*, **33**, 919–923.
- 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**, 3568–3575.
- Hofinger, B.J., Jing, H.-C., Hammond-Kosack, K.E. & Kanyuka, K. (2009) High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, **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. *Journal of Applied Microbiology*, **120**, 138–151.
- Huisman, J., Matthijs, H.C.P. & Visser, P.M. (2005) Harmful Cyanobacteria. P. in.: *Aquatic Ecology*, Springer, Dordrecht, 243 pp.
- Huo, D., Chen, Y., Zheng, T., Liu, X., Zhang, X., Yu, G., Qiao, Z. & Li, R. (2018) Characterization of *Microcystis* (Cyanobacteria) genotypes based on the internal transcribed spacer region of rRNA by next-generation sequencing. *Frontiers in microbiology*, **9**, 971.
- Imai, H., Chang, K.-H., Kusaba, M. & Nakano, S. -i. (2008) Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii*. *Journal of Plankton Research*, **31**, 171–178.
- Jaccard, P. (1901) Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull Soc Vaudoise Sci Nat*, **37**, 547–579.
- Jähnichen, S., Ihle, T., Petzoldt, T. & Benndorf, J. (2007) Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6994–7002.
- Jang, M.-H., Ha, K., Joo, G.-J. & Takamura, N. (2003) Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*, **48**, 1540–1550.
- Jang, M.-H., Jung, J.-M. & Takamura, N. (2007) Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and infochemical concentrations. *Limnology and Oceanography*, **52**, 1454–1466.
- 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. *Harmful Algae*, **10**, 188–193.
- Kaebernick, M., Neilan, B.A., Borner, T. & Dittmann, E. (2000) Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3387–3392.
- Kaebernick, M., Dittmann, E., Borner, T. & Neilan, B.A. (2002) Multiple Alternate Transcripts Direct the Biosynthesis of Microcystin, a Cyanobacterial. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 449–455.

- Kaplan, A., Harel, M., Kaplan-Levy, R.N., Hadas, O., Sukenik, A. & Dittmann, E. (2012) The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Frontiers in microbiology*, **3**, 138.
- Kaplan-Levy, R.N., Hadas, O., Summers, M.L., Rucker, J. & Sukenik, A. (2010) Akinetes: dormant cells of cyanobacteria. Pp. 5–27 in: *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*. Springer.
- Kardinaal, W.E.A. & Visser, P.M. (2005) Dynamics of cyanobacterial toxins. *Harmful Cyanobacteria Aquatic Ecology Series, Springer, Dordrecht, the Netherlands*, 41–64.
- Kardinaal, W.E.A., Tonk, L., Janse, I., Hol, S., Slot, P., Huisman, J. & Visser, P. (2007a) Competition for Light between Toxic and Nontoxic Strains of the Harmful Cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 2939–2946.
- Kardinaal, W.E.A., Janse, I., Kamst-van Agterveld, M., Meima, M., Snoek, J., Mur, L.R., Huisman, J., Zwart, G. & Visser, P.M. (2007b) *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquatic Microbial Ecology*, **48**, 1–12.
- Kashtan, N., Roggensack, S.E., Rodrigue, S., Thompson, J.W., Biller, S.J., Coe, A., Ding, H., Marttinen, P., Malmstrom, R.R., Stocker, R., Follows, M.J., Stepanauskas, R. & Chisholm, S.W. (2014) Single-Cell Genomics Reveals Hundreds of Coexisting Subpopulations in Wild *Prochlorococcus*. *Science*, **344**, 416–420.
- Kasting, J.F. & Siefert, J.L. (2002) Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science*, **296**, 1066–1068.
- Kato, T. (1991) Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. *Hydrobiol./Suppl. 92. Algological Studies*, **64**, 129–140.
- Khomutov, G., Fry, I.V., Huflejt, M.E. & Packer, L. (1990) Membrane lipid composition, fluidity, and surface charge changes in response to growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311 under high salinity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **277**, 263–267.
- Kim, H.R., Kim, C.K., Ahn, T.S., Yoo, S. & Lee, D.H. (2005) Effects of temperature and light on microcystin synthetase gene transcription in *Microcystis aeruginosa*. Pp. 606–611 in: *Trans Tech Publ*.
- Kim, J. & Lee, C. (2014) Rapid fingerprinting of methanogenic communities by high-resolution melting analysis. *Bioresource Technology*, **174**, 321–327.
- 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. *FEMS Microbiology Ecology*, **74**, 93–102.
- Koeppel, A., Perry, E.B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D.M., Rooney, A.P., Brambilla, E., Connor, N., Ratcliff, R.M., Nevo, E. & Cohan, F.M. (2008) Identifying the fundamental units of bacterial diversity: A paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 2504–2509.
- Komárek, J. (2016) Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: state as of 2014. *Hydrobiologia*, **764**, 259–270.
- Komárek, J. & Komárková, J. (2002) Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology, Olomouc*, **2**, 1–24.

- Konopka, A. & Brock, T.D. (1978) Effect of temperature on blue-green algae (cyanobacteria) in Lake Mendota. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**, 572–576.
- Kopac, S. & Cohan, F.M. (2011) A theory-based pragmatism for discovering and classifying newly divergent bacterial species. Pp. 21–41 in: *Genetics and Evolution of Infectious Disease*. Elsevier.
- Kramer, B.J., Davis, T.W., Meyer, K.A., Rosen, B.H., Goleski, J.A., Dick, G.J., et al. (2018) Nitrogen limitation, toxin synthesis potential, and toxicity of cyanobacterial populations in Lake Okeechobee and the St. Lucie River Estuary, Florida, during the 2016 state of emergency event. *PLoS One* **13**, e0196278.
- QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology): presenting of a software package for comparison and analysis of microbial communities, primarily based on high-throughput amplicon sequencing data.
- Kruk, C. & De León, L. (2002) Asociaciones de fitoplancton en lagos y embalses del Uruguay: validación y aplicación a la gestión de sistemas acuáticos. Pp. 143–155 in: *El Agua En Iberoamérica: De La Limnología a La Gestión En Sudamérica* (A. Fernández-Cirelli & G. Chalar, editors). CYTED XVII y CETA.
- Kruk, C. & Segura, A.M. (2012) The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia*, **698**, 191–202.
- Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G. & Reynolds, C. (2002) Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of plankton Research*, **24**, 901–912.
- Kruk, C., Brugnoli, E. & Vidal, L. (2003) Informes por muestreo de planta de Uruguay y laguna del Sauce de agosto 2002 a agosto 2003. *Sección Limnología*, Facultad de Ciencias-UdelaR, Montevideo.
- Kruk, C., Huszar, V.L.M., Peeters, E.T.H.M., Bonilla, S., Costa, L., Lürling, M., Reynolds, C.S. & Scheffer, M. (2010) A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, **55**, 614–627.
- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez de la Escalera Siri, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M. & Cea, J. (2015) Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. *INNOTEC*, 23–39.
- Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., Martínez de la Escalera, G., Carballo, C., Cabrera, C., Sarthou, F., Scavone, P. & Piccini, C. (2017) A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean. *Harmful Algae*, **70**, 23–36.
- Kruk, C., Martínez, A., Martínez de la Escalera, G., Trinchin, R., Manta, G., Segura, Á.M., Piccini, C., Brena, B., Fabiano, G. & Pérez, M. (2019) Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. *Innotec*, 36–68.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. & Fitzgerald, J. (1999) Human health aspects. Pp. 115–153 in: *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (C.I. and B.J. [Eds], editor). E&FN Spon, London.
- Kuniyoshi, T.M., Sevilla, E., Bes, M.T., Fillat, M.F. & Peleato, M.L. (2013) Phosphate deficiency (N/P 40: 1) induces *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Plant physiology and biochemistry*, **65**, 120–124.

- Kurmayer, R. & Kutzenberger, T. (2003) Application of Real-Time PCR for Quantification of Microcystin Genotypes in a Population of the Toxic Cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 6723–6730.
- Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J. & Chorus, I. (2002) Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology*, **43**, 107–118.
- Kurmayer, R., Christiansen, G. & Chorus, I. (2003) The Abundance of Microcystin-Producing Genotypes Correlates Positively with Colony Size in *Microcystis* sp. and Determines Its Microcystin Net Production in Lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 787–795.
- Lampert, W. & Sommer, U. (2007) *Limnoecology*. P. in.: Oxford University Press, New York.
- Le Rudulier, D., Strom, A.R., Dandekar, A., Smith, L. & Valentine, R. (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science*, **224**, 1064–1068.
- Lehman, P.W., Boyer, G., Satchwell, M. & Waller, S. (2008) The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. *Hydrobiologia*, **600**, 187–204.
- Lei, L., Li, C., Peng, L. & Han, B.-P. (2015) Competition between toxic and non-toxic *Microcystis aeruginosa* and its ecological implication. *Ecotoxicology*, **24**, 1411–1418.
- Lepillanica, F., Martínez de la Escalera, G., Bordet, F., O'Farrell, I. & Piccini, C. (2018) Detección de poblaciones tóxicas de *Microcystis* spp. con distintas preferencias ambientales. Estudio de caso. *Innotec*, 08–16.
- Lezcano, M., Agha, R., Cirés, S. & Quesada, A. (2019) Spatial-temporal survey of *Microcystis* oligopeptide chemotypes in reservoirs with dissimilar waterbody features and their relation to genetic variation. *Harmful algae*, **81**, 77–85.
- Li, B.-S., Wang, X.-Y., Ma, F.-L., Jiang, B., Song, X.-X. & Xu, A.-G. (2011) Is High Resolution Melting Analysis (HRMA) Accurate for Detection of Human Disease-Associated Mutations? A Meta Analysis. *PLoS ONE*, **6**, e28078.
- Li, Y., Chen, J., Zhao, Q., Pu, C., Qiu, Z., Zhang, R. & Shu, W. (2011b) A cross-sectional investigation of chronic exposure to microcystin in relationship to childhood liver damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. *Environmental health perspectives*, **119**, 1483–1488.
- Liaw, A. & Wiener, M. (2002) Classification and regression by randomForest. *R news*, **2**, 18–22.
- Libbrecht, M.W. & Noble, W.S. (2015) Machine learning applications in genetics and genomics. *Nature Reviews Genetics*, **16**, 321–332.
- Liermann, C.R., Nilsson, C., Robertson, J. & Ng, R.Y. (2012) Implications of dam obstruction for global freshwater fish diversity. *BioScience*, **62**, 539–548.
- Litchman, E. & Klausmeier, C.A. (2008) Trait-Based Community Ecology of Phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **39**, 615–639.
- Liu, L., Huang, Q. & Qin, B. (2018) Characteristics and roles of *Microcystis* extracellular polymeric substances

- (EPS) in cyanobacterial blooms: a short review. *Journal of freshwater ecology*, **33**, 183–193.
- Liu, Y. (2006) Effects of salinity on the growth and toxin production of a harmful algal species, *Microcystis aeruginosa*. *JUS SJWP*, **1**, 91–111.
- Ma, J., Qin, B., Paerl, H.W., Brookes, J.D., Hall, N.S., Shi, K., Zhou, Y., Guo, J., Li, Z. & Xu, H. (2016) The persistence of cyanobacterial (*Microcystis* spp.) blooms throughout winter in Lake Taihu, China. *Limnology and Oceanography*, **61**, 711–722.
- Malmstrom, R.R., Straza, T.R.A., Cottrell, M.T. & Kirchman, D.L. (2007) Diversity, abundance, and biomass production of bacterial groups in the western Arctic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, **47**, 45–55.
- Malone, J.H. & Oliver, B. (2011) Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC biology*, **9**, 34.
- 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. *Molecular Ecology*, **23**, 5791–5802.
- Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I. & Piccini, C. (2017) Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful Algae*, **62**, 73–83.
- Martín-Luna, B., Bes, M., Peleato, M., Sevilla, E. & Fillat, M. (2015) Variation in the synthesis of microcystin in response to saline and osmotic stress in *Microcystis ruginosa* PCC7806. *Limnetica*, **34**, 205–214.
- Martiny, A.C., Tai, A.P.K., Veneziano, D., Primeau, F. & Chisholm, S.W. (2009) Taxonomic resolution, ecotypes and the biogeography of *Prochlorococcus*. *Environmental Microbiology*, **11**, 823–832.
- Mayr, E. (1982) The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance. P. in.: *Harvard University Press*.
- Mazzeo, N., Clemente, J., García-Rodríguez, F., Gorga, J., Kruk, C., Larrea, D., Meerhoff, M., Quintans, F., Rodríguez-Gallego, L. & Scasso, F. (2002) Eutrofización: causas, consecuencias y manejo. Pp. 39–56 in: *Perfil Ambiental Del Uruguay* (A. Domínguez & R. Prieto, editors). Nordan-Comunidad, Montevideo.
- Melero-Jiménez, I.J., Martín-Clemente, E., García-Sánchez, M.J., Flores-Moya, A. & Bañares-España, E. (2019) Adaptation of the toxic freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to salinity is achieved by the selection of spontaneous mutants. *Phycological Research*, **67**, 192–201.
- Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O.M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T.M., Rudi, K. & Jakobsen, K.S. (2003) Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal of Bacteriology*, **185**, 2774–2785.
- Moore, L., Rocap, G., Chisholm, S.W. (1998) Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*, **393**, 464–467.
- Moreira, C., Martins, A., Azevedo, J., Freitas, M., Regueiras, A., Vale, M., Antunes, A. & Vasconcelos, V. (2011) Application of real-time PCR in the assessment of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* abundance and toxicological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **92**, 189–197.

- Mowe, M.A.D., Porojan, C., Abbas, F., Mitrovic, S.M., Lim, R.P., Furey, A. & Yeo, D.C.J. (2015) Rising temperatures may increase growth rates and microcystin production in tropical *Microcystis* species. *Harmful Algae*, **50**, 88–98.
- Nasr, H.S., Zaher, S.S. & El-Awamri, A. (2012) Factors possibly affecting growth of *Microcystis aeruginosa* and *M. flos aquae* isolated from Wadi El-Rayian Upper Lake (Egypt) under laboratory conditions. *Egypt J. Aquat. Biol. Fish*, **16**, 35–46.
- Neilan, B.A., Jacobs, D. & Goodman, A.E. (1995) Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3875–3883.
- Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C. & Dittmann, E. (2013) Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental microbiology*, **15**, 1239–1253.
- Nerini, D. & Ghattas, B. (2007) Classifying densities using functional regression trees: Applications in oceanology. *Computational Statistics & Data Analysis*, **51**, 4984–4993.
- Ngwa, F.F., Madramootoo, C.A. & Jabaji, S. (2014) Comparison of cyanobacterial microcystin synthetase (*mcyE*) gene transcript levels, *mcyE* gene copies, and biomass as indicators of microcystin risk under laboratory and field conditions. *MicrobiologyOpen*, **3**, 411–425.
- O'Farrell, I., Bordet, F. & Chaparro, G. (2012) Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies. *Hydrobiologia*, **698**, 175–190.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H. & Wagner, H. (2009) vegan: Community Ecology package. P. in.: *R-software*.
- Oliver, R. & Ganf, G. (2000) Freshwater blooms. P. in: *The Ecology of Cyanobacteria* (B. Whitton & M. Potts, editors). Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A. & Gobler, C.J. (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, **14**, 313–334.
- Orr, P.T. & Jones, G.J. (1998) Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and oceanography*, **43**, 1604–1614.
- Orr, P.T., Jones, G.J. & Douglas, G.B. (2004) Response of cultured *Microcystis aeruginosa* from the Swan River, Australia, to elevated salt concentration and consequences for bloom and toxin management in estuaries. *Marine and Freshwater Research*, **55**, 277.
- OSE. (2009) Informe del comportamiento de las cianobacterias en el agua bruta de Fray Bentos. OSE, Montevideo.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (1998) 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters*, **164**, 119–124.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (1999) Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*, **47**, 189–197.

- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (2001) A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 873–879.
- Paerl, H. (2014) Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. *Life*, **4**, 988–1012.
- Paerl, H.W. & Huisman, J. (2008) Blooms Like It Hot. *Science*, **320**, 57–58.
- Paerl, H.W. & Otten, T.G. (2013) Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, **65**, 995–1010.
- Paerl, H.W. & Paul, V.J. (2012) Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, **46**, 1349–1363.
- Pearson, L.A. & Neilan, B.A. (2008) The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**, 281–288.
- Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E. & Neilan, B.A. (2004) Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6370–6378.
- Pérez, M., Bonilla, S., De León, L., Smarda, J. & Komárek, J. (1999) A bloom of *Nodularia* baltica-spumigena group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. *Algological Studies*, **93**, 91–101.
- Pérez-Carrascal, O.M., Terrat, Y., Giani, A., Fortin, N., Greer, C.W., Tromas, N. & Shapiro, B.J. (2019) Coherence of *Microcystis* species revealed through population genomics. *The ISME Journal*.
- Petherick, A. (2010) Science panel gives hope in river-pollution dispute. *Nature*, **466**, 911–911.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, 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*, **10**, 644–653.
- Pinckney, J.L., Millie, D.F., Vinyard, B.T. & Paerl, H.W. (1997) Environmental controls of phytoplankton bloom dynamics in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**, 2491–2501.
- Pineda-Mendoza, R.M., Zúñiga, G. & Martínez-Jerónimo, F. (2016) Microcystin production in *Microcystis aeruginosa*: effect of type of strain, environmental factors, nutrient concentrations, and N: P ratio on *mcyA* gene expression. *Aquatic ecology*, **50**, 103–119.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S. & Sarkar, D. (2014) R Core Team (2014) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117. Available at <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Pobel, D., Godon, J.-J., Humbert, J.-F. & Robin, J. (2012) High-frequency monitoring of the genetic diversity and the potential toxicity of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a French shallow lake. *FEMS Microbiology Ecology*, **79**, 132–141.

- Pohlert, T. (2014) The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). *R package*, 2004–2006.
- Prinsloo, J. & Pieterse, A. (1994) Preliminary observations on the effect of increased concentrations of total dissolved salts on growth and photosynthetic rates in different algal species. *Water SA*, **20**, 219–222.
- Puddick, J., Prinsep, M., Wood, S., Kaufononga, S., Cary, S. & Hamilton, D. (2014) High Levels of Structural Diversity Observed in Microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and Characterization of Six New Microcystin Congeners. *Marine Drugs*, **12**, 5372–5395.
- Quirós, R. & Lucchini, L. (1982) Características limnológicas del Embalse de Salto Grande, III: Fitoplancton y su relación con parámetros ambientales. *Revista Asociación Ciencias Naturales Litoral*, **13**, 49–66.
- R Core Team. (2013) *R: a language and environment for statistical computing*. P. in.: Vienna: R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria.
- Ramsay, J.O., Wickham, H., Graves, S. & Hooker, G. (2014) fda: Functional data analysis. *R package version*, **2**, 142.
- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T. & Sivonen, K. (2004) Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 568–573.
- Renaud, S.L., Pick, F.R. & Fortin, N. (2011) Effect of light intensity on the relative dominance of toxigenic and nontoxigenic strains of *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 7016–7022.
- Reynolds, C., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L. & Melo, S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, **24**, 417–428.
- Reynolds, C.S. (1984) *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. P. in.: Cambridge University Press, Cambridge, 390 pp.
- Reynolds, C.S. (2006) *The ecology of phytoplankton*. P. in.: Cambridge University Press.
- Reynolds, C.S., Jaworski, G.H.M., Cmiech, H.A. & Leedale, G.F. (1981) On the Annual Cycle of the Blue-Green Alga *Microcystis Aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **293**, 419–477.
- Rinta-Kanto, J.M. & Wilhelm, S.W. (2006) Diversity of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Spatially Isolated Regions of Lake Erie. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 5083–5085.
- Rinta-Kanto, J.M., Konopko, E.A., DeBruyn, J.M., Bourbonniere, R.A., Boyer, G.L. & Wilhelm, S.W. (2009) Lake Erie *Microcystis*: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae*, **8**, 665–673.
- Robarts, R.D. & Zohary, T. (1987) Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **21**, 391–399.
- Roberts, M.F. (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems*, **1**, 5.

- Roberts, T. (2001) On the river of no returns: Thailand's Pak Mun Dam and its fish ladder. *Natural History Bulletin of the Siam Society*, **49**, 189–230.
- Robson, B.J. & Hamilton, D.P. (2003) Summer flow event induces a cyanobacterial bloom in a seasonal Western Australian estuary. *Marine and Freshwater Research*, **54**, 139–151.
- Rodriguez-Gallego, L., Conde, D., Achkar, M. & Arocena, R. (2007) Uso del suelo en las cuencas de las lagunas costeras de Uruguay. *Boletín Vida Silvestre*, **71**, 4–5.
- Ross, C., Warhurst, B.C., Brown, A., Huff, C. & Ochrietor, J.D. (2019) Mesohaline conditions represent the threshold for oxidative stress, cell death and toxin release in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic toxicology*, **206**, 203–211.
- Rouco, M., López-Rodas, V., Flores-Moya, A. & Costas, E. (2011) Evolutionary changes in growth rate and toxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under a scenario of eutrophication and temperature increase. *Microbial ecology*, **62**, 265–273.
- Sabart, M., Pobel, D., Latour, D., Robin, J., Salençon, M. & Humbert, J. (2009) Spatiotemporal changes in the genetic diversity in French bloom-forming populations of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports*, **1**, 263–272.
- Saison, C., Perreault, F., Daigle, J.-C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M. & Popovic, R. (2010) Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic toxicology*, **96**, 109–114.
- Saker, M., Moreira, C., Martins, J., Neilan, B., Vasconcelos, V.M. (2009) DNA profiling of complex bacterial populations: toxic cyanobacterial blooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**, 237–252.
- Sandgren, C.D. (ed.). (1988) Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. P. in.: *Cambridge University Press*, Cambridge, 442 pp.
- Sandrini, G., Huisman, J. & Matthijs, H.C. (2015) Potassium sensitivity differs among strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis* and correlates with the presence of salt tolerance genes. *FEMS microbiology letters*, **362**, fnv121.
- Scasso, F., Mazzeo, N., Gorga, J., Kruk, C., Lacerot, G., Clemente, J. & Bonilla, S. (2001) Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its resoration: two years of a whole-lake experiment. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **11**, 31–44.
- Schatz, D., Keren, Y., Hadas, O., Carmeli, S., Sukenik, A. & Kaplan, A. (2005) Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains: Toxic and non-toxic subcultures of *Microcystis*. *Environmental Microbiology*, **7**, 798–805.
- Scherer, P.I., Raeder, U., Geist, J. & Zwirgmaier, K. (2017) Influence of temperature, mixing, and addition of microcystin-LR on microcystin gene expression in *Microcystis aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, **6**, e00393.
- Schopf, J. & Walter, M. (1982) Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence [Algae]. *Botanical Monographs (USA)*.
- Schopf, J.W. (2012) The Fossil Record of Cyanobacteria. Pp. 15–36 in: *Ecology of Cyanobacteria II* (B.A.

Whitton, editor). Springer Netherlands, Dordrecht.

- Sedan, D., Laguens, M., Copparoni, G., Aranda, J.O., Giannuzzi, L., Marra, C.A. & Andrinolo, D. (2015) Hepatic and intestine alterations in mice after prolonged exposure to low oral doses of Microcystin-LR. *Toxicon*, **104**, 26–33.
- Segura, A.M., Piccini, C., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D. & Kruk, C. (2017) Increased sampled volume improves *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) colonies detection and prediction using Random Forests. *Ecological Indicators*, **79**, 347–354.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F. & Peleato, M.L. (2008) Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: Iron starvation triggers microcystin synthesis. *Environmental Microbiology*, **10**, 2476–2483.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Bes, M.T., Fillat, M.F. & Peleato, M.L. (2012) An active photosynthetic electron transfer chain required for *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology*, **21**, 811–819.
- Shapiro, B.J. & Polz, M.F. (2014) Ordering microbial diversity into ecologically and genetically cohesive units. *Trends in Microbiology*, **22**, 235–247.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 3797–3805.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999) Cyanobacterial toxins. Pp. 41–111 in: *Toxic Cyanobacteria in Water; A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (I. & B. Chorus J., editor). Chapman & Hall, London.
- Sivonen, K., Carmichael, W., Namikoshi, M., Rinehart, K., Dahlem, A. & Niemelä, S. (1990) Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2650–2657.
- Sohm, J.A., Ahlgren, N.A., Thomson, Z.J., Williams, C., Moffett, J.W., Saito, M.A., Webb, E.A. & Rocop, G. (2016) Co-occurring *Synechococcus* ecotypes occupy four major oceanic regimes defined by temperature, macronutrients and iron. *The ISME Journal*, **10**, 333–345.
- Song, G., Jiang, Y., Yu, G. & Li, R. (2015) Genotypes of ITS region of rRNA in *Microcystis* (Cyanobacteria) populations in Erhai Lake (China) and their correlation with eutrophication level. *Journal of basic microbiology*, **55**, 1203–1211.
- Stackebrandt, E. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, **33**, 152–155.
- Su, Z., Olman, V., Mao, F. & Xu, Y. (2005) Comparative genomics analysis of NtcA regulons in cyanobacteria: regulation of nitrogen assimilation and its coupling to photosynthesis. *Nucleic acids research*, **33**, 5156–5171.
- Sudhir, P. & Murthy, S.D.S. (2004) Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, **42**, 481–486.

- Takamura, N., Yasuno, M. & Sugahara, K. (1984) Overwintering of *Microcystis aeruginosa* Kütz. in a shallow lake. *Journal of Plankton Research*, **6**, 1019–1029.
- 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**, 633–641.
- Tanabe, Y., Sano, T., Kasai, F. & Watanabe, M.M. (2009) Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 115.
- Tanabe, Y., Hodoki, Y., Sano, T., Tada, K. & Watanabe, M.M. (2018) Adaptation of the Freshwater Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Brackish Water Is Driven by Recent Horizontal Transfer of Sucrose Genes. *Frontiers in Microbiology*, **9**.
- Tanigawa, R., Shirokane, M., Maeda, S., Omata, T., Tanaka, K. & Takahashi, H. (2002) Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 4251–4255.
- Te, S.H. & Gin, K.Y.-H. (2011) The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore. *Harmful Algae*, **10**, 319–329.
- Therneau, T., Atkinson, B., Ripley, B. & Ripley, M.B. (2015) Package 'rpart.'
- 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**, e45252.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T. & Neilan, B.A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, **7**, 753–764.
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M. & Ohno, T. (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 5442–5447.
- Tong, S.Y.C. & Giffard, P.M. (2012) Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 3418–3421.
- Tonk, L., Bosch, K., Visser, P.M. & Huisman, J. (2007) Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology*, **46**, 117.
- Trewin, B. (2014) The climates of the tropics and how they are changing. *State Trop*, 39–51.
- Tromas, N., Taranu, Z.E., Martin, B.D., Willis, A., Fortin, N., Greer, C.W. & Shapiro, B.J. (2018) Niche Separation Increases With Genetic Distance Among Bloom-Forming Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, **9**.
- Usher, K.M., Bergman, B. & Raven, J.A. (2007) Exploring cyanobacterial mutualisms. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **38**, 255–273.
- Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Mokolke, L. & Sivonen, K. (2003) Quantitative Real-Time PCR for Determination of Microcystin Synthetase E Copy Numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in Lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 7289–7297.

- Van de Waal, D.B., Verspagen, J.M., Finke, J.F., Vournazou, V., Immers, A.K., Kardinaal, W.E.A., Tonk, L., Becker, S., Van Donk, E. & Visser, P.M. (2011) Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO₂. *The ISME journal*, **5**, 1438–1450.
- Vázquez-Bermúdez, M.F., Herrero, A. & Flores, E. (2002) 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus* glnA promoter. *FEBS letters*, **512**, 71–74.
- Veall, M.R. & Zimmermann, K.F. (1996) Pseudo-R² measures for some common limited dependent variable models. *Journal of Economic surveys*, **10**, 241–259.
- Verspagen, J.M., Passarge, J., Jöhnk, K.D., Visser, P.M., Peperzak, L., Boers, P., Laanbroek, H.J. & Huisman, J. (2006) Water management strategies against toxic *Microcystis* blooms in the Dutch delta. *Ecological applications*, **16**, 313–327.
- Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J. & Sivonen, K. (2002) Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial ecology*, **43**, 443–454.
- Via-Ordorika, L., Fastner, J., Kurmayer, R., Hisbergues, M., Dittmann, E., Komarek, J., et al. (2004) Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of micro-cystins and microcystin genes in individual colonies. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 592–602.
- Vidal, L. (2002) Variación temporal de la morfología de *Microcystis aeruginosa* Kützing (Cyanophyceae) en el Embalse de Salto Grande (Uruguay - Argentina). Pasantía de Grado, Universidad de la Republica- Facultad de Ciencias, Instituto de Biología - Departamento de Ecología- Sección Limnología, 39 pp.
- Vidal, L. & Britos, A. (2012) URUGUAY: Occurrence, Toxicity and Regulation of Cyanobacteria. *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*, 130.
- Vidal, L. & Kruk, C. (2008) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34–53°S: Taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, **3**, 142–151.
- Visser, P., Ibelings, B., Van Der Veer, B., Koedood, J. & Mur, R. (1996) Artificial mixing prevents nuisance blooms of the cyanobacterium *Microcystis* in Lake Nieuwe Meer, the Netherlands. *Freshwater Biology*, **36**, 435–450.
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A. & Liermann, C.R. (2010) Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, **467**, 555.
- Walls, J.T., Wyatt, K.H., Doll, J.C., Rubenstein, E.M. & Rober, A.R. (2018) Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. *Science of the Total Environment*, **610**, 786–795.
- Wang, X., Sun, M., Wang, J., Yang, L., Luo, L., Li, P. & Kong, F. (2012) *Microcystis* Genotype Succession and Related Environmental Factors in Lake Taihu during Cyanobacterial Blooms. *Microbial Ecology*, **64**, 986–999.

- Wang, X., Sun, M., Xie, M., Liu, M., Luo, L., Li, P., Kong, F. (2013). Differences in microcystin production and genotype composition among *Microcystis* colonies of different sizes in Lake Taihu. *Water Res.* **47**, 5659–5669.
- Wangwibulkit, S., Limsuwan, C. & Chuchird, N. (2008) Effects of salinity and pH on the growth of blue-green algae, *Oscillatoria* sp. and *Microcystis* sp., isolated from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ponds. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, **32**, 1–9.
- Ward, D.M., Ferris, M.J., Nold, S.C., Bateson, M.M., Kopczynski, E.D. & Ruff-Roberts, A.L. (1994) Species diversity in hot spring microbial mats as revealed by both molecular and enrichment culture approaches - relationship between biodiversity and community structure. Pp. 33–44 in: *Microbial Mats. Structure, Development and Environmental Significance* (L.J. Stal & P. Caumette, editors). Springer-Verlag, Berlin.
- Watanabe, M. (1996) Isolation, cultivation and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan. *Toxic Microcystis*, **2**, 13–34.
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.-R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L.T., Donnenberg, M.S. & Blattner, F.R. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 17020–17024.
- Welker, M., Sejnohova, L., Nemethova, D., von Dohren, H., Jarkovsky, J. & Marsalek, B. (2007) Seasonal shifts in chemotype composition of *Microcystis* sp. communities in the pelagial and the sediment of a shallow reservoir. *Limnology and Oceanography*, **52**, 609–619.
- Whitton, B. & Potts, M. (2000) The ecology of cyanobacteria. P. in.: *1st edition. Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 669 pp.
- Whitton, B.A. (2012) Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. P. in.: *Springer Science & Business Media*.
- Wittwer, C.T. (2003) High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry*, **49**, 853–860.
- World Health Organization. (2004) Guidelines for Drinking-water Quality. Volume 1. Recommendations. *WHO Publishing*, Geneva.
- Worm, J. & Søndergaard, M. (1998) Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquatic Microbial Ecology*, **14**, 19–28.
- Wuertz, D., Setz, T., Chalabi, Y., Maechler, M. & Setz, M.T. (2017) Package 'fBasics.' *Rmetrics-Markets and Basic Statistics. R Foundation for Statistical Computing*.
- Xu, Y., Wang, G., Yang, W. & Li, R. (2010) Dynamics of the water bloom-forming *Microcystis* and its relationship with physicochemical factors in Lake Xuanwu (China). *Environmental Science and Pollution Research*, **17**, 1581–1590.
- Yang, Z., Kong, F., Shi, X. & Cao, H. (2006) Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. *Hydrobiologia*, **563**, 225–230.

- Yoshida, M., Yoshida, T., Takashima, Y., Hosoda, N. & Hiroishi, S. (2007) Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiology Letters*, **266**, 49–53.
- You, J., Mallery, K., Hong, J. & Hondzo, M. (2018) Temperature effects on growth and buoyancy of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research*, **40**, 16–28.
- Zeyoudi, M., Altenajji, 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.
- Zhang, T., Gong, H., Wen, X. & Lu, C. (2010) Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 951–958.
- Zhou, J., Bruns, M.A. & Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 316–22.
- 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. *PLoS ONE*, **6**, e17615.

APÉNDICES

Apéndice 1

1.1. Metodologías específicas

1.1.1. Extracción de ADN

- Protocolo usado en el Capítulo 1 y 2

Soluciones:

Buffer de extracción

100 mM Tris-HCl (pH 8)

100 mM EDTA (pH 8)

100 mM Na-Fosfato (pH 8)

(93,2 ml Na_2HPO_4 1 M + 6,8 ml NaH_2PO_4 1 M)

1,5 M NaCl

1 % CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), precipita en frío.

Autoclavar 15 min a 1 atm y guardar a temperatura ambiente.

Procedimiento:

- 1) En un falcon estéril adicionar 17,5 ml de buffer de extracción a la muestra (aprox. 10×10^{11} células).
- 2) Agregar 67,5 ul de proteinasa K 10 mg/ml.
- 3) Incubar a 37°C por 30 min en agitación.
- 4) Adicionar 1,9 ml de SDS 20%.
- 5) Incubar a 65°C por 2 hs en agitación.
- 6) Centrifugar a 6000 xg por 10 min a temperatura ambiente.
- 7) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo estéril (registrar el volumen).
- 8) Agregar el mismo volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1).
- 9) Mezclar suavemente invirtiendo el tubo y centrifugar a 10000 xg por 10 min.
- 10) Colectar la fase acuosa (fase de arriba donde se encuentra el ADN) y transferirla a un tubo nuevo estéril.
- 11) Repetir el agregado de cloroformo:isoamilalcohol (pasos: 8, 9 y 10) tres veces.

- 12) Colectar la fase acuosa y precipitar el ADN agregándole 0,6 vol. de isopropanol frío.
- 13) Mezclar moderadamente.
- 14) Incubar a temperatura ambiente por 1h.
- 15) Centrifugar a 50000 xg a temperatura ambiente por 30 min.
- 16) Descartar el sobrenadante cuidadosamente.
- 17) Lavar el *pellet* con 10 ml de etanol 70% (v/v) frío (guardado a -20°C previamente).
- 18) Centrifugar a 20000 xg a temperatura ambiente por 15 min.
- 19) Descartar el sobrenadante cuidadosamente.
- 20) Dejar secar el *pellet* a temperatura ambiente por 15 min (puede llevar hasta 40 min).
- 21) Resuspender el *pellet* en 200 ul de H₂O estéril ultrapura y dejarlo toda la noche a 4°C.
- 22) Al día siguiente incubar a 37°C por 30 min en agitación suave.
- 23) Transferir el ADN a un tubo de 1,5 ml estéril.
- 24) Guardar el ADN a -20°C.

– Protocolo usado en el Capítulo 3 y 4

Soluciones:

Buffer de extracción

100 mM Tris-HCl (pH 8)

100 mM EDTA (pH 8)

100 mM Na-Fosfato (pH 8)

(93,2 ml Na₂HPO₄ 1 M + 6,8 ml NaH₂PO₄ 1 M)

1,5 M NaCl

1 % CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), precipita en frío.

Autoclavar 15 min a 1 atm y guardar a temperatura ambiente.

Procedimiento:

- 1) Colocar la muestra en tubos de lisis de 2 ml estériles con las esferas de cerámica de 2mm de diametro y agregar aprox. 800 ul de buffer de extracción.
- 2) Homogeneizar en el equipo FastPrep (MP, Biomédicals) durante 40 s a 6 m/s.
- 3) Centrifugar a 5000 xg por 2 min.
- 4) Transferir el sobrenadante a tubo de 2 ml estéril (registrar el volumen).
- 5) Agregar el mismo volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1).
- 6) Mezclar suavemente invirtiendo el tubo y centrifugar a 12000 xg por 10 min.
- 7) Colectar la fase acuosa (fase de arriba donde se encuentra el ADN) y transferirla a

- un tubo nuevo estéril.
- 8) Repetir el agregado de cloroformo:isoamilalcohol (pasos: 8, 9 y 10) tres veces.
 - 9) Colectar la fase acuosa y precipitar el ADN agregándole 0,6 vol. de isopropanol frío.
 - 10) Mezclar moderadamente.
 - 11) Incubar a temperatura ambiente por 1h.
 - 12) Centrifugar a 12000 xg a temperatura ambiente por 45 min.
 - 13) Descartar el sobrenadante cuidadosamente.
 - 14) Lavar el *pellet* con 200 ul de etanol 70% (v/v) frío (guardado a -20°C previamente).
 - 15) Centrifugar a 12000 xg a temperatura ambiente por 45 min.
 - 16) Descartar el sobrenadante cuidadosamente.
 - 17) Dejar secar el *pellet* a temperatura ambiente por 15 min (puede llevar hasta 40 min).
 - 18) Resuspender el *pellet* en 200 ul de H₂O estéril ultra-pura y dejarlo toda la noche a 4°C.
 - 19) Al día siguiente incubar a 37°C por 30 min en agitación suave.
 - 20) Guardar el ADN a -20°C.

1.1.2. Clonado de genes *target*

Genes *target* de la tesis: *mcyB*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyJ*, *mcyH* y espaciador intergénico de ficocianina PC-IGS.

- Generación de células competentes

- 1) Inocular caldo LB (50 ml) con una colonia de *E. coli* (TOP10) e incubar en agitación a 37 °C hasta que alcance una OD₆₀₀=0,4 (aprox 3 h).
- 2) Centrifugar a 6000xg por 8 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender cuidadosamente el *pellet* en 25 ml de CaCl₂ (50 mM) frío.
- 4) Centrifugar a 6000xg por 8 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 5) Resuspender (cuidadosamente) el *pellet* en 20 ml de CaCl₂ (50 mM) frío.
- 6) Incubar 30 min en hielo.
- 7) Centrifugar a 6000xg por 8 minutos a 4°C y resuspender el *pellet* en 2 ml de CaCl₂ (50 mM) frío.
- 8) Congelar a -80°C con 10% de glicerol en alícuotas de 200 µl.

- Ligación del plásmido y el gen *target*

- 1) Amplificar el fragmento *target*, corroborar su correcta amplificación por electroforesis en gel de agarosa 1% y extraer banda del gel (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN).

- 2) Realizar la ligación con el plásmido de acuerdo con las instrucciones del kit de clonado (TOPO® TA Cloning® Kit).

- Transformación

- 1) Mezclar 200 µl de células competentes con 8-10 µl de plásmido ligado.
- 2) Dejar la mezcla en hielo 30 a 40 min.
- 3) Realizar un proceso de *shock* térmico a 42 °C por 1 min.
- 4) Colocar el hielo 1 min.
- 5) Agregar 1 ml de LB e incubar 1:30 h a 37 °C con agitación suave.
- 6) Sembrar en superficie sobre placa de LA/Amp/IPTG/X-Gal.
- 7) Realizar controles de viabilidad (LA solo) y control de transformación con plásmido PUC19 (LA/Amp).
- 8) Incubar a 37°C por 24 h y seleccionar la colonias blancas.

- Confirmación

- 1) Realizar PCR directo de las colonias blancas con *primers* dirigidos a la región M13
- 2) Repicar las colonias positivas y congelar a -80 °C.
- 3) Extraer el plásmido y enviar a secuenciar.

1.1.3. Extracción de plásmido

Soluciones:

Solución 1

- 50 mM glucosa
- 25 mM Tris-HCl (pH 8)
- 10 mM EDTA (pH 8)

Preparar en recipientes de aproximadamente 100 ml y autoclavar por 15 min a 1 atm.
Guardar a 4°C.

Solución 2

- 0,2 N NaOH
- 1 % SDS

Solución 3

- 60 ml acetato de potasio 5 M
- 11,5 ml ácido acético glacial
- 28,5 ml de H₂O

Procedimiento:

- 1) Centrifugar 2 ml de un cultivo líquido de la cepa de interés (LB/Amp), 5 min a 12.000 xg.
- 2) Remover el sobrenadante por aspiración y resuspender el pellet en 100 µl de Solución 1 + 1 µl de RNAsa (10 mg/ml). Vortexear.
- 3) Agregar 200 µl de la Solución 2. Mezclar por inversión 15 veces. Dejar 5 min a temperatura ambiente.
- 4) Agregar 150 µl de la Solución 3. Mezclar por inversión 15 veces. Dejar 5 min a temperatura ambiente.
- 5) Centrifugar a 12.000 xg por 5 min
- 6) Transferir 400 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 800 µl de etanol 100%. Mezclar por inversión.
- 7) Centrifugar a 12.000 xg por 5 min. Remover el sobrenadante con pipeta.
- 8) Lavar el pellet con 500 µl de etanol 75%. Centrifugar brevemente. Retirar el sobrenadante con pipeta.
- 9) Dejar secar bien y resuspender en 50 µl de H₂O ultrapura. Incubar 30 min a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

1.1.4. Métodos de *fingerprinting*: DGGE

Soluciones:

Solución stock de acrilamida 40%

Se prepararon 100ml conteniendo:

38,93g de acrilamida

1,07g de bisacrilamida

Disolver la acrilamida en 30ml de agua miliQ, lentamente y empleando agitación se agrega la bisacrilamida, completar el volumen con agua miliQ. Por último filtrar la solución por una membrana Millipore de 0,45 µm de tamaño de poro.

Buffer TAE 50X

Preparar 250ml conteniendo:

60,5g de Tris Base

14,28ml de ácido acético glacial

20ml de solución EDTA 0,5M a pH 8

Disolver el Tris base en agitación con 150ml de agua miliQ, luego agregar el ácido acético glacial y luego el EDTA. Completar el volumen con agua miliQ y llevar a un pH final de 9.

Solución acrilamida 6%

Preparar 100ml conteniendo:

15ml de acrilamida 40%

2ml de TAE 50X

Completar un volumen de 100ml con agua miliQ y filtrar la solución en membrana Millipore 0.45µm.

APS 10%

0,1g de persulfato de amonio se diluyo en 1ml de agua miliQ.

Solución 0% desnaturalizante (6% acrilamida)

Preparar 100ml utilizando:

15 ml de acrilamida 40%

2ml de buffer TAE 50X

Completar el volumen con agua miliQ y filtrar en membrana Millipore 0.45µm de tamaño de poro.

Solución 70% desnaturalizante (6% acrilamida)

Preparar 100ml utilizando:

15 ml de acrilamida 40%

2ml de buffer TAE 50X

28ml de formamida

29,4g de urea

Completar el volumen con agua miliQ y filtrar en membrana Millipore 0.45µm de tamaño de poro.

Solución 40% desnaturalizante (6% acrilamida)

Preparar 9 ml utilizando:

5,1ml de solución 0% desnaturalizante

3,9 de solución 70% desnaturalizante.

Colorante

Preparar 10ml conteniendo:

0,05g de azul de bromofenol

0.05g xilencianol

Diluir en 10ml de Buffer TAE 1X

SYBR green

Preparar 20ml utilizando:

2µl de SYBR green 10000X

20ml de buffer TAE 1X

Protocolo:

Armado del soporte para el gel

- 1) Limpiar bien los vidrios: primero con agua y detergente neutro, luego agua MQ y alcohol. Asegurar que no queden pelusas.
- 2) Colocar la goma amarilla en los bordes del vidrio mas grande. Asegurarnos que la goma queda completamente pegada a los bordes (sin aire) y que los cortes de la goma queden bien en los extremos del vidrio. Dicha goma tiene un borde mas grueso. Este debe quedar hacia la cara interna del soporte.
- 3) Pasarle silicona en gel a los separadores (cuidar de no colocar demasiada silicona ya que puede interferir en la corrida). Posteriormente colocarlos pegados a lo largo de las gomas amarillas. Asegurarnos que queden bien pegadas pero que no queden por dentro de la goma.
- 4) Colocar el vidrio con la hendidura presionando sobre los costados y luego colocar las pinzas de etiqueta azul (son las que presionan con mas fuerza). Para asegurar que queda bien sellado colocar tres pinzas en cada lado.
- 5) Colocar desde un borde agua MQ para asegurarnos que no pierda. Posteriormente retirar el agua y secar con papel Whatman.

Armado del gel

- 1) Para asegurarnos que el gel no se pierda, preparar un gel mas concentrado para la parte inferior (2ml acrilamida 0% desnaturalizante + 30 μ l APS + 14 μ l TEMED). Colocar 1ml desde un borde (el resto queda en el falcon para asegurarnos que solidifica).
NOTA: APS y TEMED solidifican la acrilamida, por lo tanto ponerlos por ultimo, mezclar bien y enseguida verterlo en el soporte.
- 2) Para armar el gradiente se utiliza una solución al 70% y otra al 40% (se prepara calculando a partir de la 70% y completando el volumen restante con la solución 0% desnaturalizante).
Solución al 40%: 9ml Sol 40% + 69 μ l APS + 5,4 μ l TEMED
Solución 70%: 9ml Sol 70% + 69 μ l APS + 5,4 μ l TEMED + 30 μ l de colorante.
- 3) Armar el dispositivo que mezcla las dos soluciones, su conexión a la bomba y luego al soporte. Colocar los mini agitadores en cada tubo del dispositivo. Hacer correr agua MQ colocándola en dichos tubos y la mariposa en un vaso de descarte para asegurarnos que los tubos no están tapados y que las soluciones fluirán correctamente. A partir de este momento el sistema de armado del gel esta listo para usar.
- 4) Colocar las soluciones 40% y 70% en cada tubo del dispositivo con los agitadores

magnéticos en movimiento. La solución 70% va en el tubo de la derecha mientras que la de 40% en el de la izquierda. Este orden debe respetarse ya que la primer solución que fluirá al soporte será la de 70% (es la mas desnaturizante) a partir de la cual se irá formando el gradiente.

- 5) Una vez que están las dos soluciones, abrir al mismo tiempo el pase de las soluciones (dejarlo en posición horizontal), la válvula del tubo y prender la bomba (vel: 6ml/min, en la bomba la perilla en 0). Las soluciones comenzarán a fluir hacia el soporte y el gel comenzará a formarse. No completar totalmente el espacio (dejar aproximadamente los últimos 2cms superiores para el stacking gel y el peine).

OBS.: Fijarse en todo momento que las soluciones fluyen hacia el soporte y que el soporte no pierda. Con el aumento del volumen del gel es común que el soporte comience a perder acrilamida. Apenas termina de fluir el gel cargar los soportes con agua MQ para que fluyan por los tubos y laven todo el sistema (descartar esa agua en un frasco).

- 6) Luego que el gradiente de las soluciones se encuentra en el soporte colocar una capa de butanol saturado en agua. Esto permitirá que el gel polimerice mas rápido.
- 7) Dejar polimerizar por 60 minutos aproximadamente. Tener en cuenta que temperaturas elevadas aceleran el proceso de polimerización.
- 8) Retirar el butanol y enjuagar con agua MQ 3 veces y con mucho cuidado. Secar con papel Whatman.
- 9) Colocar 2ml aprox de una solución de acrilamida 0% desnaturizante con una pipeta (stacking gel). Inmediatamente colocar el peine. A medida que la solución se va solidificando se contrae por lo que hay que ir rellenando el espacio.
- 10) Dejar solidificar por aproximadamente 15 minutos.
- 11) Retirar el peine y lavar con agua MQ.
- 12) Armar el resto del soporte, cambiando las pinzas con etiqueta azul por las blancas. Colocar el vidrio rectangular (chico) en la parte superior y anterior en caso que se corra solo un gel.
- 13) Rellenar el espacios con buffer TBE 0.5X.

Siembra de muestras

- 1) La cantidad de muestra a sembrar estará determinada por la cantidad de ADN amplificado. Para aquellas muestras que presenten una banda bien gruesa y marcada sembrar aprox 10 μ l.
- 2) Colocar la misma cantidad de colorante 2X.
- 3) Sembrar también un marcador de peso molecular (en lo posible en ambos extremos y/o en el medio) para posteriormente poder comparar los geles.

NOTA: Evitar sembrar muestras en los carriles de los extremos.

Corrida del gel

- 1) Colocar como mínimo 23 litros de buffer TAE 0.5X (renovarlos cada 2-3 geles) en el tanque para electroforesis. Llevarlo a una temperatura de 60°C (20 min aprox).
- 2) Colocar el gel.
- 3) Conectarle uno de los recirculadores al extremo superior del soporte.
- 4) Completar completamente con buffer TBE 0.5X la parte superior del soporte.
- 5) Realizar las conexiones de la corriente eléctrica y de la circulación del buffer.
- 6) Dejar correr el gel por aproximadamente 16 horas.

Tinción del gel

- 1) Una vez que transcurrieron las 16 horas apagar el equipo y retirar el soporte con el gel.
- 2) Sacar las pinzas y la goma amarilla.
- 3) Retirar despacio los separadores y al mismo tiempo hacer presión para separar los dos vidrios. El gel quedará adherido a uno de ellos.
- 4) Colocar encima y con mucho cuidado que no queden burbujas una hoja de gel handler. Ir retirándola de a poco y despacio tratando que el gel quede adherido a ella. En caso que queden burbujas tratar de sacarlas lavando con agua MQ. Colocar la hoja con el gel en la bandeja para teñir.
- 5) Preparar el colorante: 20ml de buffer TAE 1X + 2µl de SYBR green. Verter el colorante sobre el gel cuidando que este quede totalmente cubierto.
- 6) Cubrir totalmente la bandeja con papel aluminio (el SYBR es sensible a la luz) y dejar teñiendo durante aproximadamente una hora.
- 7) Cumplido el tiempo retirar el gel y lavar con agua MQ para sacar las burbujas que pudiesen haberse formado.
- 8) Observar sobre luz UV y fotografiar.

Apéndice 2

2.1. Información complementaria

- Capítulo 2

2.1.1. Perfiles de *melting* obtenidos a partir del HRMA de las muestras naturales

En la **Figura 2.1** se muestran todos los perfiles de *melting* normalizados en la región específica de *melting* del amplicon *mcyJ* ($T_m = 75\text{ }^\circ\text{C} - 82\text{ }^\circ\text{C}$) y su derivada.

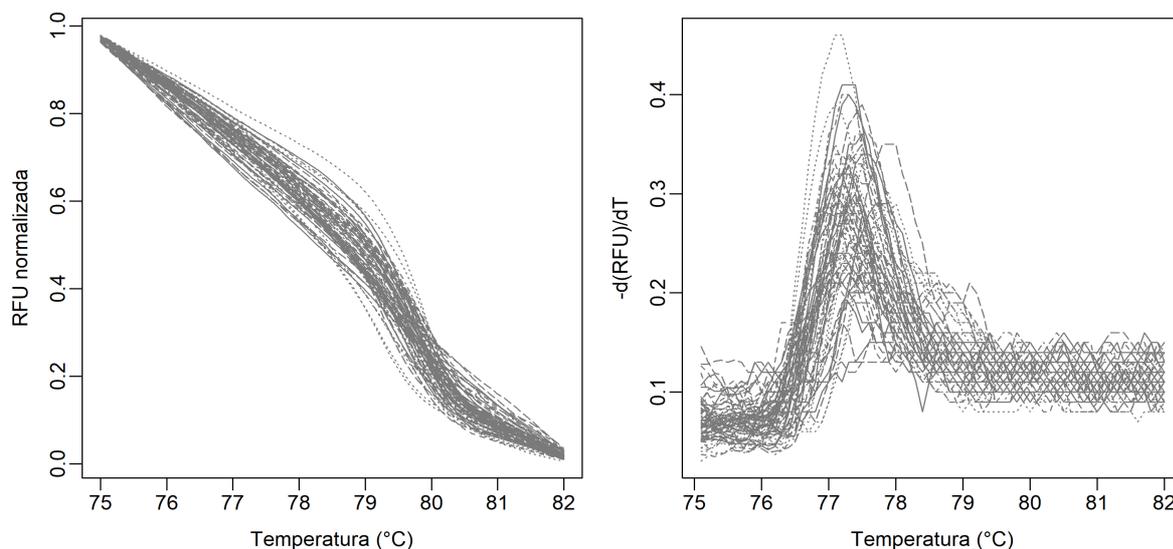


Figura 2.1. Curvas de *melting* normalizadas de HRMA (RFU normalizadas) en función de la temperatura de desnaturalización de todas las muestras estudiadas (izquierda). Picos de *melting* (función derivada de la curva de *melting*) en función de la temperatura de desnaturalización de todas las muestras estudiadas (derecha).

2.1.2. Ecotipos tóxicos y rasgos fenotípicos

Los ecotipos detectados en el Capítulo 2 se asociaron a diferentes rasgos morfológicos de las colonias del CMA presentes en esa muestra. La abundancia y morfología del CMA se determinó por microscopía. Las variables analizadas fueron: abundancia del gen *mcyJ* (copias/ml), volumen de las colonias del CMA (μm^3), relación superficie/volumen de las colonias del CMA (μm^{-1}), riqueza de morfo-especies del CMA, biovolumen del CMA (mm^3/L) y frecuencia de ocurrencia de los ecotipos (**Figura 2.2**).

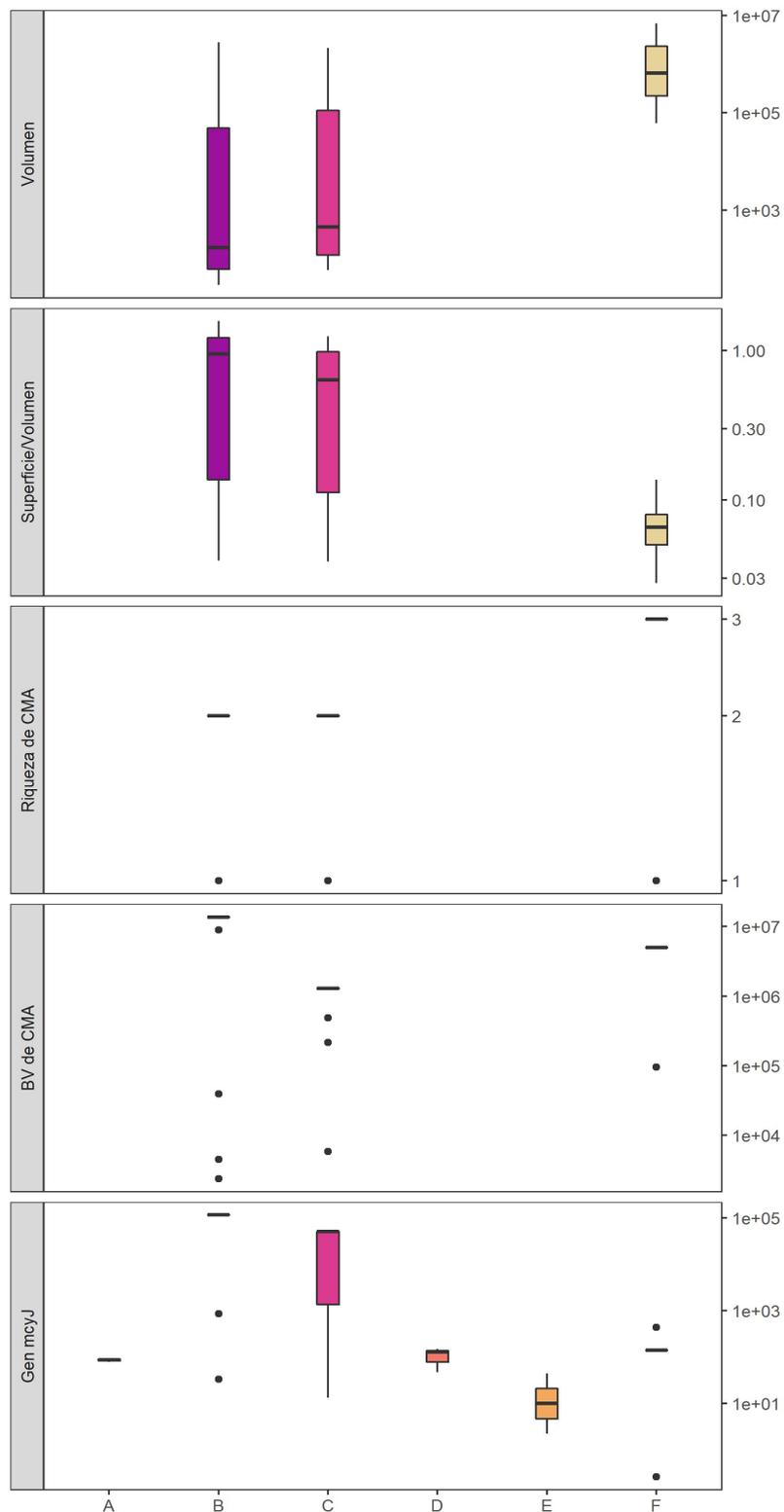


Figura 2.2. Box-plot que muestran las medianas, los rangos inter cuartiles, el valor máximo, mínimo y atípico del volumen de organismos del CMA ($\log, \mu\text{m}^3$), relación superficie/volumen (μm^{-1}), riqueza morfo-especies del CMA, biovolumen del CMA ($\log, \text{mm}^3/\text{L}$), y abundancia del gen *mcyJ* (\log , copias/ml) para cada ecotipo.

- Capítulo 3

2.1.3. Dinámica de la comunidad del CMA en la zona del embalse de Salto Grande

Se realizó también el estudio de la diversidad beta de la comunidad total del CMA como primera aproximación para futuros estudios. Se comparó la estructura de la comunidad entre sitios y estaciones del año mediante de coordenadas principales (PCoA) y para evaluar si existen diferencias significativas de la estructura de la comunidad espacial o temporalmente se utilizó el test PERMANOVA y ANOSIM utilizando la distancia Bray Curtis. Para ello la abundancia de OTUs en cada muestra se normalizó mediante el calculo de abundancia relativa (de 0 a 100).

Como resultado, el análisis de coordenadas principales muestra que las comunidades se separan principalmente por el mes de muestreo (invierno y verano) y que en verano hay más variabilidad (**Figura 2.3**). La coordenada 1 explica el 51 % de la variabilidad y la coordenada 2 el 21 %, en suma, ambas coordenadas explican un 72 % de la variabilidad de los datos (**Figura 2.3**). Los análisis estadísticos PERMANOVA y ANOSIM permitieron determinar que existen diferencias significativas temporales de la diversidad del CMA (PERMANOVA, $p < 0,05$; ANOSIM, $R = 0,5$, $p < 0,05$). Las diferencias espaciales de la diversidad del CMA no fueron significativas (PERMANOVA, $p > 0,05$), sin embargo se observa una tendencia a que las comunidades de los sitios dentro del embalse son mas similares en comparación con aguas arriba del mismo. La estructura de la comunidad del CMA aguas abajo del embalse tiende a asemejarse con la observada en los sitios dentro del embalse.

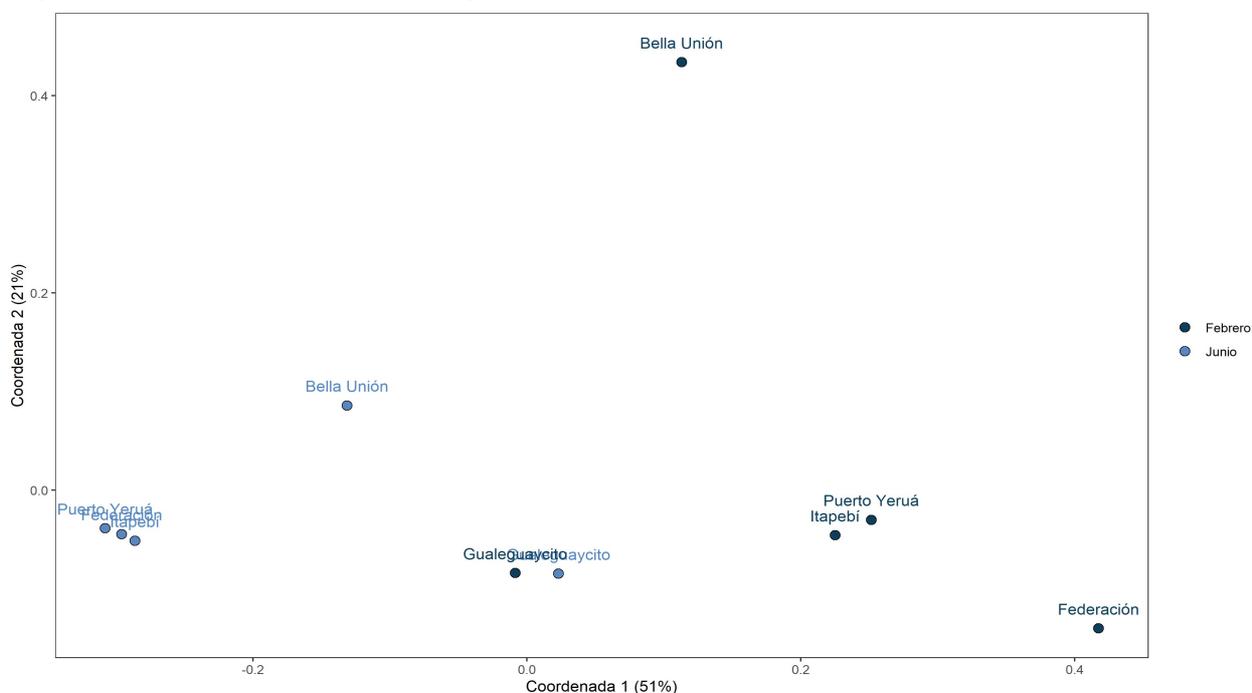


Figura 2.3. Gráfico del análisis de coordenadas principales (PCoA), en el eje X se grafica la coordenada 1 y en el eje Y la coordenada 2. El análisis fue realizado en base a la estructura de la comunidad del CMA (abundancia de OTUs normalizada). PERMANOVA, $p < 0,05$; ANOSIM, $R = 0,5$, $p < 0,05$

2.1.4. Abundancia y transcripción de genes *mcy* y otros indicadores de cianobacterias

En el Capítulo 3 se observaron correlaciones positivas y significativas entre genotipos tóxicos y otros indicadores de cianobacterias tóxicas (Spearman, $p < 0,05$) y entre la expresión de genes *mcy* y otros indicadores de cianobacterias tóxicas (Spearman, $p < 0,05$). A continuación se grafican estas correlaciones en dos ejes X e Y (**Figura 2.4, Figura 2.5**).

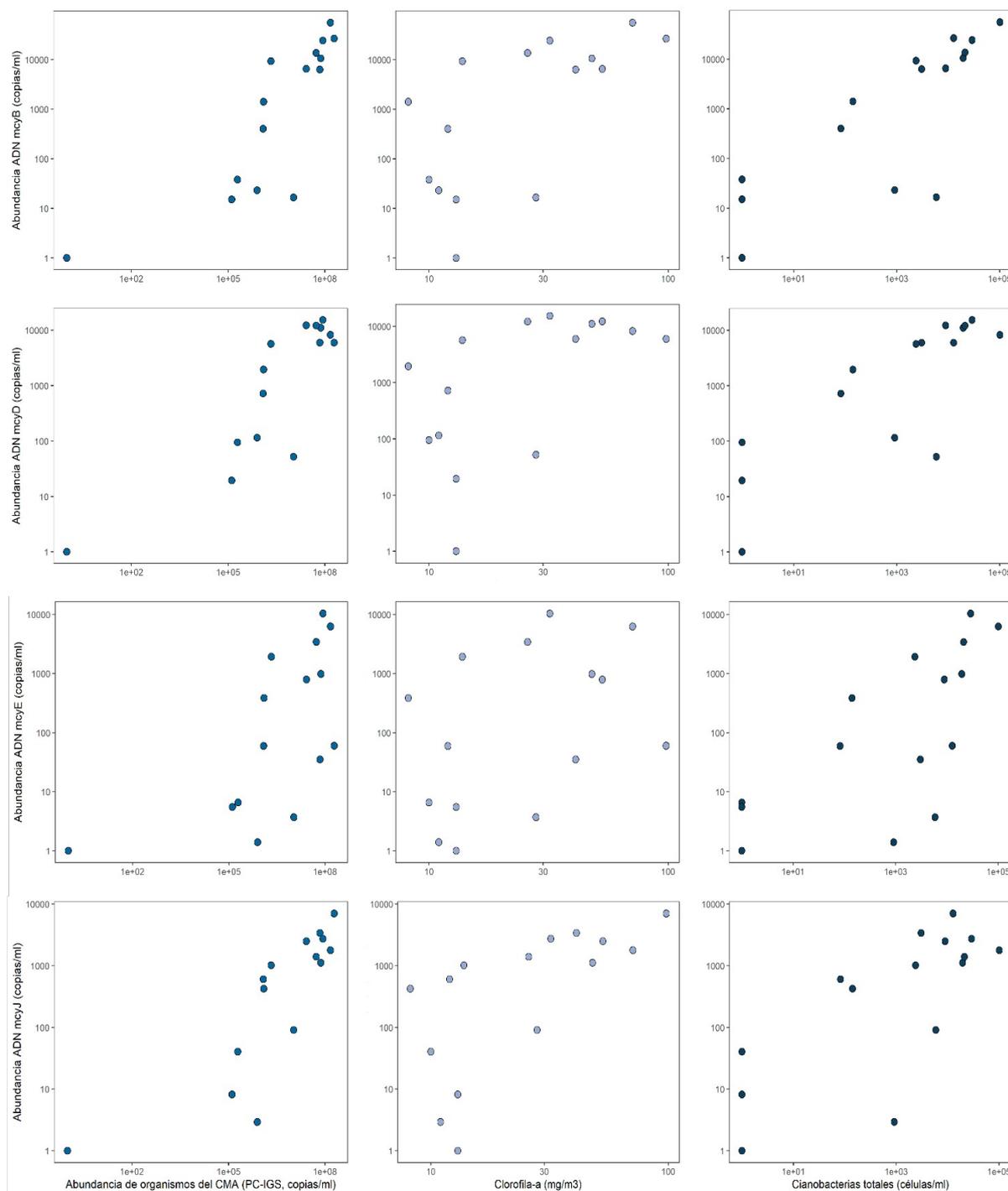


Figura 2.4. Gráficos X e Y de la abundancia de genes *mcy* (Y): *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*, y otros indicadores de cianobacterias (X): abundancia de la comunidad del CMA (gen PC-IGS), clorofila-a y cianobacterias totales. Ambos ejes están logaritimizados en base 10.

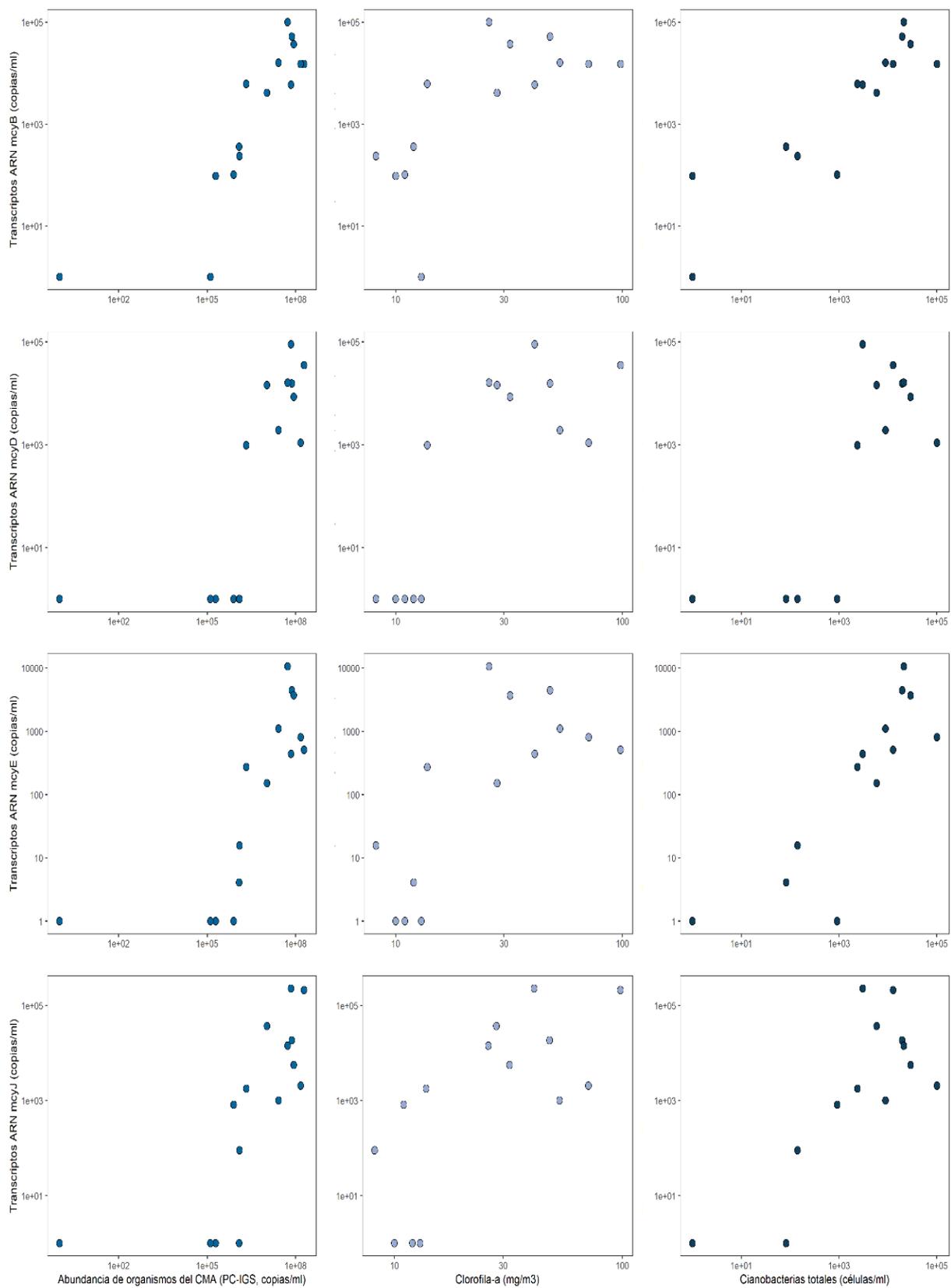


Figura 2.5. Gráficos X e Y de la abundancia de transcritos de los genes *mcy* (Y): *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*, y otros indicadores de cianobacterias (X): abundancia de la comunidad del CMA (gen PC-IGS), clorofila-a y cianobacterias totales. Ambos ejes están logaritmizados en base 10.

2.1.5. Proporción de genotipos tóxicos en el embalse de Salto Grande

La proporciones de genotipos tóxicos estimada con la abundancia de cada gen *mcy* por separado se presentaron tendencias espaciales y temporales similares, valores mínimos dentro del embalse de Salto Grande y en el mes de enero (**Figura 2.6**). Se detectaron algunas correlaciones significativas y positivas (Spearman $r_s = 0,61 - 0,91$, $p < 0,05$, **Tabla 2.2**) entre la proporción de genotipos tóxicos utilizando cada gen *mcy* estudiado (**Figura 2.7**).

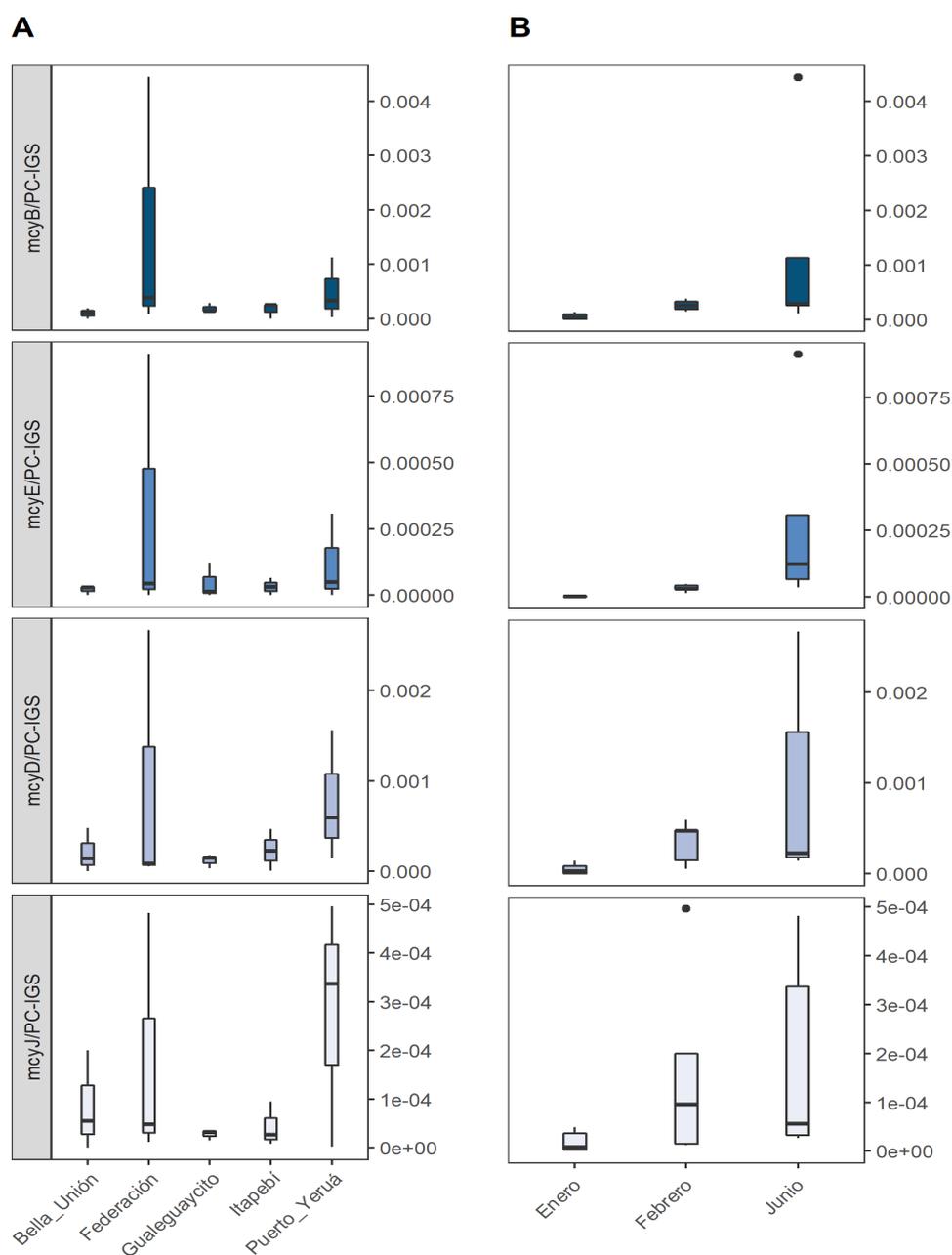


Figura 2.6. Variación espacial (A) y temporal (B) de la proporción de genotipos tóxicos estimada con la abundancia de cada gen *mcy* (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*) por separado.

Tabla 2.2. Valores del coeficiente de correlación de Spearman (rs) entre la proporción de genotipos tóxicos utilizando cada gen *mcy* estudiado. Se presentan sólo los valores que fueron significativos, $p < 0,05$.

	<i>mcyD</i> /PC-IGS	<i>mcyE</i> /PC-IGS	<i>mcyJ</i> /PC-IGS
<i>mcyB</i> /PC-IGS	0,63	0,91	-
<i>mcyD</i> /PC-IGS		0,70	0,78
<i>mcyE</i> /PC-IGS			-

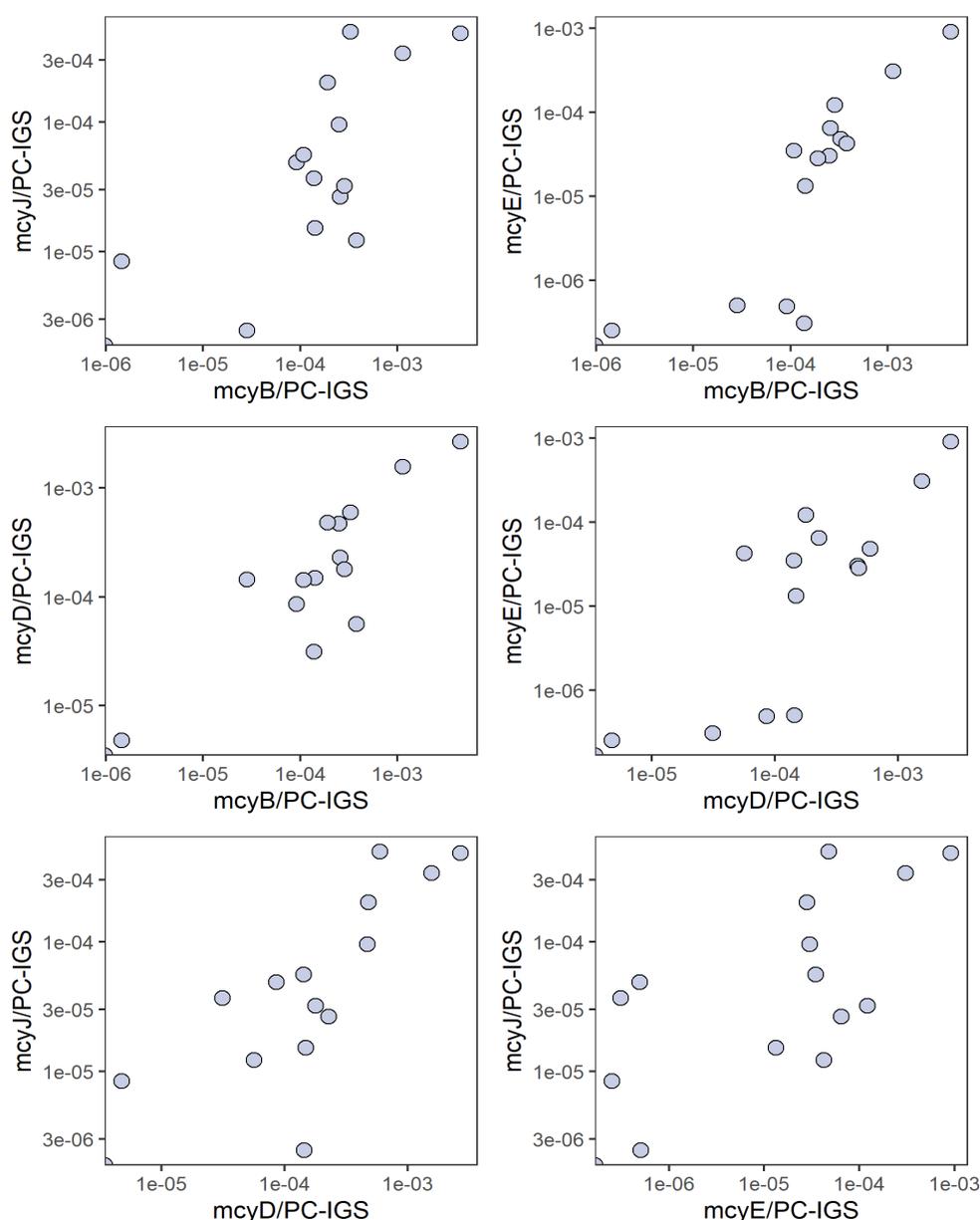


Figura 2.7. Gráficos X e Y de la proporción de genotipos tóxicos estimada con la abundancia de cada gen *mcy* (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ*).

- Capítulo 4

2.1.6. Pruebas piloto para la puesta a punto de los experimentos

Se llevaron a cabo tres experimentos piloto para poner a punto toda la metodología incluyendo la concentración de inóculo inicial, la duración total de los experimentos y la intensidad de luz. En la **Figura 2.8** se ejemplifica el seguimiento de uno de los cultivos mediante fluorescencia (RFU) de la clorofila-a (excitación: 410 nm, emisión: 685 nm). Se puede observar que hay un crecimiento de la comunidad hasta el día 11 y luego comienza a disminuir su biomasa.

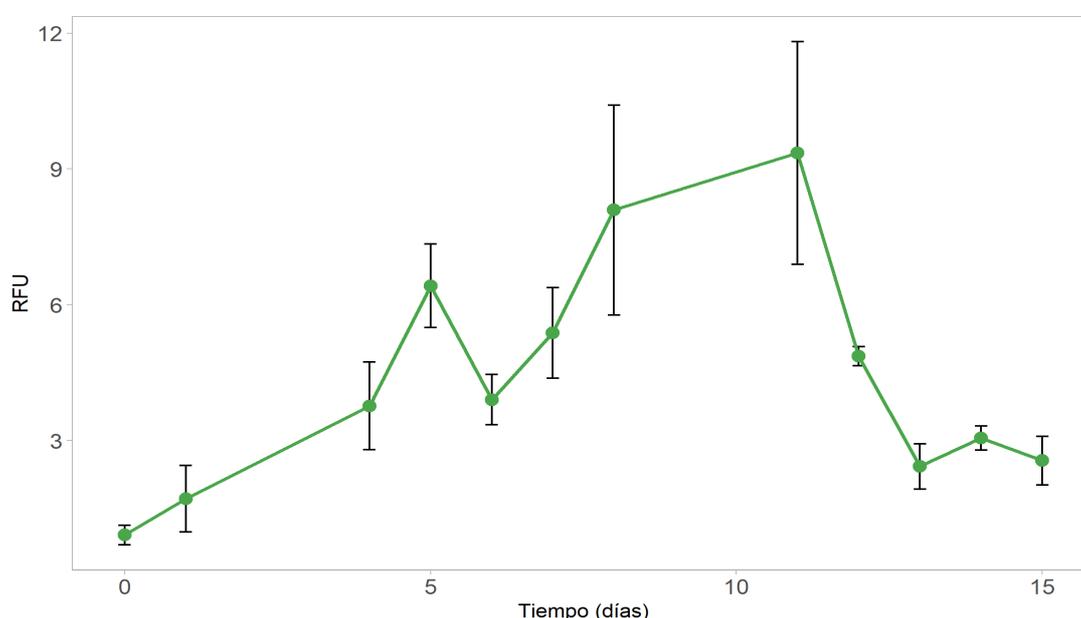


Figura 2.8. Ejemplo del del seguimiento de uno de los cultivos de las puebas piloto para el experimento. Fluorescencia (RFU) de la clorofila-a durante 15 días.

2.1.7. Detalle de los modelos estadísticos GLS aplicados a los resultados de los experimentos.

- Experimento salinidad

Abundancia *mcyE*

Variable de respuesta continua: abundancia *mcyE*

Variables explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5,

Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas4hs, Horas18hs, Horas96hs, Horas168hs, Horas240hs

Modelo:

$\log(\text{abundancia } mcyE+1) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_sal_5} + \beta_2 \text{Tratamiento_sal_10} + \beta_3 \text{Tratamiento_sal_25} + \beta_4 \text{Horas18hs} + \beta_5 \text{Horas96hs} + \beta_6 \text{Horas168hs} + \beta_7 \text{Horas240hs}$

Tabla 2.3. Resultados del modelo GLS para explicar la abundancia del gen *mcyE* en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coefficiente (β_{0-7})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	16,281489	0,515431	0
TratamientoSal_05	-0,479217	0,1238797	0,0003
TratamientoSal_10	-0,730481	0,1245212	0
TratamientoSal_25	-1,011142	0,1245342	0
Horas18	0,394766	0,7412299	0,5966
Horas96	2,016346	0,5386933	0,0005
Horas168	2,901463	0,5274184	0
Horas240	2,650856	0,5121573	0

Expresión *mcyE*

Variable de respuesta continua: abundancia de transcritos *mcyE*

Variabes explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5, Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas0,17hs, Horas4hs, Horas18hs, Horas96hs, Horas168hs, Horas240hs

Modelo:

$\log(\text{abundancia transcritos } mcyE+1) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_sal_5} + \beta_2 \text{Tratamiento_sal_10} + \beta_3 \text{Tratamiento_sal_25} + \beta_4 \text{Horas4hs} + \beta_5 \text{Horas18hs} + \beta_6 \text{Horas96hs} + \beta_7 \text{Horas168hs} + \beta_8 \text{Horas240hs}$

Tabla 2.4. Resultados del modelo GLS para explicar la abundancia de transcritos del gen *mcyE* en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coficiente (β_{0-8})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	12,616057	0,4673086	0
TratamientoSal_05	0,278849	0,2610542	0,2895
TratamientoSal_10	-0,78321	0,3099263	0,014
TratamientoSal_25	-2,635253	0,3326528	0
Horas4	-0,257535	0,5601589	0,6473
Horas18	5,428728	1,0390226	0
Horas96	0,969158	1,0747618	0,3706
Horas168	2,120726	0,4878391	0,0001
Horas240	0,962395	0,5958134	0,1113

Expresión *mcyH*

Variable de respuesta continua: abundancia de transcritos *mcyH*

Variabes explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5, Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas0,17hs, Horas4hs, Horas18hs, Horas96hs, Horas168hs, Horas240hs

Modelo:

$$\log(\text{abundancia transcritos } mcyH+1) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_sal_5} + \beta_2 \text{ Tratamiento_sal_10} + \beta_3 \text{ Tratamiento_sal_25} + \beta_4 \text{ Horas4hs} + \beta_5 \text{ Horas18hs} + \beta_6 \text{ Horas96hs} + \beta_7 \text{ Horas168hs} + \beta_8 \text{ Horas240hs}$$

Tabla 2.5. Resultados del modelo GLS para explicar la abundancia de transcritos del gen *mcyH* en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coficiente (β_{0-8})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	18,60557	0,2548326	0
TratamientoSal_05	0,167606	0,1787355	0,352
TratamientoSal_10	-1,157222	0,1787355	0
TratamientoSal_25	-2,465215	0,1787355	0
Horas4	-0,429492	0,4105735	0,2995
Horas18	5,736218	0,3895828	0
Horas96	0,356001	0,3269292	0,2803
Horas168	0,505929	0,2447376	0,0428
Horas240	-0,330428	0,2700642	0,2257

Expresión espaciador intergénico de ficocianina PC-IGS

Variable de respuesta continua: abundancia de transcritos PC-IGS

Variabes explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5, Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas0,17hs, Horas4hs, Horas18hs, Horas96hs, Horas168hs, Horas240hs

Modelo:

$$\log(\text{abundancia transcritos PC-IGS}+1) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_sal_5} + \beta_2 \text{Tratamiento_sal_10} + \beta_3 \text{Tratamiento_sal_25} + \beta_4 \text{Horas4hs} + \beta_5 \text{Horas18hs} + \beta_6 \text{Horas96hs} + \beta_7 \text{Horas168hs} + \beta_8 \text{Horas240hs}$$

Tabla 2.6. Resultados del modelo GLS para explicar la abundancia de transcritos del espaciador PC-IGS en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coeficiente (β_{0-8})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	23,594602	0,3893391	0
TratamientoSal_05	-0,05126	0,2510338	0,8389
TratamientoSal_10	-1,903096	0,2510338	0
TratamientoSal_25	-3,184511	0,2510338	0
Horas4	-1,003056	0,446343	0,0281
Horas18	1,088892	0,51629	0,0389
Horas96	-0,095066	0,5215171	0,8559
Horas168	4,180585	0,3731762	0
Horas240	1,253459	0,7260683	0,0892

Concentración de microcistinas (MC)

- Suma de las cuatro variantes (MC-LR, MC-RR, MC-WR y MC-YR)

Variable de respuesta continua: concentración de la suma de las cuatro variantes de MC

Variabes explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5, Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas0,17hs, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

suma de las cuatro variantes de MC = $\beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_sal_5} + \beta_2 \text{Tratamiento_sal_10} + \beta_3 \text{Tratamiento_sal_25} + \beta_4 \text{Horas4hs} + \beta_5 \text{Horas18hs} + \beta_6 \text{Horas168hs}$

Tabla 2.7. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la suma de las cuatro variantes de MC en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coficiente (β_{0-6})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	859,3321	113,9694	0
TratamientoSal_05	-143,5548	80,8701	0,0839
TratamientoSal_10	-305,2252	80,816	0,0005
TratamientoSal_25	-337,707	80,816	0,0002
Horas4	-372,9918	106,9236	0,0012
Horas18	320,1557	363,6492	0,3842
Horas168	2146,4027	743,8662	0,0064

- Variante MC-LR

Variable de respuesta continua: concentración de MC-LR

VARIABLES explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5, Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas0,17hs, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

MC-LR = $\beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_sal_5} + \beta_2 \text{Tratamiento_sal_10} + \beta_3 \text{Tratamiento_sal_25} + \beta_4 \text{Horas4hs} + \beta_5 \text{Horas18hs} + \beta_6 \text{Horas168hs}$

Tabla 2.8. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la variantes MC-LR en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coficiente (β_{0-6})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	533,7887	45,3415	0
TratamientoSal_05	-207,8303	37,3713	0
TratamientoSal_10	-323,2064	37,3633	0
TratamientoSal_25	-319,8582	37,3633	0
Horas4	-119,1658	41,5925	0,0068
Horas18	424,6508	268,3652	0,1219
Horas168	1733,055	600,0066	0,0064

- Variante MC-RR

Variable de respuesta continua: concentración de MC-RR

Variabes explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5, Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas0,17hs, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

$$\text{MC-RR} = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_sal_5} + \beta_2 \text{Tratamiento_sal_10} + \beta_3 \text{Tratamiento_sal_25} + \beta_4 \text{Horas4hs} + \beta_5 \text{Horas18hs} + \beta_6 \text{Horas168hs}$$

Tabla 2.9. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la variantes MC-RR en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coeficiente ($\beta_{0,6}$)	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	278,9967	77,96289	0,001
TratamientoSal_05	50,4009	46,78803	0,2882
TratamientoSal_10	2,0061	46,67772	0,9659
TratamientoSal_25	-22,5237	46,68189	0,6322
Horas4	-207,0902	74,65775	0,0085
Horas18	-82,7987	104,1808	0,4317
Horas168	391,8894	167,27424	0,0245

- Variante MC-WR

Variable de respuesta continua: concentración de MC-WR

Variabes explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5, Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas0,17hs, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

$$\text{MC-WR} = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_sal_5} + \beta_2 \text{Tratamiento_sal_10} + \beta_3 \text{Tratamiento_sal_25} + \beta_4 \text{Horas4hs} + \beta_5 \text{Horas18hs} + \beta_6 \text{Horas168hs}$$

Tabla 2.10. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la variantes MC-WR en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coefficiente (β_{0-6})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	46,2868	14,729192	0,0032
TratamientoSal_05	1,53932	2,973093	0,6076
TratamientoSal_10	-4,9173	2,969421	0,106
TratamientoSal_25	-2,90923	2,969421	0,3334
Horas4	-39,785	14,654591	0,0099
Horas18	-21,0625	23,215629	0,37
Horas168	-5,35718	24,727036	0,8296

- Variante MC-YR

Variable de respuesta continua: concentración de MC-YR

Variables explicativas factores: Tratamiento_Control, Tratamiento_sal_5, Tratamiento_sal_10, Tratamiento_sal_25, Horas0,17hs, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

MC-YR = β_0 + β_1 Tratamiento_sal_5 + β_2 Tratamiento_sal_10 + β_3 Tratamiento_sal_25 + β_4 Horas4hs + β_5 Horas18hs + β_6 Horas168hs

Tabla 2.11. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la variantes MC-YR en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coefficiente (β_{0-6})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	12,87992	2,893013	0,0001
TratamientoSal_05	-3,626795	1,871015	0,06
TratamientoSal_10	-4,090623	1,870739	0,035
TratamientoSal_25	-3,261338	1,870794	0,0894
Horas4	-6,652898	2,746122	0,0203
Horas18	0,090454	5,541925	0,9871
Horas168	25,629048	9,867421	0,0133

– Experimento temperatura

Abundancia *mcyE*Variable de respuesta continua: abundancia *mcyE*

Variables explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas96hs, Horas168hs, Horas240hs

Modelo:

$$\log(\text{abundancia } mcyE + 1) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}} + \beta_2 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas96hs} + \beta_5 \text{Horas168hs} + \beta_6 \text{Horas240hs} + \beta_7 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}}:\text{Horas18hs} + \beta_8 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}}:\text{Horas18hs} + \beta_9 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}}:\text{Horas96hs} + \beta_{10} \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}}:\text{Horas96hs} + \beta_{11} \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}}:\text{Horas168hs} + \beta_{12} \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}}:\text{Horas168hs} + \beta_{13} \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}}:\text{Horas240hs} + \beta_{14} \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}}:\text{Horas240hs}$$

Tabla 2.12. Resultados del modelo GLS para explicar la abundancia del gen *mcyE* en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coeficiente (β_{0-14})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	17,310332	0,2357871	0
TratamientoTemp_21	0,325468	0,3334534	0,3368
TratamientoTemp_30	1,056402	0,3334534	0,0035
Horas18	1,122618	0,3563009	0,0037
Horas96	0,761244	0,3512461	0,0383
Horas168	-0,626931	0,459912	0,183
Horas240	0,052071	0,3433886	0,8805
TratamientoTemp_21:Horas18	-0,526814	0,5038855	0,3041
TratamientoTemp_30:Horas18	-1,727943	0,5038855	0,0018
TratamientoTemp_21:Horas96	-0,647374	0,4967369	0,2024
TratamientoTemp_30:Horas96	-1,403649	0,4967369	0,0083
TratamientoTemp_21:Horas168	0,433571	0,6504137	0,5101
TratamientoTemp_30:Horas168	0,453021	0,6504137	0,4915
TratamientoTemp_21:Horas240	0,108206	0,4856248	0,8252
TratamientoTemp_30:Horas240	-3,063154	0,4856248	0

Expresión *mcyE*

Variable de respuesta continua: abundancia de transcritos *mcyE*

Variabes explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas96hs, Horas168hs, Horas240hs

Modelo:

$$\log(\text{abundancia de transcritos } mcyE + 1) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C} + \beta_2 \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas96hs} + \beta_5 \text{Horas168hs} + \beta_6 \text{Horas240hs} + \beta_7 \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C:Horas18hs} + \beta_8 \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C:Horas18hs} + \beta_9 \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C:Horas96hs} + \beta_{10} \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C:Horas96hs} + \beta_{11} \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C:Horas168hs} + \beta_{12} \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C:Horas168hs} + \beta_{13} \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C:Horas240hs} + \beta_{14} \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C:Horas240hs}$$

Tabla 2.13. Resultados del modelo GLS para explicar la abundancia de transcritos del gen *mcyE* en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coeficiente (β_{0-14})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	16,44719	0,1204033	0 0000
TratamientoTemp_21	-0,804183	0,170276	0,0001
TratamientoTemp_30	-2,528756	0,170276	0
Horas18	-2,004994	0,1993936	0
Horas96	-2,18364	0,3000548	0
Horas168	-2,438366	0,2582967	0
Horas240	-2,401321	0,3917383	0
TratamientoTemp_21:Horas18	1,449546	0,2819852	0
TratamientoTemp_30:Horas18	1,143282	0,2819852	0,0003
TratamientoTemp_21:Horas96	1,257542	0,4243416	0,0059
TratamientoTemp_30:Horas96	2,285374	0,4243416	0
TratamientoTemp_21:Horas168	1,305293	0,3652868	0,0012
TratamientoTemp_30:Horas168	3,176765	0,3652868	0
TratamientoTemp_21:Horas240	0,013265	0,5540016	0,9811
TratamientoTemp_30:Horas240	2,90359	0,5540016	0

Expresión *mcyH*

Variable de respuesta continua: abundancia de transcritos *mcyH*

Variables explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas96hs, Horas168hs, Horas240hs

Modelo:

$$\log(\text{abundancia de transcritos } mcyH+1) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C} + \beta_2 \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas96hs} + \beta_5 \text{Horas168hs} + \beta_6 \text{Horas240hs} + \beta_7 \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C:Horas18hs} + \beta_8 \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C:Horas18hs} + \beta_9 \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C:Horas96hs} + \beta_{10} \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C:Horas96hs} + \beta_{11} \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C:Horas168hs} + \beta_{12} \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C:Horas168hs} + \beta_{13} \text{Tratamiento_21}^\circ\text{C:Horas240hs} + \beta_{14} \text{Tratamiento_30}^\circ\text{C:Horas240hs}$$

Tabla 2.14. Resultados del modelo GLS para explicar la abundancia de transcritos del gen *mcyH* en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coficiente (β_{0-14})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	22,736847	0,207638	0
TratamientoTemp_21	-0,783267	0,2936444	0.0122
TratamientoTemp_30	-2,320582	0,2936444	0
Horas18	-2,262418	0,3180654	0
Horas96	-1,780293	0,3621846	0
Horas168	-1,811861	0,2521252	0
Horas240	-2,000614	0,3608664	0
TratamientoTemp_21:Horas18	1,563941	0,4498124	0,0016
TratamientoTemp_30:Horas18	2,024258	0,4498124	0,0001
TratamientoTemp_21:Horas96	0,560059	0,5122064	0,2829
TratamientoTemp_30:Horas96	1,536038	0,5122064	0,0054
TratamientoTemp_21:Horas168	0,559927	0,3565588	0,1268
TratamientoTemp_30:Horas168	2,585666	0,3565588	0
TratamientoTemp_21:Horas240	0,888729	0,5103422	0,0919
TratamientoTemp_30:Horas240	2,610242	0,5103422	0

Expresión espaciador intergénico de ficocianina PC-IGS

Variable de respuesta continua: abundancia de transcritos PC-IGS

Variabes explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas96hs, Horas168hs, Horas240hs

Modelo:

$$\log(\text{abundancia de transcritos PC-IGS}+1) = \beta_0 + \beta_1\text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}} + \beta_2 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas96hs} + \beta_5 \text{Horas168hs} + \beta_6 \text{Horas240hs} + \beta_7 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}}:\text{Horas18hs} + \beta_8 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}}:\text{Horas18hs} + \beta_9\text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}}:\text{Horas96hs} + \beta_{10}\text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}}:\text{Horas96hs} + \beta_{11}\text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}}:\text{Horas168hs} + \beta_{12}\text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}}:\text{Horas168hs} + \beta_{13}\text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}}:\text{Horas240hs} + \beta_{14}\text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}}:\text{Horas240hs}$$

Tabla 2.15. Resultados del modelo GLS para explicar la abundancia de transcritos del espaciador PC-IGS en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coficiente (β_{0-14})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	24,629815	0,1509777	0
TratamientoTemp_21	0,208557	0,2135148	0,3365
TratamientoTemp_30	-0,081861	0,2135148	0,7041
Horas18	-2,299977	0,4304424	0
Horas96	-1,111391	0,5053741	0,0357
Horas168	0,413607	0,2830389	0,1543
Horas240	-0,818431	0,5007813	0,1126
TratamientoTemp_21:Horas18	0,961749	0,6087375	0,1246
TratamientoTemp_30:Horas18	1,388444	0,6087375	0,0298
TratamientoTemp_21:Horas96	1,5178	0,7147069	0,0421
TratamientoTemp_30:Horas96	1,573023	0,7147069	0,0356
TratamientoTemp_21:Horas168	0,342883	0,4002774	0,3984
TratamientoTemp_30:Horas168	1,446237	0,4002774	0,0011
TratamientoTemp_21:Horas240	-1,448806	0,7082118	0,0496
TratamientoTemp_30:Horas240	2,323096	0,7082118	0,0026

Concentración de microcistinas (MC)

- Suma de las cuatro variantes (MC-LR, MC-RR, MC-WR y MC-YR)

Variable de respuesta continua: concentración de la suma de las cuatro variantes de MC

Variables explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

suma de las cuatro variantes de MC = $\beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}} + \beta_2 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas168hs}$

Tabla 2.16. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la suma de las cuatro variantes de MC en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coeficiente (β_{0-4})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	6192,04	464,9012	0
TratamientoTemp_21	-853,317	283,1718	0,0064
TratamientoTemp_30	-623,306	283,1718	0,0385
Horas18	-2701,88	452,5975	0
Horas168	-2886,485	631,3654	0,0001

- Variante MC-LR

Variable de respuesta continua: concentración de MC-LR

Variables explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

MC-LR = $\beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}} + \beta_2 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas168hs}$

Tabla 2.17. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la variantes MC-LR en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coeficiente (β_{0-4})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	5861,684	440,9953	0
TratamientoTemp_21	-768,583	266,3806	0,0086
TratamientoTemp_30	-587,109	266,3806	0,0383
Horas18	-2556,182	429,6114	0
Horas168	-2877,526	582,5644	0,0001

- Variante MC-RR

Variable de respuesta continua: concentración de MC-RR

Variabes explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

$$\text{MC-RR} = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}} + \beta_2 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas168hs}$$

Tabla 2.18. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la variantes MC-RR en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coeficiente (β_{0-4})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	277,22118	22,15737	0
TratamientoTemp_21	-66,73094	17,89517	0,0012
TratamientoTemp_30	-38,94592	17,89517	0,0405
Horas18	-120,60222	21,15909	0
Horas168	-34,44333	54,53061	0,5341

- Variante MC-WR

Variable de respuesta continua: concentración de MC-WR

Variables explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

$$\text{MC-WR} = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}} + \beta_2 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas168hs}$$

Tabla 2.19. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la variantes MC-WR en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coficiente (β_{0-4})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	22,10347	4,29014	0
TratamientoTemp_21	-8,91643	2,11173	0,0004
TratamientoTemp_30	-5,07398	2,11173	0,0251
Horas18	-9,81556	4,20675	0,0292
Horas168	38,71111	34,28838	0,2711

- Variante MC-YR

Variable de respuesta continua: concentración de MC-YR

Variables explicativas factores: Tratamiento_10°C, Tratamiento_21°C, Tratamiento_30°C, Horas4hs, Horas18hs, Horas168hs

Modelo:

$$\text{MC-YR} = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento}_{21^\circ\text{C}} + \beta_2 \text{Tratamiento}_{30^\circ\text{C}} + \beta_3 \text{Horas18hs} + \beta_4 \text{Horas168hs}$$

Tabla 2.20. Resultados del modelo GLS para explicar la concentración de la variantes MC-YR en base a el tratamiento y el tiempo como factores. Se presentan los valores de los coeficientes y el intercepto, su desvío estándar y su p-valor.

	Coficiente (β_{0-4})	Desv. Est.	p-valor
Intercepto	33,17373	3,729592	0
TratamientoTemp_21	-6,0413	2,815527	0,0432
TratamientoTemp_30	-1,65321	2,815527	0,5631
Horas18	-15,27889	3,584884	0,0003
Horas168	-13,22778	6,2003	0,0443

2.1.8. Relación entre expresión del gen *mcyE* y expresión del gen *mcyH* en los experimentos

Como se mencionó en el Capítulo 4, se encontraron correlaciones positivas y significativas entre la abundancia de transcritos de *mcyE* y *mcyH* en ambos experimentos (**Figura 2.10** y **Figura 2.11**).

– Experimento salinidad

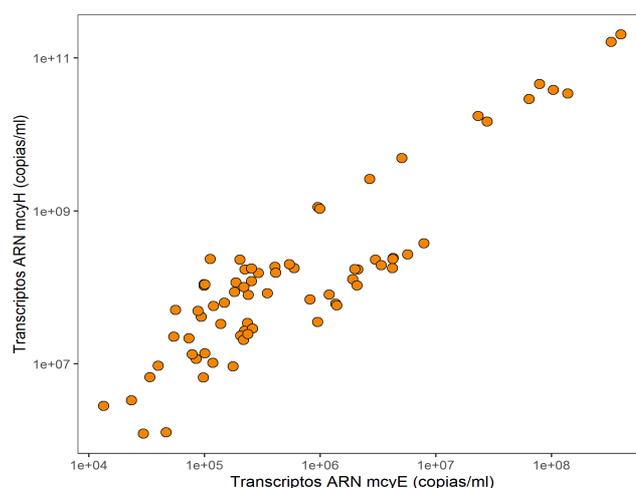


Figura 2.10. Gráficos X e Y de la abundancia transcritos del gen *mcyE* (X) y la abundancia transcritos del gen *mcyH* (Y). Ambos ejes están logaritmizados en base 10.

– Experimento temperatura

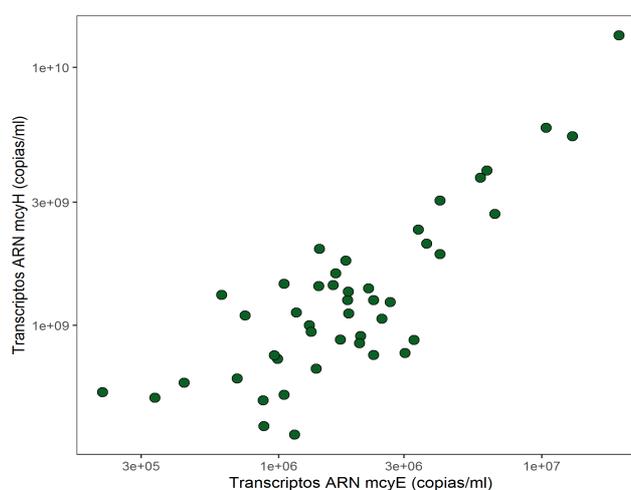


Figura 2.11. Gráficos X e Y de la abundancia transcritos del gen *mcyE* (X) y la abundancia transcritos del gen *mcyH* (Y). Ambos ejes están logaritmizados en base 10.

2.1.6. Relación entre las diferentes variantes de microcistina (MC)

En ambos experimentos del Capítulo 4, se encontraron correlaciones positivas y significativas entre las diferentes variantes de la microcistina. A continuación se detallan los valores de las correlaciones y gráficos X-Y.

– Experimento salinidad

Tabla 2.21. Valores del coeficiente de correlación de Spearman (r_s) entre las diferentes variantes de la microcistina estudiadas. Se presentan sólo los valores que fueron significativos, $p < 0,05$.

	MC-LR	MC-RR	MC-YR
MC-RR	0,45		
MC-YR	0,57	0,92	
MC-WR	0,45	0,80	0,77

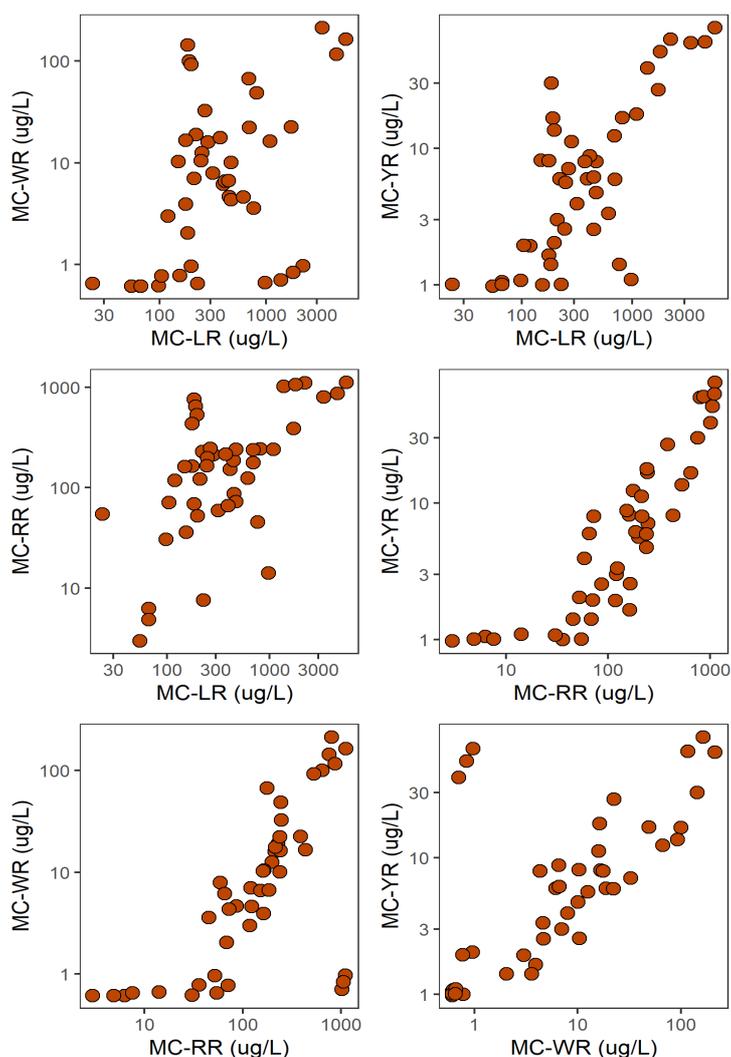


Figura 2.12. Gráficos X e Y de la concentración de las variantes de microcistina (MC): LR, RR, WR y YR.

– Experimento temperatura

Tabla 2.22. Valores del coeficiente de correlación de Spearman (r_s) entre las diferentes variantes de la microcistina estudiadas. Se presentan sólo los valores que fueron significativos, $p < 0,05$.

	MC-LR	MC-RR	MC-YR
MC-RR	0,76		
MC-YR	0,84	0,86	
MC-WR	0,54	0,87	0,76

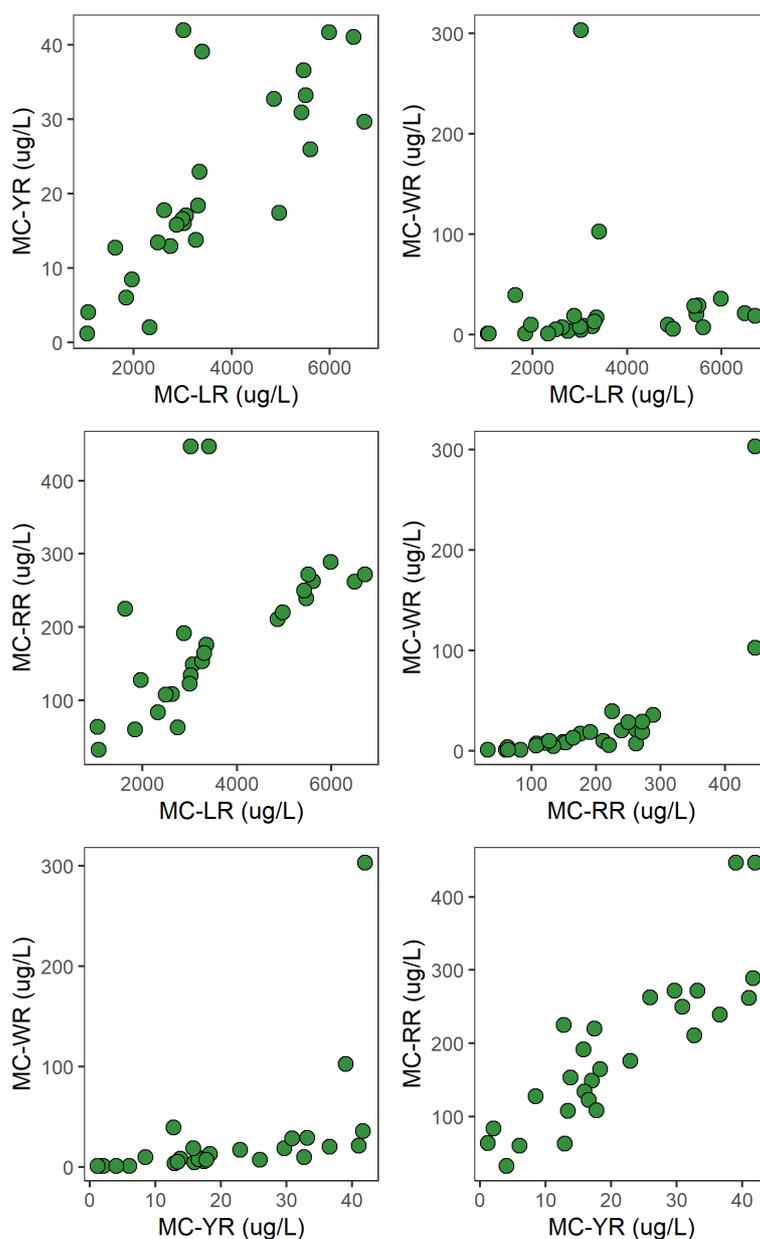


Figura 2.13. Gráficos X e Y de la concentración de las variantes de microcistina (MC): LR, RR, WR y YR.

2.1.9. Relación entre expresión de los genes *mcyE* y *mcyH* con la suma de la concentración de las variantes de microcistina (MC)

Solamente se encontró correlación positiva y significativa entre la abundancia de transcritos del gen *mcyE* con la suma de las cuatro variantes de la toxina en el experimento de salinidad del Capítulo 4. En las **Figuras 2.14** y **2.15** se grafican los valores en dos ejes X-Y.

– Experimento salinidad

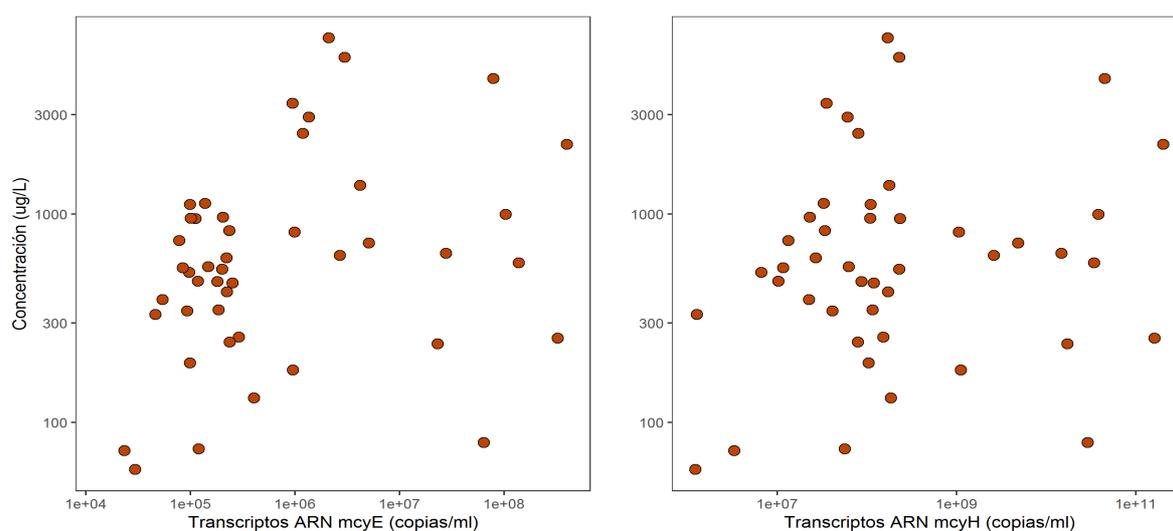


Figura 2.14. Gráficos X e Y de la abundancia transcritos del gen *mcyE* (derecha) y *mcyH* (izquierda) (X) y la concentración de la suma de las cuatro variantes de MC (Y). Ambos ejes están logaritmizados.

– Experimento temperatura

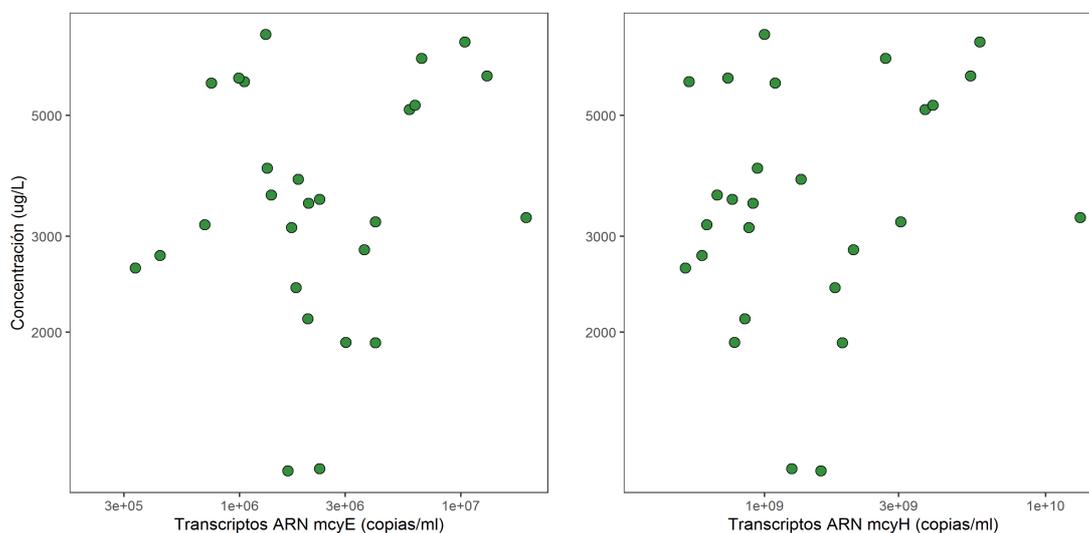


Figura 2.15. Gráficos X e Y de la abundancia transcritos del gen *mcyE* (derecha) y *mcyH* (izquierda) (X) y la concentración de la suma de las cuatro variantes de MC (Y). Ambos ejes están logaritmizados.

2.1.10. Relación entre expresión de los genes *mcyE* y *mcyH* con la concentración de cada variantes de microcistina (MC)

– Experimento salinidad

Se evaluó la correlación entre la abundancia de transcritos de los genes *mcyE* y *mcyH* con la concentración de las cuatro variantes de microcistina. Solamente se encontró una asociación positiva y significativa entre la abundancia de transcritos de *mcyE* y la variante MC-LR (Spearman r_s 0,38, $p < 0,05$). En **Figuras 2.16** se representan los valores en gráficos X-Y.

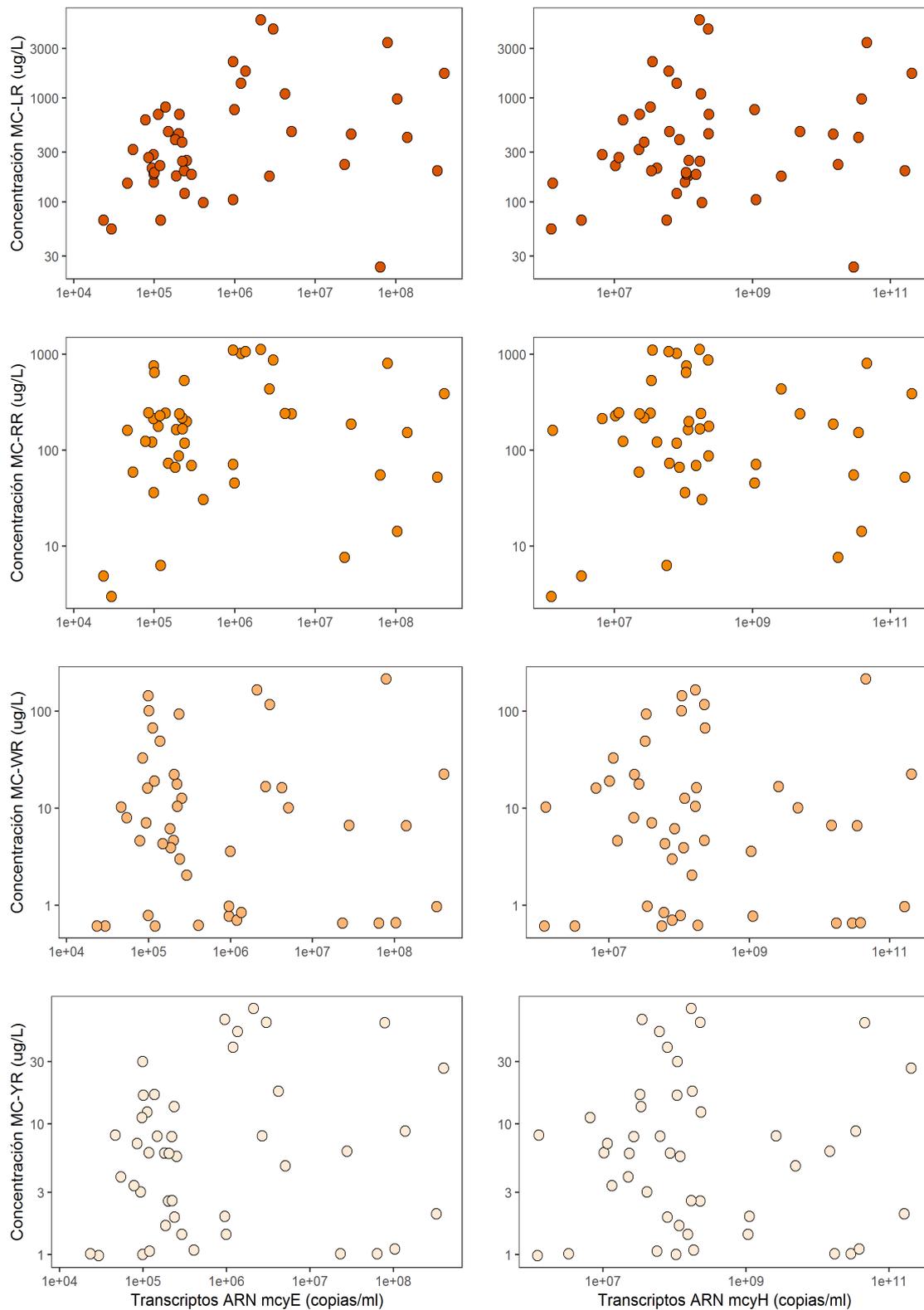


Figura 2.16. Gráficos X e Y de la abundancia transcritos del gen *mcyE* (derecha) y *mcyH* (izquierda) (X) y la concentración de las cuatro variantes de MC (Y): MC-LR, MC-RR, MC-WR y MC-YR. Ambos ejes están logaritmizados en base 10.

– Experimento temperatura

Se evaluó la correlación entre la abundancia de transcritos de los genes *mcyE* y *mcyH* con la concentración de las cuatro variantes de microcistina. No se encontró correlación alguna entre estas variables. En **Figuras 2.17** se representan los valores en gráficos X-Y.

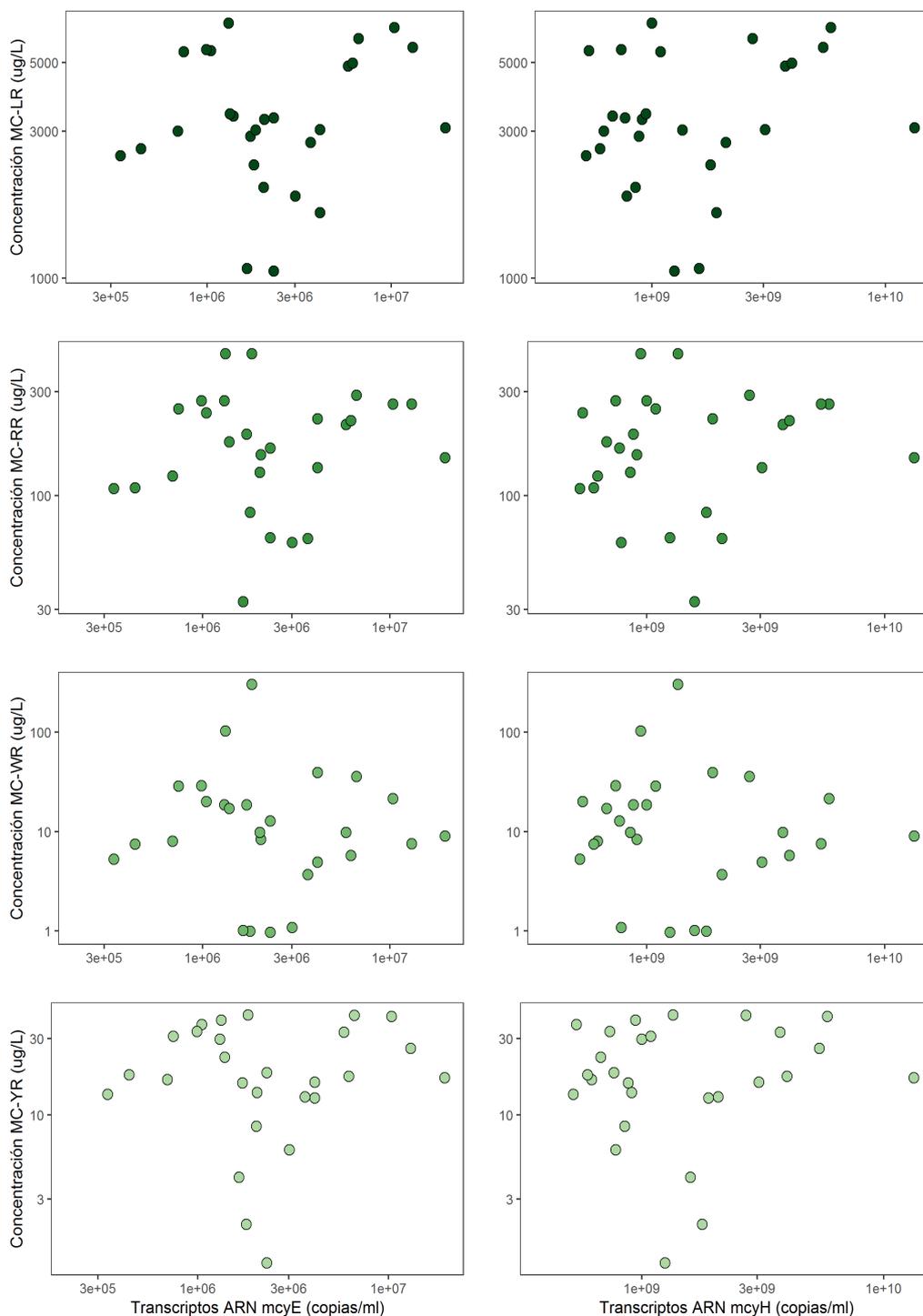


Figura 2.17. Gráficos X e Y de la abundancia transcritos del gen *mcyE* (derecha) y *mcyH* (izquierda) (X) y la concentración de las cuatro variantes de MC (Y): MC.LR, MC-RR, MC-WR y MC-YR. Ambos ejes estan logaritimizados en base 10.

Apéndice 3

3.1. Scripts de R

3.1.1. Capítulo 1

```
#Cargar la tabla de datos#
datos<-read.table("todas_prom.csv", header=TRUE, dec=".", sep=",")

#Para todas las correlaciones se utilizó esta función#
cor.test(var_1, var_2, method="spearman", data=datos)

#var_1 y var_2 variables ambientales y/o biológicas.

#Modelos lineales generalizados (GLM) #
mod1<-glm(var_y~var_x1+var_x2+var_x3+var_x4+...+var_xn, data=datos,
          family=Gamma(link = "log"))

mod_step<-step(mod1, direction="backward")

summary(mod_step)

#var_y, variable de respuesta, en este caso abundancia de genes mcy.
#var_xn, variables explicativas, en este caso variables ambientales.

#Random Forest#
library(rf)

RF_1= randomForest(var_y~var_x1+var_x2+var_x3+var_x4+...+var_xn, data=datos,
                  do.trace=100, importance=TRUE)

#var_y, variable de respuesta, en este caso abundancia de genes mcy.
#var_xn, variables explicativas, en este caso variables ambientales.

RF_1
varImpPlot(RF_1)
importance(RF_1)

#Error sobre la muestra de entrenamiento#
pred_1=predict(RF_1, type="class")
class.pred=table(pred_1, datos_observados)
error=1-(sum(diag(class.pred))/sum(class.pred))
error

#datos_observados, datos verdaderos de la tabla de datos.
```

```

#Error sobre la muestra de prueba
K=100
error.rf=list(matrix(NA, K))
n = nrow(datos)
for(k in 1:K) {
  smp=sample(n, round(n/3))
  learn=datos[-smp,]
  learn=learn[,c(var_x1+var_x2+var_x3+var_x4+...+var_xn)]
  test=datos[smp,]
  test=test[,c(var_x1+var_x2+var_x3+var_x4+...+var_xn)]

  modelo=randomForest(var_y~var_x1+var_x2+var_x3+var_x4+...+var_xn,
    do.trace=100,learn)
  pred = predict(modelo,type="class",test)
  class.pred=table(pred,test[,1])
  Acc.rf[k] =(sum(diag(class.pred))/sum(class.pred))
}

#error
mean(unlist(Acc.rf))
sd(unlist(Acc.rf))
class.pred

#var_y, variable de respuesta, en este caso abundancia de genes mcY.
#var_xn, variables explicativas, en este caso variables ambientales.

```

3.1.2. Capítulo 2

```

#Ejemplo sintético del HRMA-CART funcional con los pasos
#operativos del método

library(deSolve)
library(MASS)
library(mvtnorm)

#Genero las condiciones ambientales para cada genotipo J#

#Genotipo de agua dulce e invierno
Sigma1<-matrix(c(100, 1, 1, 1), 2)
Sigma1
Mu1<- c(15,0) # Temp- Sal
bivn1 <- mvrnorm(1000, mu = Mu1, Sigma = Sigma1)

#Genotipo Salobre
Sigma2<-matrix(c(60, 0.6, 0.6, 60), 2)
Sigma2
Mu2<- c(15,15) # Temp- Sal
bivn2 <- mvrnorm(1000, mu = Mu2, Sigma = Sigma2)

#Genotipo Dulce Verano
Sigma3<-matrix(c(50, 0.1, 0.1, 10), 2)
Sigma3

```

```

Mu3<- c(25,0) # Temp- Sal
bivn3 <- mvrnorm(1000, mu = Mu3, Sigma = Sigma3)

#Densidad de Kernel para cada genotipo#
bivn.kde1 <- kde2d(bivn1[,1], bivn1[,2], n = 20)
bivn.kde2 <- kde2d(bivn2[,1], bivn2[,2], n = 20)
bivn.kde3 <- kde2d(bivn3[,1], bivn3[,2], n = 20)

bivn.kde1$z<- bivn.kde1$z*1e6
bivn.kde2$z<- bivn.kde2$z*1e6
bivn.kde3$z<- bivn.kde3$z*1e6

#Condiciones ambientales simuladas en las se van a evaluar la
#abundancia de genotipos

#Agua dulce verano
SaltoSummer_1<-c(35, 0) # Temp- Sal
SaltoSummer_2<-c(27, 0)
SaltoSummer_3<-c(33, 0)
SaltoSummer_4<-c(26, 0)
SaltoSummer_5<-c(25, 0)
SaltoSummer_6<-c(31, 0)
SaltoSummer_7<-c(30, 0)
SaltoSummer_8<-c(28, 0)
SaltoSummer_9<-c(32, 0)
SaltoSummer_10<-c(34, 0)
SaltoSummer_11<-c(24, 0)

#Agua dulce invierno
SaltoWinter_1<-c(15,0)
SaltoWinter_2<-c(14,0)
SaltoWinter_3<-c(12,0)
SaltoWinter_4<-c(13,0)
SaltoWinter_5<-c(10,0)
SaltoWinter_6<-c(11,0)
SaltoWinter_7<-c(16,0)
SaltoWinter_8<-c(17,0)
SaltoWinter_9<-c(18,0)
SaltoWinter_10<-c(19,0)
SaltoWinter_11<-c(20,0)

#Agua salada verano
RdlPsummer_1<-c(20, 29)
RdlPsummer_2<-c(21, 22)
RdlPsummer_3<-c(22, 30)
RdlPsummer_4<-c(23, 26)
RdlPsummer_5<-c(24, 34)
RdlPsummer_6<-c(25, 33)
RdlPsummer_7<-c(26, 28)
RdlPsummer_8<-c(19, 19)
RdlPsummer_9<-c(23, 29)
RdlPsummer_10<-c(22, 22)
RdlPsummer_11<-c(20, 33)

#Agua salada invierno
RdlPwinter_1<- c(9, 10)
RdlPwinter_2<- c(10, 20)
RdlPwinter_3<- c(11, 20)

```

```

RdlPwinter_4<- c(12, 16)
RdlPwinter_5<- c(13, 33)
RdlPwinter_6<- c(14, 25)
RdlPwinter_7<- c(15, 31)
RdlPwinter_8<- c(8, 28)
RdlPwinter_9<- c(9, 11)
RdlPwinter_10<- c(15, 33)
RdlPwinter_11<- c(12, 36)

#Genero una función que devuelve la densidad de genotipos de J1, J2 y J3 en
#determinadas condiciones ambientales

RelativeAbundFunc<- function(EnvCond){ (EnvCond=c(Temperatura- Salinidad))
J1wRdlP<-dmvnorm(EnvCond, Mu1, Sigma1, log=FALSE)*1e6
J2wRdlP<-dmvnorm(EnvCond, Mu2, Sigma2, log=FALSE)*1e6
J3wRdlP<-dmvnorm(EnvCond, Mu3, Sigma3, log=FALSE)*1e6

abund<-c(J1=J1wRdlP,J2=J2wRdlP,J3=J3wRdlP)

return(list(Abundance=abund, EnvironmentalConditions=EnvCond))
}

#Calculo las abundancias relativas en las condiciones ambientales
#simuladas previamente

RelativeAbundFunc(RdlPwinter_1)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_2)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_3)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_4)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_5)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_6)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_7)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_8)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_9)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_10)
RelativeAbundFunc(RdlPwinter_11)

RelativeAbundFunc(RdlPsummer_1)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_2)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_3)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_4)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_5)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_6)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_7)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_8)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_9)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_10)
RelativeAbundFunc(RdlPsummer_11)

RelativeAbundFunc(SaltoSummer_1)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_2)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_3)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_4)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_5)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_6)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_7)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_8)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_9)
RelativeAbundFunc(SaltoSummer_10)

```

```

RelativeAbundFunc (SaltoSummer_11)

RelativeAbundFunc (SaltoWinter_1)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_2)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_3)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_4)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_5)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_6)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_7)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_8)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_9)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_10)
RelativeAbundFunc (SaltoWinter_11)

#Cargo la tabla que contiene la información del HRMA de cada clon
#J1, J2 y J3

RFU_clones<-read.table("RFU_clones.csv", header=TRUE, dec=".", sep=",")

J1<-RFU_clones[,2]
J2<-RFU_clones[,3]
J3<-RFU_clones[,4]

#Cálculo de las proporciones relativas (pi) de cada J en cada
#sitio simulado

#Simulación agua salada invierno
pi_RdlPw_1<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_1) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_1) $Abundance)
pi_RdlPw_2<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_2) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_2) $Abundance)
pi_RdlPw_3<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_3) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_3) $Abundance)
pi_RdlPw_4<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_4) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_4) $Abundance)
pi_RdlPw_5<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_5) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_5) $Abundance)
pi_RdlPw_6<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_6) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_6) $Abundance)
pi_RdlPw_7<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_7) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_7) $Abundance)
pi_RdlPw_8<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_8) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_8) $Abundance)
pi_RdlPw_9<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_9) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_9) $Abundance)
pi_RdlPw_10<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_10) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_10) $Abundance)
pi_RdlPw_11<-RelativeAbundFunc (RdlPwinter_11) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (RdlPwinter_11) $Abundance)

#Simulación agua dulce verano
pi_SaltoV_1<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_1) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (SaltoSummer_1) $Abundance)
pi_SaltoV_2<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_2) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (SaltoSummer_2) $Abundance)
pi_SaltoV_3<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_3) $Abundance
  /sum (RelativeAbundFunc (SaltoSummer_3) $Abundance)

```

```

pi_SaltoV_4<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_4) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoSummer_4) $Abundance)
pi_SaltoV_5<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_5) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoSummer_5) $Abundance)
pi_SaltoV_6<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_6) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoSummer_6) $Abundance)
pi_SaltoV_7<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_7) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoSummer_7) $Abundance)
pi_SaltoV_8<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_8) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoSummer_8) $Abundance)
pi_SaltoV_9<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_9) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoSummer_9) $Abundance)
pi_SaltoV_10<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_10) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoSummer_10) $Abundance)
pi_SaltoV_11<-RelativeAbundFunc (SaltoSummer_11) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoSummer_11) $Abundance)

#Simulación agua dulce invierno
pi_SaltoI_1<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_1) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_1) $Abundance)
pi_SaltoI_2<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_2) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_2) $Abundance)
pi_SaltoI_3<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_3) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_3) $Abundance)
pi_SaltoI_4<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_4) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_4) $Abundance)
pi_SaltoI_5<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_5) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_5) $Abundance)
pi_SaltoI_6<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_6) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_6) $Abundance)
pi_SaltoI_7<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_7) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_7) $Abundance)
pi_SaltoI_8<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_8) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_8) $Abundance)
pi_SaltoI_9<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_9) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_9) $Abundance)
pi_SaltoI_10<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_10) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_10) $Abundance)
pi_SaltoI_11<-RelativeAbundFunc (SaltoWinter_11) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (SaltoWinter_11) $Abundance)

#Simulación agua salada invierno
pi_RdlPv_1<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_1) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (RdlPsummer_1) $Abundance)
pi_RdlPv_2<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_2) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (RdlPsummer_2) $Abundance)
pi_RdlPv_3<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_3) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (RdlPsummer_3) $Abundance)
pi_RdlPv_4<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_4) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (RdlPsummer_4) $Abundance)
pi_RdlPv_5<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_5) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (RdlPsummer_5) $Abundance)
pi_RdlPv_6<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_6) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (RdlPsummer_6) $Abundance)
pi_RdlPv_7<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_7) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (RdlPsummer_7) $Abundance)
pi_RdlPv_8<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_8) $Abundance
  /sum(RelativeAbundFunc (RdlPsummer_8) $Abundance)
pi_RdlPv_9<-RelativeAbundFunc (RdlPsummer_9) $Abundance

```

```

    /sum(RelativeAbundFunc(RdlPsummer_9)$Abundance)
pi_RdlPv_10<-RelativeAbundFunc(RdlPsummer_10)$Abundance
    /sum(RelativeAbundFunc(RdlPsummer_10)$Abundance)
pi_RdlPv_11<-RelativeAbundFunc(RdlPsummer_11)$Abundance
    /sum(RelativeAbundFunc(RdlPsummer_11)$Abundance)

#HRMA observado correspondiente a cada ecotipo en determinada
#condición ambiental, claculado como el promedio ponderado

#Agua dulce verano
HRMA_SaltoV_1<- J1*pi_SaltoV_1[1] + J2*pi_SaltoV_1[2] + J3*pi_SaltoV_1[3]
HRMA_SaltoV_2<- J1*pi_SaltoV_2[1] + J2*pi_SaltoV_2[2] + J3*pi_SaltoV_2[3]
HRMA_SaltoV_3<- J1*pi_SaltoV_3[1] + J2*pi_SaltoV_3[2] + J3*pi_SaltoV_3[3]
HRMA_SaltoV_4<- J1*pi_SaltoV_4[1] + J2*pi_SaltoV_4[2] + J3*pi_SaltoV_4[3]
HRMA_SaltoV_5<- J1*pi_SaltoV_5[1] + J2*pi_SaltoV_5[2] + J3*pi_SaltoV_5[3]
HRMA_SaltoV_6<- J1*pi_SaltoV_6[1] + J2*pi_SaltoV_6[2] + J3*pi_SaltoV_6[3]
HRMA_SaltoV_7<- J1*pi_SaltoV_7[1] + J2*pi_SaltoV_7[2] + J3*pi_SaltoV_7[3]
HRMA_SaltoV_8<- J1*pi_SaltoV_8[1] + J2*pi_SaltoV_8[2] + J3*pi_SaltoV_8[3]
HRMA_SaltoV_9<- J1*pi_SaltoV_9[1] + J2*pi_SaltoV_9[2] + J3*pi_SaltoV_9[3]
HRMA_SaltoV_10<- J1*pi_SaltoV_10[1] + J2*pi_SaltoV_10[2] + J3*pi_SaltoV_10[3]
HRMA_SaltoV_11<- J1*pi_SaltoV_11[1] + J2*pi_SaltoV_11[2] + J3*pi_SaltoV_11[3]

#Agua dulce invierno
HRMA_SaltoI_1<- J1*pi_SaltoI_1[1] + J2*pi_SaltoI_1[2] + J3*pi_SaltoI_1[3]
HRMA_SaltoI_2<- J1*pi_SaltoI_2[1] + J2*pi_SaltoI_2[2] + J3*pi_SaltoI_2[3]
HRMA_SaltoI_3<- J1*pi_SaltoI_3[1] + J2*pi_SaltoI_3[2] + J3*pi_SaltoI_3[3]
HRMA_SaltoI_4<- J1*pi_SaltoI_4[1] + J2*pi_SaltoI_4[2] + J3*pi_SaltoI_4[3]
HRMA_SaltoI_5<- J1*pi_SaltoI_5[1] + J2*pi_SaltoI_5[2] + J3*pi_SaltoI_5[3]
HRMA_SaltoI_6<- J1*pi_SaltoI_6[1] + J2*pi_SaltoI_6[2] + J3*pi_SaltoI_6[3]
HRMA_SaltoI_7<- J1*pi_SaltoI_7[1] + J2*pi_SaltoI_7[2] + J3*pi_SaltoI_7[3]
HRMA_SaltoI_8<- J1*pi_SaltoI_8[1] + J2*pi_SaltoI_8[2] + J3*pi_SaltoI_8[3]
HRMA_SaltoI_9<- J1*pi_SaltoI_9[1] + J2*pi_SaltoI_9[2] + J3*pi_SaltoI_9[3]
HRMA_SaltoI_10<- J1*pi_SaltoI_10[1] + J2*pi_SaltoI_10[2] + J3*pi_SaltoI_10[3]
HRMA_SaltoI_11<- J1*pi_SaltoI_11[1] + J2*pi_SaltoI_11[2] + J3*pi_SaltoI_11[3]

#Agua salada verano
HRMA_RdlPv_1<- J1*pi_RdlPv_1[1] + J2*pi_RdlPv_1[2] + J3*pi_RdlPv_1[3]
HRMA_RdlPv_2<- J1*pi_RdlPv_2[1] + J2*pi_RdlPv_2[2] + J3*pi_RdlPv_2[3]
HRMA_RdlPv_3<- J1*pi_RdlPv_3[1] + J2*pi_RdlPv_3[2] + J3*pi_RdlPv_3[3]
HRMA_RdlPv_4<- J1*pi_RdlPv_4[1] + J2*pi_RdlPv_4[2] + J3*pi_RdlPv_4[3]
HRMA_RdlPv_5<- J1*pi_RdlPv_5[1] + J2*pi_RdlPv_5[2] + J3*pi_RdlPv_5[3]
HRMA_RdlPv_6<- J1*pi_RdlPv_6[1] + J2*pi_RdlPv_6[2] + J3*pi_RdlPv_6[3]
HRMA_RdlPv_7<- J1*pi_RdlPv_7[1] + J2*pi_RdlPv_7[2] + J3*pi_RdlPv_7[3]
HRMA_RdlPv_8<- J1*pi_RdlPv_8[1] + J2*pi_RdlPv_8[2] + J3*pi_RdlPv_8[3]
HRMA_RdlPv_9<- J1*pi_RdlPv_9[1] + J2*pi_RdlPv_9[2] + J3*pi_RdlPv_9[3]
HRMA_RdlPv_10<- J1*pi_RdlPv_10[1] + J2*pi_RdlPv_10[2] + J3*pi_RdlPv_10[3]
HRMA_RdlPv_11<- J1*pi_RdlPv_11[1] + J2*pi_RdlPv_11[2] + J3*pi_RdlPv_11[3]

#Agua salada invierno
HRMA_RdlPw_1<- J1*pi_RdlPw_1[1] + J2*pi_RdlPw_1[2] + J3*pi_RdlPw_1[3]
HRMA_RdlPw_2<- J1*pi_RdlPw_2[1] + J2*pi_RdlPw_2[2] + J3*pi_RdlPw_2[3]
HRMA_RdlPw_3<- J1*pi_RdlPw_3[1] + J2*pi_RdlPw_3[2] + J3*pi_RdlPw_3[3]
HRMA_RdlPw_4<- J1*pi_RdlPw_4[1] + J2*pi_RdlPw_4[2] + J3*pi_RdlPw_4[3]
HRMA_RdlPw_5<- J1*pi_RdlPw_5[1] + J2*pi_RdlPw_5[2] + J3*pi_RdlPw_5[3]
HRMA_RdlPw_6<- J1*pi_RdlPw_6[1] + J2*pi_RdlPw_6[2] + J3*pi_RdlPw_6[3]
HRMA_RdlPw_7<- J1*pi_RdlPw_7[1] + J2*pi_RdlPw_7[2] + J3*pi_RdlPw_7[3]
HRMA_RdlPw_8<- J1*pi_RdlPw_8[1] + J2*pi_RdlPw_8[2] + J3*pi_RdlPw_8[3]
HRMA_RdlPw_9<- J1*pi_RdlPw_9[1] + J2*pi_RdlPw_9[2] + J3*pi_RdlPw_9[3]

```

```

HRMA_RdlPw_10<- J1*pi_RdlPw_10[1] + J2*pi_RdlPw_10[2] + J3*pi_RdlPw_10[3]
HRMA_RdlPw_11<- J1*pi_RdlPw_11[1] + J2*pi_RdlPw_11[2] + J3*pi_RdlPw_11[3]

#Luego de generar las curvas de melting para las diferentes condiciones
#ambientales se realiza el CRAT funcional (ver más adelante)

#Ecotipos con la misma preferencia ambiental#

# Genotipo_1
Sigma1_igual<-matrix(c(60, 0.6, 0.6, 60), 2)
Sigma1_igual
Mu1_igual<- c(15,15) # Temp-Sal
bivn1_igual <- mvrnorm(1000, mu = Mu1_igual, Sigma = Sigma1_igual)

# Genotipo_2
Sigma2_igual<-matrix(c(60, 0.6, 0.6, 60), 2)
Sigma2_igual
Mu2_igual<- c(15,15) # Temp-Sal
bivn2_igual <- mvrnorm(1000, mu = Mu2_igual, Sigma = Sigma2_igual)

# Genotipo_3
Sigma3_igual<-matrix(c(60, 0.6, 0.6, 60), 2)
Sigma3_igual
Mu3_igual<- c(15,15) # Temp-Sal
bivn3_igual <- mvrnorm(1000, mu = Mu3_igual, Sigma = Sigma3_igual)

#Luego de generar los genotipos con las mismas preferencias ambientales continuo
#con el mismo procedimiento anterior a partir de la generación de las densidades
#de Kernel, hasta llegar a realizar el CART funcional (ver más adelante)

#CART funcional#

source("CART_funcional.R")
library(rpart)
library(fda)

#Cargo la tabla con la información de las curvas de melting del HRMA de cada
#muestra

RFU<-read.table("RFU_norm_CO_2.csv", header=TRUE, dec=".", sep=",")
temp = RFU[,1]

#Cargo la tabla con la información de las variables ambientales para cada
#muestra

amb = read.table("amb.csv",header=TRUE, dec=".", sep=",")

#Creo las bases#
bases = create.bspline.basis(temp,norder=4)
bases
plot(bases)

#Creo las funtional data object#
datay = cbind(temp,t(RFU))

```

```

datafun_T = Data2fd (temp, datay[,-1], basisobj=bases)
plot(datafun)
datafun$coefs

#Saco los coeficientes, preparo datos#
newcoef = as.matrix(t(datafun$coefs))

#cart#
form<-as.formula( paste("newcoef ~ ",paste(names(amb),collapse="+")) )

mod_hrma= rpart(form,data=amb,method=mamet, control=rpart.control
(cp=0.0001,xval=10,minbucket=6,axsurrogate=0,minsplitt=2))
mod_hrma
summary(mod_hrma)
plot(mod_hrma)

#Loop para calcular el error del arbol y el cp óptimo

#Genero una función para guardar los datos de las iteraciones

cv.rpart = function(rp,xtrain,ncv=10,pl=F) {

  xp0 <-xpred.rpart(rp,xval=ncv, return.all=TRUE)
  vals = rp$scptable[,1:2]
  xerr = NULL
  for(j in 1:dim(xp0)[2])
    xerr[j] = mean((xtrain - xp0[,j,])^2 )
  print(vals)
  if (pl) plot(vals[,1],xerr,type="l")
  posopt = which.min(xerr)
  vals[posopt,]
}

#Loop

K=100
err= matrix(NA, nrow=K,ncol=4)
n = nrow(amb)
for(k in 1:K) {
  print(k)
  ind = sample(nrow(amb),nrow(amb)/3)

  Ytrain = newcoef[-ind,]
  Xtrain = amb[-ind,]
  Ytest = newcoef[ind,]
  Xtest = amb[ind,]
  form<-as.formula( paste("Ytrain ~ ",paste(names(Xtrain_B),
collapse="+")) )
  modelo= rpart(form,data=Xtrain,method=mamet,
control=rpart.control(cp=0.0001,xval=10,minbucket=1,maxsurrogate=0,minsplitt=2))
  rescv = cv.rpart(modelo,Xtrain)
  err[k,1:2] = rescv
  ar = prune.rpart(modelo,cp=rescv[1])
  predtrain= predict (ar,Xtrain,type = "matrix")
  err[k,3] = sqrt(mean((Ytrain - predtrain)^2 ))
  predtest= predict (ar,Xtest,type="matrix")
  err[k,4] = sqrt(mean((Ytest - predtest)^2 ))
}

```

```

}

summary(err)

#Mejor árbol
ar = prune.rpart(hrma_rpart_T,cp=cp_optimo)
plot(ar)

#cp_optimo, va a ser el valor medio de los cps obtenidos en las 100 iteraciones.

#Error variando las Y (Shuffle)

K=100
err= matrix(NA, nrow=K,ncol=4)
n = nrow(amb)
errShuffle<-numeric()
contador=0
for(k in 1:K) {
print(k)
  ind = sample(nrow(amb),nrow(amb)/3)

  Ytrain = newcoef[-ind,]
  Xtrain = amb[-ind,]
  Ytest = newcoef[ind,]
  Xtest = amb[ind,]

  form<-as.formula( paste("Ytrain ~ ",paste(names(Xtrain),
collapse="+"))
  modelo= rpart(form,data=Xtrain,method=mamet,
control=rpart.control(cp=0.0001,xval=10,minbucket=1,maxsurrogate=0,minsplit=2))

  rescv = cv.rpart(modelo,Xtrain)
  err[k,1:2] = rescv
  ar = prune.rpart(modelo,cp=rescv[1])

  predtrain= predict (ar,Xtrain,type = "matrix")
  err[k,3] = sqrt(mean((Ytrain - predtrain)^2 ))
  predtest= predict (ar,Xtest,type = "matrix")
  err[k,4] = sqrt(mean((Ytest - predtest)^2 ))

  for(j in 1:20){
  contador=contador+1
  Shuffle<-sample(1:nrow(Xtest),replace=FALSE)
  XtestShuffle<-Xtest[Shuffle,]
  predtestShuffle= predict (ar,XtestShuffle,type = "matrix")
  errShuffle[contador] = sqrt(mean((Ytest - predtestShuffle)^2 ))
  }

}

#Comparo los dos errores, del árbol óptimo y del árbol cambiando las Y

plot(density(errShuffle))
lines(density(err[,4]),lty=2,col="red")

```

```

#Diferencias biológicas entre las diferentes hojas del árbol
#óptimo

#Cargo la tabla con la información de las variables biológicas para cada hoja
#del árbol

morf_hojas<-read.table("hojas_morfo.csv", header=TRUE, dec=".", sep=",")

#Genero una función para determinar diferencias significativas entre cada hoja,
#en base a el método likelihood ratio test

library(nlme)

gls.var.test<-function(x,group=NULL) {

if(is.null(group)){ data.gls<-x; colnames(data.gls)<-c("x","group")} else
  data.gls<-data.frame(x,group)
if(any(!is.finite(data.gls[,1]))){ data.gls<-
  data.gls[which(is.finite(data.gls[,1])),]; warning("there were NaNs in the
  original x data")}# Saca los NaN
if(any(!is.finite(data.gls[,2]))){ data.gls<-
  data.gls[which(is.finite(data.gls[,2])),]; warning("there were NaNs in the
  original group data")}# Saca los NaN

modHeteroVar = gls(x~group, data=data.gls, weights = varIdent(form = ~1|group),
  method="ML") #varianza heterogénea
modHomoVar = gls(x~group, data=data.gls, method="ML") #varianza homogénea
modEqualMean = gls(x~1, data=data.gls, weights = varIdent(form = ~1|group),
  method="ML")#misma media entre los grupos pero con diferente varianza,
list(VarTest=anova(modHeteroVar,modHomoVar),
MeanTest=anova(modEqualMean,modHeteroVar))#Evaluar el loglikelihood ratio
  #test. p>0.05
}

x<-data.frame(var_y, grupo)
gls.var.test(x)

#post-hoc test
require(PMCMR)
posthoc.kruskal.nemenyi.test(var_y~grupo)

#var_y, variable continua biológica y/o ambiental.
#grupo, variable categórica entre las cuales se va a evaluar la var_y.

```

3.1.3. Capítulo 3

```

#Cargo la tabla de datos#

var<-read.table("todos_los_datos.csv", header=TRUE, dec=".", sep=",")

library(nlme)
library(lme4)

```

```

#Utilizando la función generada anteriormente(gls.var.test) se
determinan las diferencias significativas entre los sitios de
muestro de variables ambientales y biológicas

#Para todas las correlaciones se utilizó la siguiente función#
cor.test(var_1,var_2,method="spearman",data=var)

#var_1 y var_2 variables ambientales y/o biológicas.

#Modelos lineales generalizados (GLM) #
mod1<-glm(var_y~var_x1+var_x2+var_x3+...+var_xn,data=var,
          family=Gamma(link = "log"))

#var_y, variable de respuesta, abundancia y expresión de genes mcy.
#var_xn, variables explicativas, en este caso variables ambientales.

mod_step<-step(mod1, direction="backward")

summary(mod_step)

#CART funcional, mismo procedimiento que en el Capítulo 2#

#Análisis de las OTUs#

#Cargo la tabla cruda de la abundancia de las OTUs para cada muestra
data_otu<-read.table("otu_table.csv", header=TRUE, dec=".", sep=","")

library(MASS)
library(labdsv)

#Filtrado de las OTUs
t_data_otu<-t(data_otu[,-1])
otu.sums <- colSums(t_data_otu)
otu.filtered <- t_data_otu[, which (otu.sums > 5)]

#Diversidad alfa#

#Cálculo de la riqueza, índice de Shannon y equitatividad
t_otu_filter<-t(otu.filtered)
colnames(t_otu_filter)
#riqueza
SN1<- specnumber(una muestra)
# índice de Shannon
H1<- diversity(una muestra)
#equitatividad
E1<- H1/log(SN1)

#una muestra, uno de los sitios o muestras de la tabla data_otu con la
#abundancia de las otus

#Diversidad beta#

#Calculo de la abundancia relativa
otu.filtered.relab <-decostand (otu.filtered, "total")*100
rowSums(otu.filtered.relab)

```

```
#Análisis de coordenadas principales
dist.bray<-vegdist(otu.filtered.relab, method = "bray")
pcoa.bray <- pcoa(dist.bray)
biplot(pcoa.bray)

#PERMANOVA
adonis(otu.filtered.relab ~ grupo, method= "bray")
beta_disper<-betadisper(dist.bray, meta$mes)
permutest(beta_disper,pairwise=T, permutations=1000)

#ANOSIM
anosim (otu.filtered.relab, grupo,distance = "bray")

#grupo, variable categórica, en este caso los meses en los que se muestreo o
#los sitios
```

3.1.4. Capítulo 4

```
#Cargo la tabla de datos#
datos<-read.table("datos_exp_sal.csv", header=TRUE, dec="," ,sep="," )

#Para todas las correlaciones se utilizó la siguiente función#
cor.test(var_1,var_2,method="spearman",data=datos)

#var_1 y var_2 variables ambientales y/o biológicas.

#Modelos gls
library(nlme)
mod1<-gls(var_y~1,data=datos, method="ML")
mod2<-gls(var_y~1,data=datos, weights = varIdent(form = ~1|Horas), method="ML")
mod3<-gls(var_y~Tratamiento, data=datos,method="ML")
mod4<-gls(var_y~Tratamiento,data=datos,weights = varIdent(form = ~1|Horas),
method="ML",correlation = corCAR1(form = ~1|Horas))
mod5<-gls(var_y~Tratamiento+Horas,data=datos,weights = varIdent(form = ~1|
Horas), method="ML",correlation = corCAR1(form = ~1|Horas))

#var_y, variable de respuesta, abundancia de genes mcy, expresión de genes mcy y
#concentración de toxinas

#Comparación de modelos
anova(mod1,mod2,mod3,mod4,mod5)
summary(mejor modelo)
```

Apéndice 4

4.1. Actividades académicas realizadas durante el doctorado

4.1.1. Cursos de profundización y posgrado, extracurriculares

2019. "Análisis de datos bioinformáticos para metagenomas y amplicones usando R", responsable: Dr. Eduardo Castro-Nallar, Valparaíso, Chile. Septiembre 2019.

2019. "Introducción a la línea de comando y a la programación para análisis bioinformáticos", responsable: Dr. Andrés Iriarte. Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay. Marzo 2019.

2018. "Introducción a los métodos multivariados", responsable: Dr. Ernesto Vega. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Octubre 2018.

2015. "Estadística Avanzada y Aplicaciones", responsables: Dra. Carolina Crisci y Dr. Mathias Bourel. Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República, Rocha, Uruguay. Abril-Julio 2015.

2014. "Cianobacterias: de los organismos al ecosistema límnic", responsable: Dra. Sylvia Bonilla. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Agosto 2014.

4.1.2. Pasantías de investigación

2018. Pasantía de investigación en la empresa Agua y Saneamientos Argentinos S.A., Buenos Aires, Argentina, bajo la supervisión de la Técnica Carolina González. Objetivo de la pasantía: analizar y cuantificar las diferentes variantes de microcistinas que son producidas por el CMA en experimentos con comunidades naturales. Pasantía financiada por ANII. Fecha estimada de realización: Mayo - Junio de 2018.

2017. Pasantía de investigación en el Instituto de Matemáticas de la Universidad de Marsella, Francia, bajo la supervisión del Dr. Badih Ghattas. Objetivo de la pasantía: desarrollar métodos estadísticos para el estudio de la diversidad de cianobacterias tóxicas utilizando las curvas de *melting* obtenidas con la técnica HRMA y el software libre R.

Pasantía financiada por proyecto ECOS. Fecha estimada: Noviembre - Diciembre de 2017.

2016. Pasantía de investigación en el Instituto de Matemáticas de la Universidad de Marsella, Francia, bajo la supervisión del Dr. Badih Ghattas. Objetivo de la pasantía: aplicar y desarrollar métodos de aprendizaje automático (e.g. CARTs funcionales) para el estudio de la diversidad de cianobacterias utilizando las curvas de *melting* (distribución de fluorescencia) obtenidas con la técnica HRMA y el software libre R. Pasantía financiada por proyecto ECOS. Fecha: Octubre-Noviembre de 2016.

2015. Pasantía de investigación en el Laboratorio de Cianobacterias del Departamento de Biología del la "Escola Superior Luiz de Queiroz", Universidad de San Pablo, Brasil, bajo la supervisión de la Dra. Adriana Sturion Lorenzi y Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira. Objetivo de la pasantía: estudiar la diversidad del Complejo *Microcystis aeruginosa* mediante secuenciación masiva del espaciador intergénico del operón de ficocianina y conocer el efecto de la salinidad sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de microcistinas (genes *mcy*) mediante una aproximación experimental. Pasantía financiada por PEDECIBA-Biología y Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU). Fecha: Julio-Septiembre de 2015.

4.1.3. Actividad profesional en investigación

2019 - a la fecha. Investigadora del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) Nivel Iniciación.

- Cargos de investigador obtenidos por concurso

2016 - a la fecha. Investigador Grado 2 (horas docentes y de investigación) en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Cargo obtenido por concurso de méritos y oposición. Carga horaria: 30 hs semanales.

2015-2016. Investigador Grado 1 (horas docentes y de investigación) en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Cargo obtenido por concurso de méritos y oposición. Carga horaria: 25 hs semanales.

- Investigador responsable de proyectos de investigación

2019 - 2021. Investigador responsable del proyecto titulado: "Mecanismos de ensamblaje de comunidades microbianas acuáticas: aproximación basada en ecotipos". Financiado por

la Agencia Nacional de Investigación, Fondo Clemente Estable Modalidad 2. Carga horaria: 30 hs semanales.

2014-2015. Investigador responsable del proyecto titulado: "Estudio de la distribución de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. y la expresión de genes de toxinas a través del Río Uruguay". Financiado por la Comisión Administradora del Río Uruguay. Carga horaria: 30 hs semanales.

4.1.4. Premios y reconocimientos

2018. Becas de apoyo para la finalización de estudios de posgrado en la Udelar, Doctorado, 2019. Financiado por La Comisión Académica de Posgrado.

2017. Beca para Pasantía en el exterior (pasajes, viáticos y alojamiento). Pasantía de investigación realizada en Noviembre - Diciembre 2017 en el Instituto de Matemáticas de la Universidad de Marsella, Francia, bajo la supervisión del Dr. Badih Ghattas. Beca financiada por proyecto ECOS.

2016. Beca para Pasantía en el exterior (pasajes, viáticos y alojamiento). Pasantía de investigación a realizarse en Julio 2017 en la empresa Agua y Saneamientos Argentinos S.A. Bajo la supervisión de la Técnica Carolina González. Beca financiada por la ANII.

2016. Beca para Pasantía en el exterior (pasajes, viáticos y alojamiento). Pasantía de investigación realizada en Octubre-Noviembre 2016 en el Instituto de Matemáticas de la Universidad de Marsella, Francia, bajo la supervisión del Dr. Badih Ghattas. Beca financiada por proyecto ECOS.

2016 a la fecha. Beca de Doctorado, proyecto titulado: "Dinámica y condicionantes ambientales de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el Río Uruguay-Río de la Plata", realizada en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Beca financiada por la ANII. Orientadora: Dra. Claudia Piccini y co-orientadora: Dra. Carla Kruk.

2015. Mención especial en el marco del Premio Nacional de Microbiología SUM-Biológica 2015. Trabajo titulado: "Dinámica espacio-temporal de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. en el gradiente Río Uruguay-Río de la Plata". Autores: Martínez de la Escalera, G., Segura, A., Kruk, C. y Piccini, C. Otorgado por la Sociedad Uruguaya de Microbiología.

2015. Premio como mejor presentación oral en las "I Jornadas sobre eutrofización y floraciones de algas nocivas en el río Uruguay", Colón, Entre Ríos, Argentina.

2015. Beca para Pasantías de corta duración (pasajes, viáticos y alojamiento). Pasantía de investigación realizada en Julio-Septiembre en el Lab. de Cianobacterias del Departamento de Ciencias Biológicas, Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Univ. de San Pablo, Brasil. Bajo la supervisión de la Dra. Adriana Sturion Lorenzi y Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira. Beca financiada por PEDECIBA-Biología.

2014-2016. Beca de Maestría, proyecto titulado: "Factores ambientales que determinan la proliferación y dispersión de cianobacterias tóxicas en sistemas acuáticos mediante PCR en tiempo real", realizada en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Beca financiada por la ANII. Orientadora: Dra. Claudia Piccini y co-orientadora: Dra. Carla Kruk.

4.1.5. Producción científica

Alcántara, Ignacio; Piccini, Claudia; Segura, Angel; Deus, Susana; González, Carolina; **Martínez de la Escalera, Gabriela**, Kruk, Carla (2018), "Improved biovolume estimation of *Microcystis aeruginosa* colonies: a statistical approach", *Journal of Methods in Microbiology*, volumen: 151, páginas: 20-37.

Kruk, Carla; Segura, Angel; Nogueira, Lucía; Alcántara, Ignacio; Calliari, Danilo; **Martínez de la Escalera, Gabriela**; Carballo, Carmela; Cabrera, Carolina; Sarthou, Florencia; Scavone, Paola; Piccini, Claudia (2017), "A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean", *Harmful Algae*, volumen: 70, páginas: 23-36.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Kruk, Carla; Segura, Angel; Nogueira, Lucía, Alcántara, Ignacio; Piccini, Claudia (2017), "Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient", *Harmful Algae*, volumen: 62, páginas: 73-83.

Batani, Giampiero; Perez, German; **Martínez de la Escalera, Gabriela**; Piccini, Claudia; Fazi, Stefano (2016), "Competition and protist predation are important regulators of riverine bacterial community composition and size distribution", *Journal of Freshwater Ecology*, volumen: 31, páginas: 609-623.

Beamud, Guadalupe; Vico, Paul; Haakonsson, Signe; **Martínez de la Escalera, Gabriela**;

Piccini, Claudia; Brena, Beatriz; Pirez, Macarena; Bonilla, Sylvia (2015), "Influence of UV-B radiation on the fitness and toxin expression of the emerging cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*". *Hydrobiologia*, volumen: 763, páginas: 161-172.

Kruk, Carla; Martínez, Ana; **Martínez de la Escalera, Gabriela**; Trinchin, Romina; Manta, Gastón; Segura, Angel M.; Piccini, Claudia; Brena, Beatriz; Fabiano, Graciela; Pirez, Macarena; Gabito, Lourdes; Alcántara, ignacio; Yannicelli, Beatriz (2019), "Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019", INNOTECH, volumen: 18, páginas: 36-68.

Lepillanca, Facundo; **Martínez de la Escalera, Gabriela**; Bordet, Facundo; O'Ferrel, Inés y Piccini, Claudia (2018), "Detección de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp con distintas preferencias ambientales. Estudio de caso: embalse de Salto Grande", INNOTECH, volumen: 16, páginas: 8-16.

Kruk, Carla; Segura, Angel; Nogueira, Lucía; Carballo, Carmela; **Martínez de la Escalera, Gabriela**; Calliari, Danilo; Ferrari, Graciela; Simoens, Macarena; Cea, Jacqueline; Alcántara, Ignacio; Vico, Paula; Míguez, Diana y Piccini, Claudia (2015), "Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata", INNOTECH, volumen: 10, páginas: 23 - 39.

Bonilla, Sylvia; Haakonsson, Signe; Somma, Andrea; Gravier, Ana; Britos, Anamar; Vidal, Leticia; De León, Lizet; Brena, Beatriz; Pírez, Macarena; Piccini, Claudia; **Martínez de la Escalera, Gabriela**; Chalar, Guillermo; González-Piana, Mauricio; Martigani, Fátima; Aubriot, Luis (2015), "Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay", INNOTECH, volumen: 10, páginas: 9-22.

4.1.6. Presentaciones de trabajos científicos en congresos

- Presentación en formato oral

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2015. "Distribución de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. y expresión de genes de toxinas en el embalse de Salto Grande, río Uruguay". I Jornadas sobre eutrofización y floraciones de algas nocivas en el río Uruguay, Colón, Entre Ríos, Argentina, del 19 al 2 de Agosto de 2015.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Simoens, Macarena; Cea, Jacqueline; Vico, Paula;

Bonilla, Sylvia; Nogueira, Lucía; Segura, Angel; Calliari, Danilo; Míguez, Diana; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2014. "Toxic genotypes of *Microcystis* spp. across a large river-ocean gradient in South America". 15th *International Symposium on Microbial Ecology*, ISME. Seoul, Corea del Sur, 24 al 29 de Agosto de 2014.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Carla; Ghattas, Badih; Piccini, Claudia. 2017. "Diversidad de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el gradiente ambiental Río Uruguay-Río de la Plata". IV Jornadas de Estadística, La Paloma, Rocha, del 27 y 28 de Octubre de 2017.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2016. "Diversidad filogenética del complejo *Microcystis aeruginosa* en el Río Uruguay y Río de la Plata". III Jornadas Interdisciplinarias en Biodiversidad y Ecología. CURE, Rocha, Uruguay. 28 de Noviembre al 2 de Diciembre de 2016.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2016. "Diversidad de genotipos tóxicos de cianobacteria productoras de microcistinas mediante *High Resolution Melting Analysis*". II Encuentro Nacional de Jóvenes Microbiólogos-SUM, IIBCE, Montevideo, Uruguay, 2 y 3 de Junio de 2016.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2015. "Dinámica espacio-temporal de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. en el gradiente Río Uruguay-Río de la Plata". III Jornadas de Estadística, La Paloma, Rocha, 5 al 7 de Noviembre de 2015.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Calliari, Danilo; Míguez, Diana; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2014. "Variación espacial de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. en el sistema Río Uruguay-Río de la Plata". II Jornadas Interdisciplinarias en Biodiversidad y Ecología: "Acercando producción y aplicación del conocimiento". CURE, Rocha, 3 al 5 de Diciembre de 2014.

- Presentación en formato póster

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Ghattas, Badih; Carla; Piccini, Claudia. 2018. "Diversidad de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el gradiente ambiental Río Uruguay-Río de la Plata". XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, ALAM 2018. Santiago, Chile, 13 al 16 de Noviembre de 2018.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2016.

"Dynamics of microcystin toxic genotypes in the environmental gradient Río Uruguay-Río de la Plata, South America". 17th International Conference on Harmful Algae, ICHA. Florianópolis, Brasil, 9 al 14 de Octubre de 2016.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Kruk, Carla; Segura, Angel; Piccini, Claudia. 2018. "Distribución, diversidad y toxicidad de *Microcystis* spp. en el embalse de Salto Grande, río Uruguay". III Encuentro Nacional de Jóvenes Microbiólogos. Montevideo, 31 de mayo al 1 de Junio de 2018.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Carla; Deus, Susana; Piccini, Claudia. 2017. "Efecto de la salinidad sobre el complejo *Microcystis aeruginosa*". Primeras Jornadas Científicas "Profesor Clemente Estable". 26 y 27 de Septiembre de 2017.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Angel; Kruk, Carla; Deus, Susana; Piccini, Claudia. 2017. "Efecto de la salinidad sobre el complejo *Microcystis aeruginosa*". XII Encuentro Nacional de Microbiólogos. Montevideo, 12 al 14 de Mayo de 2017.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Segura, Ángel; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2015. "Distribución de cianobacterias tóxicas en el sistema Río Uruguay-Río de la Plata". XI Encuentro Nacional de Microbiólogos, Montevideo, 15 y 16 de Junio de 2015.

Martínez de la Escalera, Gabriela; Simoens, Macarena; Cea, Jacqueline; Vico, Paula; Bonilla, Sylvia; Nogueira, Lucía; Segura, Ángel; Calliari, Danilo; Míguez, Diana; Kruk, Carla; Piccini, Claudia. 2014. "Distribución de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. en el gradiente Río Uruguay-Río de la Plata". I Encuentro Nacional de Jóvenes Microbiólogos-SUM, IIBCE, Montevideo, 9 y 10 de Octubre de 2014.

4.1.7. Experiencia docente

2019. Participación como docente de práctico en el curso de posgrado en Veterinaria y PEDECIBA: "El microbioma en la salud, la producción y el bienestar" en Facultad de Veterinaria e Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Responsables: Drs Juan Pablo Damián, José Roberto Sotelo Silveira y Pablo Zunino.

2018. Participación como docente invitado en el curso de posgrado "Estadística avanzada y aplicaciones" en el Centro Universitario Regional Este, sede Rocha. Responsables: Dr. Angel Segura y Dra. Carolina Crsci.

2017. Participación como docente invitado en el curso de posgrado "Estadística avanzada y aplicaciones" en el Centro Universitario Regional Este, sede Rocha. Responsables: Dr. Angel Segura y Dra. Carolina Crsci.

2016. Colaborador en el curso de posgrado PEDECIBA: "Respuesta de Ecosistemas Acuáticos a Impactos Antropogénicos" en Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. Responsable: C. Piccini. 06 de septiembre al 11 de noviembre. Carga horaria total destinada a la docencia: 30 horas.

2016. Participación como docente de práctico en el curso de posgrado en Veterinaria y PEDECIBA: "Métodos moleculares de diagnóstico e identificación aplicados al estudio de microorganismos de interés en salud animal" en Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. Responsables: P. Zunino, C. Piccini, K. Antúnez. 01 de agosto al 09 de septiembre. Carga horaria total destinada a la docencia: 16 horas.

2015. Participación como docente de práctico en el curso: "IV Escuela Regional de Microbiología" en Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. Responsable: Dra. K. Antúnez, C. Piccini, P. Zunino. 19 al 30 de octubre. Carga horaria total destinada a la docencia: 20 horas.

2014. Participación como docente de práctico en el curso de posgrado en Veterinaria y PEDECIBA: "Métodos moleculares aplicados al estudio de microorganismos de interés en salud animal" en Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. Responsables: P. Zunino, C. Piccini, K. Antúnez. 03 de noviembre al 01 de diciembre. Carga horaria total destinada a la docencia: 16 horas.

4.1.8. Formación de recursos humanos

2017 - 2019. Cotutor de tesis de grado de la Licenciatura en Biología del estudiante Facundo Lepillanca. "Variables ambientales que determinan la abundancia de cianobacterias tóxicas en el embalse de Salto Grande (Río Uruguay)". Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura.

4.1.9. Actividades de extensión

2018. Participación en la Semana de la Ciencia y la Tecnología. Charla titulada: "Bacterias al rescate!". Colegio Sagrado Corazón, Paso Carrasco, 21 de junio de 2018; y Colegio San Gabriel, Colonia, 26 de junio de 2018.

2017. Participación en la Semana de la Ciencia y la Tecnología. Charla titulada: "Cianobacterias y su amenaza a la calidad del agua". Liceo N°1 de Juan Lacaze, Colonia, 06 de junio de 2017; y Liceo de Shangrilá, Canelones, 12 de junio de 2017.

2017. Charla de divulgación de trabajos de investigación del grupo Ecología Acuática Microbiana del Departamento de Microbiología del IIBCE en el Liceo Zorrilla de los Hermanos Maristas.

2017-2018. Integrante de equipo en proyecto de Popularización de la Ciencia titulado: "Un viaje al mundo microscópico", financiado por la Agencia de Investigación e Innovación. Responsable científico: Dra. Vanesa Amarelle. Carga horaria: 5 hs semanales.

2016. Participación del stand interactivo del IIBCE en el Foro Abierto de Ciencias Latinoamérica y el Caribe (CILAC), LATU, Montevideo, Uruguay.

2016. Charla de divulgación de trabajos de investigación del grupo Ecología Acuática Microbiana del Departamento de Microbiología del IIBCE en el Liceo Zorrilla de los Hermanos Maristas.

2016. Divulgación oral de trabajos de investigación: "Cianobacterias y su amenaza a la calidad del agua", en la Semana de la Ciencia y la Tecnología. Sarandí Grande, Mayo 2016.

2015. Divulgación oral de trabajos de investigación: "Cianobacterias, ¿Qué son, como se detectan y cómo se distribuyen?", en las jornadas: "Cultivando Agua Buena", Bella Unión, Noviembre 2015. Coordinadores: Comisión Técnica Mixta de Salto Grande.

2012 a la fecha. Participación en "Visitas Escolares" de instituciones educativas públicas y privadas, realizadas quincenalmente en el IIBCE.

2011 a la fecha. Participación en la organización de actividades del Departamento de Microbiología para el evento "IIBCE abierto".

Apéndice 5

Trabajo publicado en la revista internacional Harmful Algae correspondiente al Capítulo 1 de la tesis:

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

Harmful Algae 62 (2017) 73–83



Contents lists available at ScienceDirect

Harmful Algae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/hal



Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient



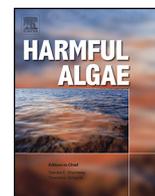
Gabriela Martínez de la Escalera^a, Carla Kruk^{b,c}, Angel M. Segura^d, Lucía Nogueira^c, Ignacio Alcántara^{a,c}, Claudia Piccini^{a,*}

^a Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay

^b Ecología Funcional de Sistemas Acuáticos, CURE, Rocha, Universidad de la República, Uruguay

^c Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

^d Polo de Desarrollo Universitario, Modelización y Análisis de Recursos Naturales, CURE, Rocha, Universidad de la República, Uruguay



Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient



Gabriela Martínez de la Escalera^a, Carla Kruk^{b,c}, Angel M. Segura^d, Lucía Nogueira^c, Ignacio Alcántara^{a,c}, Claudia Piccini^{a,*}

^a Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay

^b Ecología Funcional de Sistemas Acuáticos, CURE, Rocha, Universidad de la República, Uruguay

^c Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

^d Polo de Desarrollo Universitario, Modelización y Análisis de Recursos Naturales, CURE, Rocha, Universidad de la República, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2016

Received in revised form 14 November 2016

Accepted 16 November 2016

Available online xxx

Keywords:

Cyanobacteria blooms

Microcystis aeruginosa complex

Toxic genotypes

mcy

qPCR

ABSTRACT

Bloom-forming species belonging to *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) are the most commonly reported worldwide. MAC blooms are composed by toxic and non-toxic genotypes and the environmental conditions favouring the dominance of toxic genotypes are still a matter of debate among the scientific community. In this study, we evaluated the distribution of toxic MAC genotypes along a seasonal cycle and over an environmental gradient spanning 800 km, from a eutrophic freshwater reservoir in Río Uruguay to marine water in the outer limit of Río de la Plata. Abundance of four *mcy* genes, *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* and *mcyJ* was determined by qPCR and used as a proxy of abundance of toxic MAC genotypes. All the *mcy* genes were detected through the seasonal cycle at all sampling sites, being systematically higher in the freshwater reservoir and decreasing towards the marine site. The highest toxic genotype abundance was found during the austral summer months. According to generalized linear regressions and random forest models, temperature and conductivity were the most relevant explanatory variables. This suggests that although toxic MAC genotypes grow optimally in freshwater, they are also able to tolerate the high-salinity and low temperature conditions found in estuarine and marine waters. This ability to resist harsh conditions impose a health risk and a management challenge. To our knowledge, this is the first report addressing several *mcy* genes in a broad gradient that includes a wide array of different environmental conditions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The frequency and intensity of cyanobacterial blooms has increased in recent decades in freshwater and marine ecosystems (Chorus and Bartram, 1999; Paerl and Huisman, 2008). Cyanobacterial blooms alter ecosystem function, decrease water transparency, oxygen concentration and biodiversity and generate taste and odour problems (Huisman et al., 2006; Ibelings and Mur, 1992). The main concern regarding the presence of cyanobacteria blooms is the ability of some species to produce toxins (cyanotoxins) that can affect humans and animals (Briand et al., 2003; Codd et al., 2005).

Microcystis is the most commonly reported bloom-forming cyanobacterial genus in lakes and reservoirs worldwide (De Leon

and Yunes, 2001; González-Piana et al., 2011; Huisman and Hulot, 2005; O'Neil et al., 2012; Paerl and Otten, 2013; Srivastava et al., 2013) *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) includes all *Microcystis* species that were unified based on the intergenic transcribed spacer sequences (ITS) (Otsuka et al., 2001, 1999). MAC species produce high density scums and have the potential to produce microcystin, a powerful hepatotoxin with more than 100 variants (Puddick et al., 2014) that can cause serious liver diseases (Azevedo et al., 2002; Dittmann and Wiegand, 2006; Milutinović et al., 2003). Microcystins are one of the most common toxins found in aquatic ecosystems and can be produced by a diverse range of cyanobacteria other than MAC, such as species of *Dolichospermum*, *Nostoc* or *Planktothrix* (Rinehart et al., 1994; Sivonen, 1996).

Despite MAC species share morphological traits and ecological preferences (Kruk and Segura, 2012; Reynolds et al., 2002), their blooms often consist of mixtures of microcystin-producing (hereafter toxic genotype) and non-producing (hereafter non-toxic genotype) populations (Kaebernick and Neilan, 2001;

* Corresponding author.

E-mail address: cpiccini@iibce.edu.uy (C. Piccini).

Kurmayer and Kutzenberger, 2003; Vezie et al., 1998). Toxic genotypes synthesize microcystins via non-ribosomal peptide synthesis (NRPS) and polyketide synthase (PKS) modules (Dittmann et al., 1997; Tillett et al., 2000). Ten genes spanning 55 kb have been described as involved in microcystin production in several species, *mcyA-J* (Tillett et al., 2000). Multiple mechanisms have been proposed to explain the production of cyanotoxins, such as those related to biological interactions and communication, protection against herbivory and competition (Lei et al., 2015; Schatz et al., 2005). Further, it has been suggested that since microcystin synthesis would involve high energetic costs, toxic genotypes would be favored in environments where resources are highly available (Kardinaal et al., 2007a, 2007b; Lei et al., 2015). The stimulation effect exerted by high temperature and high nutrients concentration on the development of MAC blooms, as well the negative effect of high salinity and high water flux have been thoroughly demonstrated (Harke et al., 2016; O'Neil et al., 2012). It is also clear that within the ranges of environmental variables that enhance MAC, some combinations can differentially affect the relative abundance of different genotypes (O'Neil et al., 2012). However, information regarding the specific variables that are responsible for the predominance of MAC toxic genotypes is still lacking.

Several field studies have addressed the relationship between *mcy* genes and environmental variables. For example, positive effects of total nitrogen and/or phosphorus were found for *mcy* abundance (i.e. *mcyA*, *mcyB*, *mcyE*, *mcyJ*) (Guedes et al., 2014; Joung et al., 2011; Te and Gin, 2011; Xu et al., 2010; Yoshida et al., 2007), while others found a negative effect (Rinta-Kanto et al., 2009). Related to temperature, it has been shown that toxic genotypes, quantified as *mcyD* and *mcyJ* abundance, increased at higher temperature (10–30 °C) (Davis et al., 2009; Joung et al., 2011), although in some cases no temperature effect was found (Guedes et al., 2014; Rinta-Kanto et al., 2009; Te and Gin, 2011; Xu et al., 2010). Moreover, a positive relationship between turbidity and *mcy* genes has been reported (i.e. *mcyE*, *mcyB* and *mcyJ*) (Joung et al., 2011; Te and Gin, 2011; Xu et al., 2010). On the other hand, culture-based studies demonstrated the dominance of toxic genotypes (*mcyB* abundance) under different light intensities (35 and 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Lei et al., 2015). Tonk et al. (2007) reported salinity as an environmental variable affecting the toxicity of MAC species in experimental assays; they found that microcystin cell quotas decreased at salinities above 10 g L^{-1} and proposed that the presence of toxic genotypes and toxin production would be negatively affected by stress conditions, such as high salinity (Tonk et al., 2007). On the other hand, field studies did not find any association between salinity (measured as conductivity) and *mcyE* gene abundance (Te and Gin, 2011).

The link between the presence of *mcy* genes and their expression in nature is just beginning to be explored (i.e. Ngwa et al., 2014). Based on experimental evidence, (Sevilla et al., 2008) reported a positive correlation between *mcyD* expression and microcystin-LR in *M. aeruginosa* PCC7806. On the contrary, Ngwa et al. (2014) found a weak correlation between *mcyE* expression and microcystin concentration in laboratory and field studies.

In summary, although there is an agreement about the influence of environmental variables on the dominance of toxic genotypes in freshwater ecosystems, their specific role and the extent of their influence is still unknown. Further, most of the studies addressing the abundance of toxic genotypes by qPCR of *mcy* genes usually assess just one or two of them, which owing to the bias imposed by primer design may not cover all the possible genetic variability. Thus, responses assessed through a single *mcy* gene can be biased to those populations carrying the genetic variant target by the primers, and this might explain some

contradictory findings (Ngwa et al., 2014; Rinta-Kanto et al., 2009; Te and Gin, 2011; Xu et al., 2010).

The aim of this study was to evaluate the effects of environmental variables in the spatial and temporal dynamics of toxic genotypes of MAC in a wide environmental gradient (Rio Uruguay-Rio de la Plata; Fig. 1). The strategy involved bimonthly samplings in an 800 km gradient from freshwater to marine water and quantification of four *mcy* genes (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* and *mcyJ*) by real-time PCR (qPCR) along with in situ measurement of abiotic variables (wind intensity, water temperature, conductivity, turbidity, total nitrogen and phosphorus) and records of phytoplankton community structure.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The study area covered an extension of ca. 800 km, from Salto Grande reservoir in Río Uruguay (31° 11' latitude, 57° 52' longitude) to Punta del Este (34° 57' latitude, 55° 02' longitude), at the marine end of Río de la Plata estuary (Fig. 1). Six sites were sampled every two months during one year (from January 2013 to March 2014) (Fig. 1). At each site water samples were taken from two different locations, one next to the coast (0.01–0.5 km) and one at 2.4–7.7 km off shore. A total of 72 water samples were evaluated.

2.2. Samples collection and measurement of environmental variables

Subsurface water samples were collected with Niskin bottles for laboratory analysis of *mcy* genes, phytoplankton community structure and morphology, nutrients and LR-microcystin concentration. Water samples for DNA extraction were stored on ice during sampling (ca. 4 h) and once arrived to the laboratory they were immediately filtered and filters were stored at –20 °C. Phytoplankton samples for microscopic analyses were fixed in acid Lugol solution. Air temperature (°C) and wind intensity (ms^{-1}) were measured at each sampling site. Water temperature (°C), conductivity (mS cm^{-1}) and turbidity (NTU) were measured at the water subsurface using a multiparameter probe (Horiba multiparameter sensor). Total concentration of nitrogen and phosphorus were determined using the ISO/TR 11905-2 and Lachat QuikChem 31-115-01-3-D methods, respectively. Microcystin-LR was quantified by HPLC with diode array detector PEC (ISO, 2005; Lawton et al., 1994). For chlorophyll-a extraction 50–200 ml water were filtered through 0.7 μm Whatman GF/F, and filters were immediately frozen (–20 °C) until processing. Chlorophyll-a concentrations (mg L^{-1}) were determined after extraction with 95% ethanol for 24 hs at 4 °C in the dark (Jespersen and Christoffersen, 1987). A plankton net with 115 μm -size mesh (opening area $\sim 8000 \text{ cm}^2$), which was dragged for ca. 2 min at a speed of one knot was used to detect the presence or absence of MAC colonies through microscopical inspection based on morphological characteristics. Organisms were assigned as MAC when coccoid cells having a similar size (3.5 to 5 μm diameter) formed large, mucilage-embedded colonies (Komárek and Komárková, 2002). The information about the presence or absence of MAC colonies retrieved from the 115 μm -size mesh was complemented with the data obtained from the Lugol-fixed samples used for phytoplankton determination. Thus, presence or absence of MAC colonies in the whole dataset was used for further analyses.

2.3. Phytoplankton composition, abundance and biovolume estimations

Phytoplankton abundance (organisms mL^{-1}) was estimated from inverted microscope counts using settling chambers

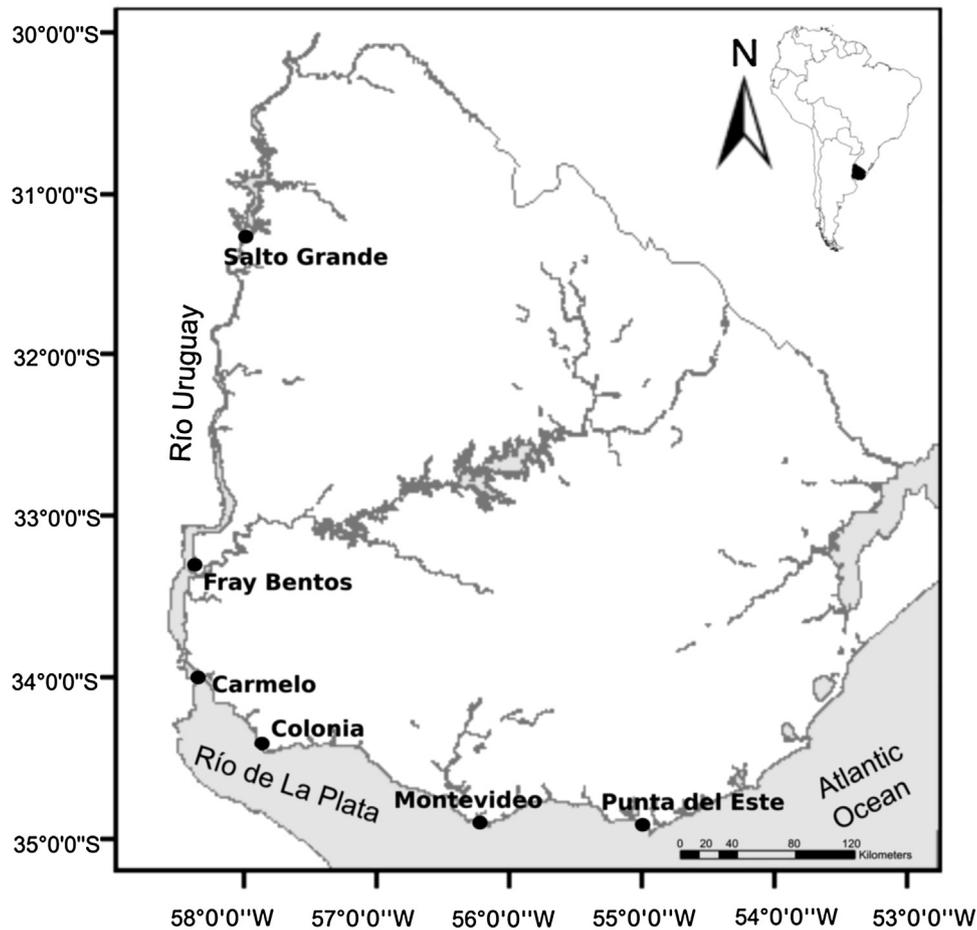


Fig. 1. Map of Uruguay showing the Río Uruguay–Río de la Plata gradient. Sampling sites are shown as black circles: Salto Grande, Fray Bentos, Carmelo, Colonia, Montevideo and Punta del Este.

(Utermöhl, 1958). Samples were examined at several magnifications (100–1000 \times) and counted until reaching at least 100 organisms of the most frequent species (Lund et al., 1958). Organism dimensions were measured in order to estimate volume (V , μm^3) using geometrical approximations (Hillebrand et al., 1999). Measurements and calculations were obtained for each organism in each sample. The biovolume of phytoplankton populations at each station was calculated by multiplying mean individual volume in the corresponding sampling station by its abundance. Phytoplankton species were identified and classified into potential microcystin-producers or non microcystin-producers according to their taxonomic affiliation and to literature-based information.

2.4. DNA extraction

For DNA extraction, 250–300 ml of the water sample were filtered through 0.22 μm sterile polycarbonate membrane (Milipore), which were immediately frozen at -20°C until processing. Procedures for nucleic acid extraction were performed as describe by (Martínez de la Escalera et al., 2014). The concentration and purity of DNA were determined spectrophotometrically at 260 and 280 nm (NanoDrop), and DNA samples were stored at -20°C .

2.5. Quantitative PCR (qPCR)

Four genes belonging to the two operons involved in the microcystin synthesis were quantified by qPCR, *mcyB* (operon *mcyABC*) (Tooming-Klunderud et al., 2008) and *mcyD*, *mcyE*, *mcyJ* (operon *mcyDEFGHIJ*) (Kaebernick et al., 2002). Since we used

primers from the literature, which are based on MAC species from other latitudes, we decided to quantify four *mcy* genes to ensure the detection of most of the toxic genotypes and to avoid losing information. Two microlitres of DNA extracts from each sample (ca. 50 ng DNA) were applied to the Power SYBR Green PCR (Invitrogen) with a final reaction volume of 20 μl . Primers are listed in Table 1. Cycling conditions were 2 min at 50°C , 15 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 94°C , 30 s at 60°C and 30 s at 72°C , including a last melting step from 65 to 95°C at increases of 1°C each 4 s. A 96 FLX Touch TM thermal cycler (Bio-Rad) was used. To quantify the abundance of each *mcy* gene in the water samples, several amplicons obtained from each gene were cloned into a TOPO TA 2.1 vector (Invitrogen) (see below). After identification, each cloned gene was confirmed by sequencing (Institut Pasteur de Montevideo Sequencing Service) and these clones were used to perform the calibration curves. Curves were achieved using five serial dilutions from 1/10 to 1/100,000 of the cloned genes (in quintuplicates) and applied to qPCR in the same PCR plate where the samples were assayed. Samples were run in triplicate.

2.6. Cloning of *mcy* genes

Four *mcy* genes (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* and *mcyJ*) were cloned using the strain *Microcystis* 140313 as target (kindly provided by Dr. Sylvia Bonilla). DNA extraction and gene cloning were performed as described by (Martínez de la Escalera et al., 2014). PCR of *mcy* genes was done using the qPCR primers (Table 1). Amplicons were run in a 1% agarose gel electrophoresis, purified using the gel-extraction QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden,

Table 1

List of the primers used in this study.

Gene targeted	Primer name	Sequence (5'-3')	Refs.
<i>mcyB</i> - <i>Microcystis</i> spp.	mcyB_F	AGATTTTAATCCACAAGAAGCITTATTAGC	Hautala et al. (2013)
	mcyB_R	CTGTTGCCTCCTAGTTCAAAAAATGACT	Hautala et al. (2013)
<i>mcyD</i> - <i>Microcystis</i> spp.	mcyD_F	GGTTCGCCTGGTCAAAGTAA	Kaebnick et al. (2000)
	mcyD_R	CCTCGTAAAGAAGGGTTGA	Kaebnick et al. (2000)
<i>mcyE</i> - <i>Microcystis</i> spp.	mcyE_F	AAGCAAAGCTCTCCCGTATC	Sipari et al. (2010)
	mcyE_R	CAATGGGAGCATAACGAGTCAA	Sipari et al. (2010)
<i>mcyJ</i> - <i>Microcystis</i> spp.	mcyJ_F	TAGCTAAAGCAGGGTTATCG	Kim et al. (2010)
	mcyJ_R	TCTTACTATTAACCCGACG	Kim et al. (2010)

Germany) and ligated into a TOPO 2.1 vector (TOPO-TA cloning kit, Invitrogen). Competent TOP10 *Escherichia coli* cells were transformed and white/blue colony selection was applied. Those clones having right-sized inserts (assessed by PCR using M13 forward and reverse primers) were selected to generate the calibration curves for qPCR.

2.7. Statistic analysis

Spearman bivariate correlations (r_s) were used to identify which environmental variables were correlated with toxic genotypes abundance (*mcy* genes). Non-parametric median tests (Kruskal-Wallis) were used to evaluate differences in *mcy* genes abundance based on the presence or otherwise of MAC colonies in 115 μm net. Generalized multiple linear models (GLM) with gamma distribution and a log link function were constructed to evaluate the relation between environmental variables and the abundance of toxic genotypes. In all cases the explaining environmental variables were total nutrients (Total Nitrogen; TN and Total Phosphorus; TP), wind intensity (WI), water temperature (T), turbidity (Turb) and conductivity (K). The models were constructed using backward selection and were compared based on the Akaike criterion (AIC) (Burnham and Anderson, 2002). Pseudo- R^2 for each GLM model were calculated as: (null deviance – residual deviance)/null deviance; where null deviance corresponds to the null model and residual deviance corresponds to the deviance of the estimated model. Random Forest (RF, Cutler et al., 2007) were used to determine the most important environmental variable in effecting toxic genotype abundance. The abundance of *mcy* genes was classified in 2 categories: 1) Low (less than 999 copies ml^{-1}) abundances, that does not present a risk to public health (Falconer et al., 1999; World Health Organization, 2004) and 2) High abundances (more than 1000 copies ml^{-1}) achieved during cyanobacteria blooms and representing public health risk (Falconer et al., 1999; World Health Organization, 2004). The same independent variables as in GLM were included in this analysis and their percentage of explained variability was represented graphically (Kruk and Segura, 2012). We evaluated the accuracy of the RF

by exploring missclassification rate in ten fold cross-validation. All statistic analysis were performed with free software R, version 3.0.2 using {randomForest} and {rpart} packages (Liaw and Wiener, 2002; R Core Team, 2013; Therneau et al., 2015).

3. Results

3.1. Environmental and biological gradients

Strong temporal and spatial gradients were observed for the environmental variables (Fig. 2). Surface water temperature varied from 11 to 34 °C, showing higher values in Salto Grande reservoir during summer (January to March) and lower temperatures in the outer marine zone of the Río de la Plata during winter-early spring (June to October) (Fig. 2A and B). The highest wind intensity (7 ms^{-1}) was observed in winter-early spring (June to October) in Punta del Este. A clear spatial gradient was defined by conductivity and turbidity. Conductivity showed a minimum of 0.023 mS cm^{-1} (freshwater systems: Salto, Fray Bentos and Colonia Carmelo) and a maximum of 51 mS cm^{-1} at the estuary (Montevideo and Punta del Este) (Fig. 2B). The larger conductivity range (9–51 mS cm^{-1}) was observed in the stations of Montevideo (Fig. 2B). Turbidity ranged from 0 to 187 NTU, with higher values in the stations located at the middle of the gradient (Carmelo and Colonia) (Fig. 2B). Higher concentrations of nutrients were measured in Salto Grande reservoir and Montevideo (TP ~ 60 $\mu\text{g L}^{-1}$, TN ~ 0.9 mg L^{-1}).

Microcystin-LR was only detected during summer in the Salto Grande reservoir and in Colonia (Table 2). Chlorophyll-a was higher in the station at the freshwater reservoir Salto Grande and at the estuary Río de la Plata (Punta del Este), showing lower maximum values in the middle of the studied gradient (Carmelo and Colonia) (Table 2). A similar pattern was observed for phytoplankton total biovolume (Table 2). Total cyanobacteria biovolume was maximum in Salto Grande reservoir and decreased towards the outer estuary station (Punta del Este; Table 2). Potentially microcystin-producing MAC species were the dominant cyanobacteria in terms of biovolume, reaching higher total percentage of the phytoplankton community in Salto Grande reservoir during summer. However,

Table 2

Mean values and ranges of biological variables: total phytoplankton biovolume (Phy_BV), cyanobacteria biovolume (Cya_BV), chllorophyll-a (Chl-a), and microcystin-LR. BDL = below detection limit.

Sites	Phy_BV ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$)	Cya_BV ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$)	Chl-a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Microcystin-LR ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Salto Grande	361.4 (0.2–2188)	457 (BDL–2175)	7.9 (0.9–29.9)	7.1 (0.4–15)
Fray Bentos	0.5 (0.1–3.4)	0.06 (BDL–0.5)	0.6 (0.1–2.1)	BDL
Carmelo	1.4 (BDL–3.8)	0.4 (BDL–2.9)	0.7 (0.3–1.9)	BDL
Colonia	4.7 (BDL– 42.6)	0.8 (BDL–9.1)	0.8 (0.1–1.4)	0.2 (BDL–0.3)
Montevideo	2.4 (0.1–6.7)	1.4×10^4 (BDL– 8.5×10^{-4})	1.2 (0.3–1.8)	BDL
Punta del Este	19.8 (0.6–141.4)	2.8×10^{-4} (BDL–0.0029)	2.4 (0.3–7.9)	BDL

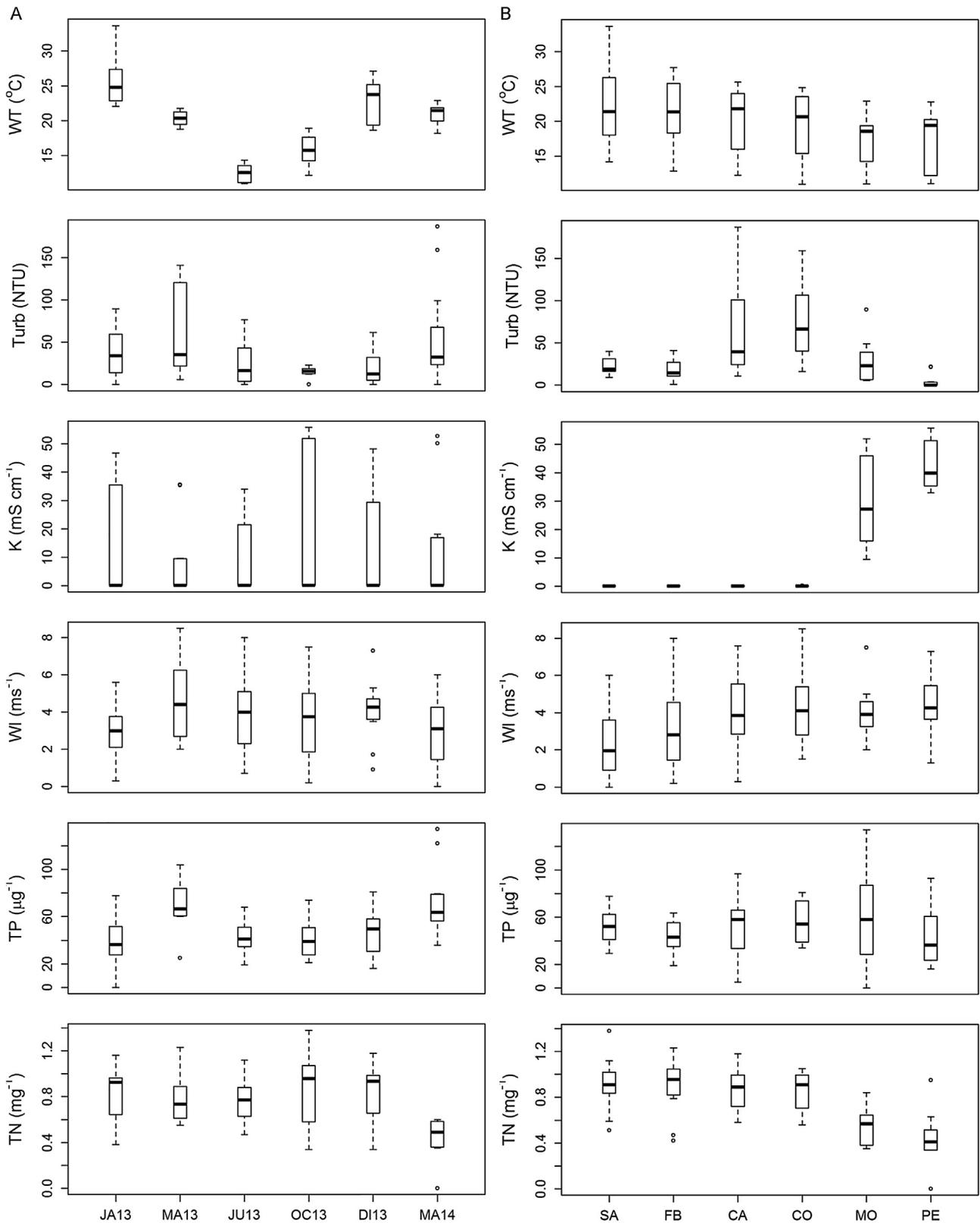


Fig. 2. Temporal (A) and spatial (B) variability of the environmental variables measured during each sampling. Water temperature (WT), turbidity (Turb), conductivity (K), wind intensity (WI), total phosphorus (TP) and total nitrogen (TN). Medians, interquartile ranges, maximum, minimum and outliers are shown. JA13: January 2013, MA13: March 2013, JU13: June 2013, OC13: October 2013, DI13: December 2013 and MA14: March 2014. SA: Salto, FB: Fray Bentos, CA: Carmelo, CO: Colonia, MO: Montevideo and PE: Punta del Este.

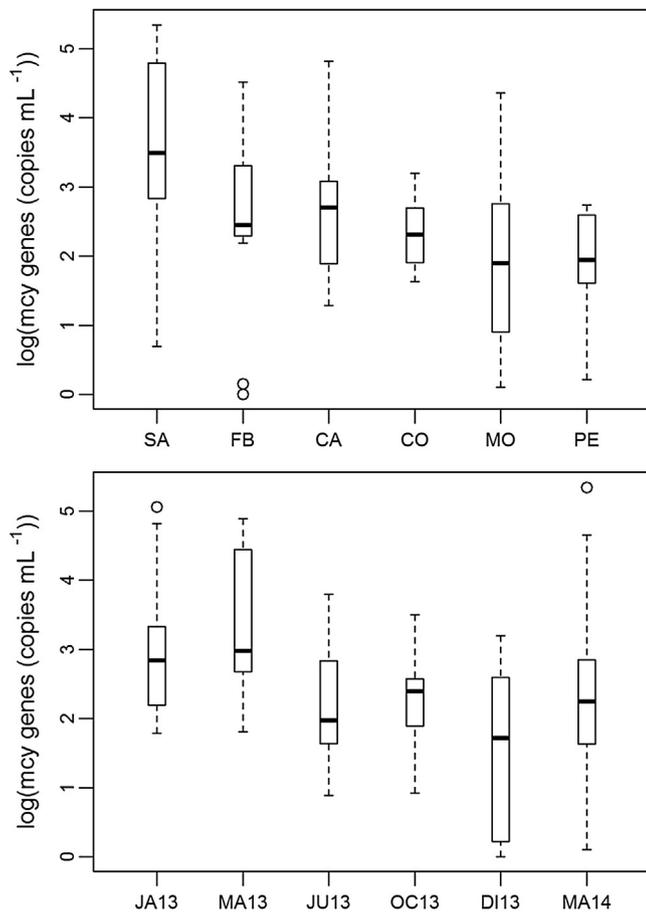


Fig. 3. Temporal (bottom) and spatial (top) variability of the logarithm of maximum abundance of toxic genotypes (copies of *mcy* ml⁻¹). Medians, interquartile ranges, maximum, minimum and outliers are shown. JA13: January 2013, MA13: March 2013, JU13: June 2013, OC13: October 2013, DI13: December 2013 and MA14: March 2014. SA: Salto, FB: Fray Bentos, CA: Carmelo, CO: Colonia, MO: Montevideo and PE: Punta del Este.

presence of MAC blooms was also registered in winter (Temperature = 9 °C). In addition, the presence of MAC colonies in the 115 µm net was detected along the whole gradient and in most sampling dates.

3.2. Spatial and temporal distribution of *mcy* genes

The highest abundances of *mcy* genes occurred in freshwater stations in Río Uruguay (Salto Grande reservoir and Fray Bentos) decreasing towards estuarine and marine sites (Montevideo and Punta del Este). The maximum total abundances were observed in summer (Fig. 3). The presence of *mcy* genes (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* and *mcyJ*) was detected in all sampling dates and stations (supplementary Fig. 1 and 2). The individual abundance of all addressed *mcy* genes (*mcyB*, *mcyE*, *mcyJ* and *mcyD*) showed the same spatial pattern, higher in the freshwater reservoir and decreasing towards

Table 4
Results of GLM models to explain *mcy* abundances based on six environmental variables: water temperature (WT), conductivity (K), turbidity (Turb), wind intensity (WI), total phosphorus (TP) and total nitrogen (TN). Coefficient and intercept with significant values are shown ($p < 0.05$).

Genes	Environmental variables/coefficients						Parameters	
	WT	K	Turb	WI	TN	TP	Intercept- value	pseudo-R2
<i>mcyB</i>		-0.011					1.770	0.14
<i>mcyD</i>	-0.074	0.020	0.007	-0.100			3.180	0.35
<i>mcyE</i>	0.100						-1.040	0.42
<i>mcyJ</i>	0.047	-0.021	-0.006			-0.010	1.880	0.16

Table 3

Values of Spearman Correlation (r_s) between the abundance of *mcy* genes estimated by qPCR (copies *mcy* ml⁻¹) and environmental variables: water temperature (WT), conductivity (K), turbidity (Turb), wind intensity (WI), total phosphorus (TP) and total nitrogen (TN). Only significant values are shown ($p < 0.05$).

	WT	K	Turb	WI	TN	TP
<i>mcyB</i>	-	-0.37	-	-	-	-
<i>mcyD</i>	-0.33	-0.28	-0.26	-0.27	-	-
<i>mcyE</i>	0.50	-0.25	0.41	-	-	-
<i>mcyJ</i>	-	-0.31	-	-0.23	-	-

the estuary end (supplementary Fig. 1). The temporal distribution of *mcy* genes was similar between *mcyB*, *mcyE* and *mcyJ*, being the maximum abundance observed in summer (supplementary Fig. 2). Surprisingly, the abundance of *mcyD* showed an opposite temporal pattern (higher abundances in winter) (supplementary Fig. 2).

3.3. Relation of toxic genotypes and environmental variables

Conductivity was negatively correlated with all *mcy* genes abundances (Table 3). Temperature and turbidity were positively correlated with *mcyE* abundance and negatively with *mcyD*. Wind intensity was negatively associated with *mcyD* and *mcyJ* abundance. The concentration of nutrients showed no association with the abundance of toxic genotypes. The variables selected in the GLM models differed for each *mcy* gene and the explained variance (pseudo R²) varied from 0.14 to 0.42 (Table 4). Conductivity affected negatively the abundance of *mcyB*, while temperature had a positive effect on the abundance of *mcyE*. Conversely, although the abundance of *mcyD* gene showed the same trend of the other genes for conductivity, turbidity and wind intensity, it was negatively affected by temperature. In the case of *mcyJ* abundance, conductivity, turbidity and TP affected negatively its abundance while the affect of temperature was positive.

Random Forest analyses showed a high predictive accuracy of the two classes (high/low) for each *mcy* gene (between 81 and 93%; Fig. 4). Variable importance differed for each *mcy*. The highest percentage of variance in the *mcyB* gene was mostly related to conductivity (K), wind intensity (WI) and water temperature (WT), while total nutrients (TP and TN) and wind intensity (WI) explained a higher percentage of variance in *mcyD* classes. Variance in *mcyE* classes were accounted by water temperature (WT) and conductivity (K). Finally, *mcyJ* abundance was mostly related to conductivity (K) and water temperature (WT) (Fig. 4).

3.4. Relation of toxic genotypes abundance with other toxic cyanobacteria indicators

Significant correlations were detected among the assessed genes, except between *mcyE* and *mcyD* (Table 5). The abundance of *mcyE* correlated positively with traditional phytoplankton indicators, such as chlorophyll-a, total phytoplankton biovolume and cyanobacteria biovolume (Table 5); while *mcyB* and *mcyJ* abundances had a strong positive relationship only with total cyanobacteria biovolume (Table 5). Also, the abundance of *mcyB*

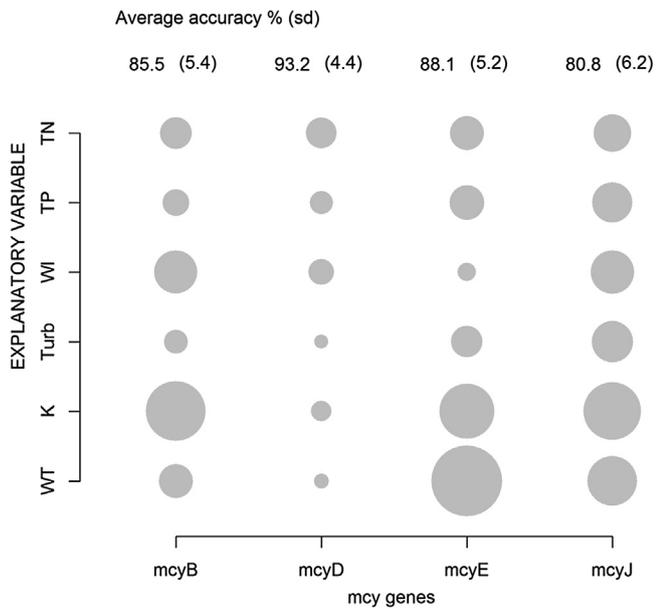


Fig. 4. Variance importance plot on the Random Forest prediction of *mcy* gene classes. The importance of each environmental variable (assessed through Gini index) to explain the abundance of each *mcy* gene is proportional to circle diameter. Six environmental variables were evaluated: water temperature (WT; °C), conductivity (K; $\mu\text{m cm}^{-1}$), turbidity (Turb, NTU), wind intensity (WI; m s^{-1}), total phosphorus (TP $\mu\text{g L}^{-1}$) and total nitrogen (TN mg L^{-1}). Average accuracy of the RF model (%) and its standard deviation (sd) are shown.

Table 5

Values of Spearman Correlation (rs) between the abundance of each *mcy* gene estimated by qPCR (*mcy* copies ml^{-1}) and between gene abundances and other indicators of potentially toxic cyanobacteria: chllorophyll-a (Chl-a), total phytoplankton biovolume (Phy_BV), cyanobacteria biovolume (Cya_BV) and MAC biovolume (MAC_BV). Only significant values are shown ($p < 0.05$).

	<i>mcyB</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyJ</i>	Chl-a	Phy_BV	Cya_BV
<i>mcyB</i>					–	–	0.57
<i>mcyD</i>	0.28				–	–	–
<i>mcyE</i>	0.71	–			0.25	0.68	0.43
<i>mcyJ</i>	0.38	0.41	0.33		–	–	0.33

and *mcyE* were significantly higher when organisms of MAC were detected in the 115 μm net (Kruskal-Wallis, $H = 20$ y 25 respectively, $p < 0.05$) (Fig. 5). Differently, *mcyD* and *mcyJ* did not show relationship with the presence of large MAC colonies.

4. Discussion

The environmental mechanisms responsible for the control of toxic populations of MAC are still not well understood and the information about which variables are more relevant to explain their abundance dynamics is sometimes contradictory. Most previous studies focused on one or few lakes and did not include a high degree of environmental variability. Here, we provide insight into these issues by analysing the spatial-temporal distribution of toxic genotypes of MAC species in a wide environmental gradient, from freshwater (Río Uruguay) to estuarine and marine waters (Río de la Plata). Linear correlations, GLM and RF methods revealed that the relevant environmental variables explaining the observed distribution of toxic genotypes were conductivity (hereafter used as indicator of saline stress) and temperature.

Saline stress was the main variable limiting the abundance of population harbouring toxic genotypes. Despite there is scarce evidence on the role of salinity in toxin production by MAC species,

it is well known that saline stress affects respiration rates, decreases photosynthesis rates and alters permeability of cell membranes (Chen et al., 2015, 2015; Khomutov et al., 1990; Sudhir and Murthy, 2004; Zhang et al., 2010). It is also well established that cyanobacteria species, and particularly those belonging to MAC, are sensitive to saline environmental conditions (Tonk et al., 2007). Moreover, several studies reported the optimum growth of *Microcystis* spp. at salinity 0 and an upper limit for active growth at salinities close to 6 (estuarine salinity) (Liu, 2006; Nasr et al., 2012; Robson and Hamilton, 2003; Tonk et al., 2007; Wangwibulkit et al., 2008). In agreement with those reports, we found the highest MAC abundance in freshwater (Río Uruguay) and a decrease towards the marine end of Río de la Plata estuary (salinity range 20–30). Besides, the *mcy* genes showed a similar trend related to the freshwater-marine water gradient. Although MAC populations are described as freshwater, the detection of colonies and toxic genotypes in marine waters could be attributed to their transport from headwaters (Río Uruguay) downstream into Río de la Plata. Similar findings have been reported by (Pinckney et al., 1997) for the Neuse River Estuary (North Carolina, USA), who found higher abundance and growth rates of phytoplankton in periods of low salinity, when the river discharged into the estuary, implying that MAC species would be able to survive but not able to grow in estuarine or marine waters (Lehman et al., 2008; Pinckney et al., 1997).

The lack of correlation between the concentration of microcystin-LR and the abundance of *mcy* genes could be due to a methodological limitation to detect other variants. This toxin was only detected during summer in Salto Grande reservoir, while MAC representatives were found at high abundances also in other stations, suggesting that other microcystin variants different than LR could have been synthesized. This lack of correlation between toxin production and gene abundances has been already found for other systems using different approaches to quantify the toxin (Beversdorf et al., 2015; Rinta-Kanto et al., 2009). As in the present work, previous studies only addressed few microcystin variants (usually LR) over more than 100 that have been reported so far, which could mask the actual association between the presence of the toxic genotypes and the toxin synthesis. In this sense, (Vaitomaa et al., 2003) found a positive correlation between total microcystins evaluated by ELISA and *mcyE* copy numbers in two Finland lakes, confirming the reliability of using *mcy* gene copy numbers as surrogates for microcystin-producers.

Mostly, toxic genotypes abundance was higher in summer than in winter, following the same pattern as for water temperature. This corresponds well with the optimal growth temperature described for *Microcystis* spp. (close to 25 °C; Reynolds, 2006). According to GLM and RF water temperature would be one of the main factors affecting the abundance of most toxic genotypes. However, when Spearman correlations are considered, only the abundances of *mcyD* and *mcyE* were significantly related to water temperature (Spearman correlation, $p < 0.05$). In this sense, our findings are in agreement with those reported by other authors, who did not found significant correlations between *mcyB* and temperature (Guedes et al., 2014; Xu et al., 2010). The correlation between *mcyJ* and temperature was not significant, differing from the work of (Joung et al., 2011), who found that higher temperatures promoted a rapid growth of *Microcystis* toxic genotypes (assessed as the abundance of *mcyJ* gene), when compared to non-toxic genotypes. (Davis et al., 2009), using *mcyD* gene abundances, demonstrated that temperature increased the growth rate of toxic *Microcystis*. In contrast, in the current study the abundances of *mcyD* showed a relationship with temperature that was opposite to the others *mcy* addressed genes. Since primers used in this study were designed based on sequences of microcystin-producing cyanobacteria from other geographical origins at different

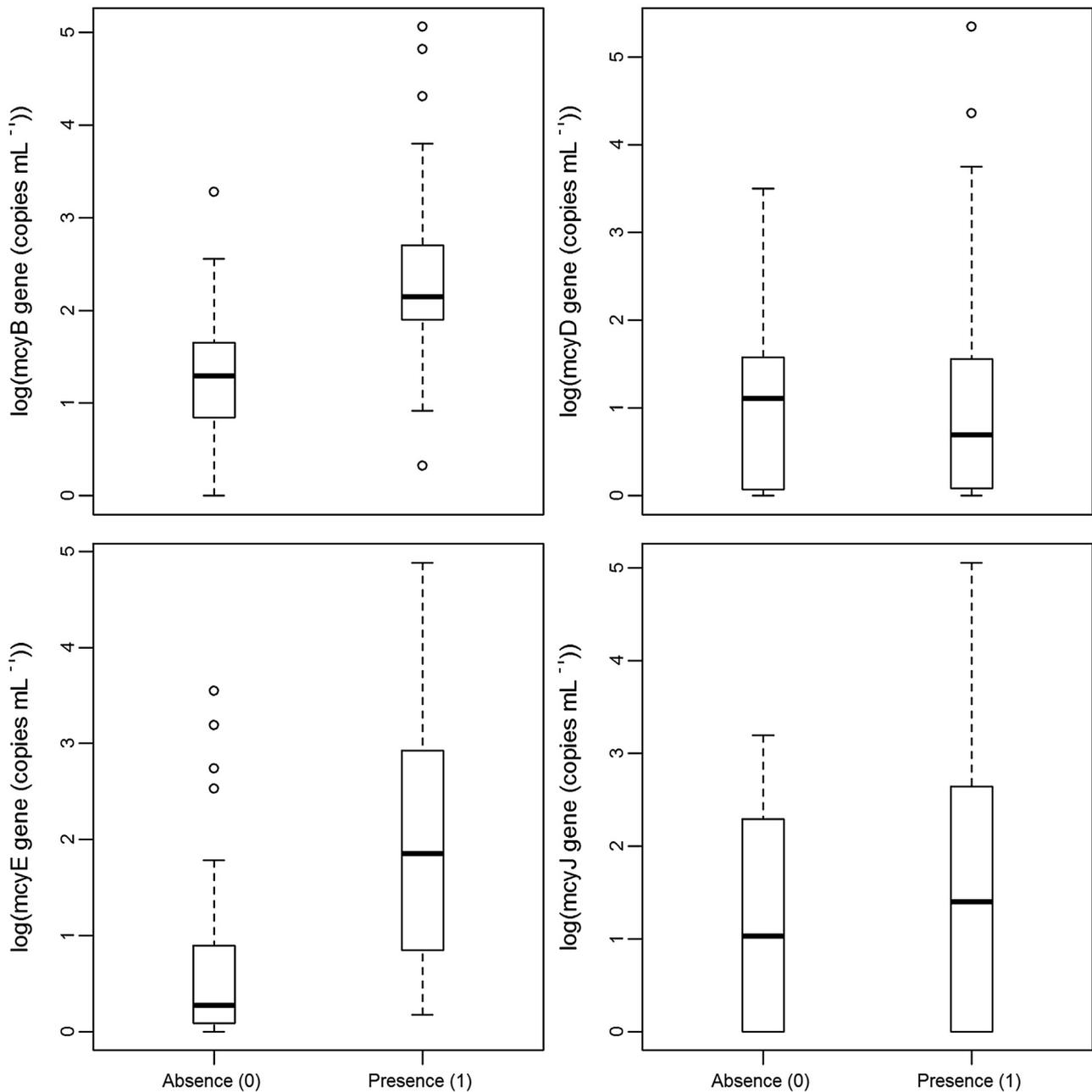


Fig. 5. Box-plots showing the medians, interquartile ranges, maximum, minimum and outliers of *mcy* genes abundance (log copies mcy ml⁻¹) related to the presence (1) or absence (0) of visible MAC colonies in the 115 μ m net.

latitudes (Kaebernick et al., 2000), a possible explanation for this behaviour can be attributed to a bias imposed by the *mcyD* primers, which would only detected a genetic variant or sub-population of toxic MAC species that are able to growth at low temperature. Therefore, this finding should be taken with caution and new primers based on local sequences should be designed to confirm the presence of populations of toxic MAC able to thrive in winter conditions in the studied system. In a similar study addressing four lakes, (Beversdorf et al., 2015) found different trends between *mcy* genes and environmental variables for each lake, e.g. that genes were highly variable temporally and correlated with increased temperature and nutrients just in few cases. Therefore, the positive trends found between *mcyE*, *mcyB* and *mcyJ* and temperature and the negative correlation with conductivity obtained in the present work, which comprised a high range of temperature and salinity conditions, are encouraging and suggest that both variables are

relevant for the dynamics of toxic populations, at least in aquatic ecosystems involving river-estuary connections.

Turbidity was negatively correlated to the abundance of *mcyD* gene and positively to *mcyE* gene targeted in this study. Also *mcyE* abundance was positively correlated with MAC biovolume, suggesting that observed turbidity could be a consequence of the high MAC biomass. According with these results, (Te and Gin, 2011) reported a positive correlation between *mcyE* gene and turbidity in a tropical reservoir and suggested the use of this variable as an indicator of cyanobacteria biomass. On the other hand, the negative correlation between *mcyD* gene and turbidity would be a consequence of the higher *mcyD* abundances at low temperatures, when the lowest MAC biomass and turbidity were found. Therefore, turbidity would be rather a cyanobacteria biomass indicator and not an intrinsic water property affecting toxic genotypes.

When the effect of wind intensity over the abundance of toxic genotypes was addressed, significant and negative correlations were only found for *mcyJ* and *mcyD*, suggesting that high wind intensities would difficult the growth of populations harbouring these genotypes. It has been described that wind can hamper MAC blooms formation reducing their growth rate due to disturbance of vertical stability and mixing of the water column (Blottière et al., 2014; Harke et al., 2016). However, the mixing effect is applicable to small shallow lakes or ponds (Visser et al., 1996) and would be limited in estuarine waters owing to their large area and volume (Paerl, 2014). This could explain the low contribution of this explanatory variable in RF models.

Surprisingly, we could not find association between the abundance of any *mcy* genes and the concentration of total nutrients (TP or TN). Several studies have shown that there is a positively correlation between nutrients (TN and TP) and the abundances of the *mcy* gene (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* and *mcyJ*) (Guedes et al., 2014; Joung et al., 2011; Rinta-Kanto et al., 2009; Te and Gin, 2011; Xu et al., 2010). This lack of correlation suggest that after a given threshold of nutrient load has been overpassed, temperature and saline stress would be more relevant for the regulation of toxic genotypes abundance than nutrient concentration.

Among the four genes targeted in this study (*mcyB*, *mcyD*, *mcyE* and *mcyJ*), only *mcyD* showed an opposite response to temperature. This implies that the potential to produce microcystin could be achieved under a different combination of conditions (i.e. Guedes et al., 2014). The differential response to the environment found for *mcyD* e.g. and in order to avoid primers biases, we recommend the use of more than one *mcy* gene to monitor and predict toxin production in aquatic ecosystems. In this work, the qPCR strategy employed showed to be successful to detect toxic genotypes of MAC with high sensitivity (≤ 2 cells mL⁻¹), outperforming classical methods used to monitor abundance of cyanobacteria (i.e. microscopy). Moreover, the results showed that the abundance of the *mcyB*, *mcyE* and *mcyJ* genes correlated with cyanobacteria and MAC biovolume, as estimated by classic counting and measuring. In agreement with this, the abundance of *mcyB* and *mcyE* genes were significantly higher when the presence of organisms of MAC was detected using the plankton net. These results together to the high sensitivity displayed by qPCR assay allowed us to suggest that this is a promising tool for the early detection of MAC toxic genotypes. Indeed, due to the strong correlations found between *mcyE* and biologicals variables assessed though a wide environmental gradient, we propose that this *mcy* gene should always be included as an indicator of the presence of MAC toxic genotypes.

5. Conclusions

Toxic genotypes of *Microcystis* spp. were detected along the whole environmental gradient of the studied system, where they were the dominant microcystin-producer group. The analyses involving environmental variables suggested that temperature and salinity were the main variables affecting the abundance of toxic genotypes in Río Uruguay and Río de la Plata. We also suggest the existence of several toxic populations carrying different genotypes, since the addressed *mcy* genes showed differential responses to the assessed environmental variables. A noticeable example was the *mcyD* population that showed its maximum abundance during winter.

Our study is the first work using a molecular-based analysis to detect toxic genotypes in the large environmental and temporal gradient comprised by Río Uruguay-Río de la Plata system. The qPCR strategy showed a high sensitivity and good correlations between toxic-genotypes abundance and the presence of MAC

colonies were found, representing a suitable alternative tool for early prediction of toxic MAC blooms.

Acknowledgements

We thank to Asociación Honoraria de Salvamentos Marítimos y Fluviales (ADES) and to Comisión Técnico-Mixta de Salto Grande (CTM-Salto Grande) for their valuable help to perform samplings. This study was supported by grant ANII-ALGAS (Laboratorio Tecnológico del Uruguay), by PEDECIBA-Biología and by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación of Uruguay (ANII). This work was carried out in partial fulfillment of the requirements of G. Martínez de la Escalera for the doctoral degree from PEDECIBA (University of Uruguay).[CG]

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.012>.

References

- Azevedo, S.M., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology* 181, 441–446.
- Beverdorf, L.J., Chaston, S.D., Miller, T.R., McMahon, K.D., 2015. Microcystin *mcyA* and *mcyE* gene abundances are not appropriate indicators of microcystin concentrations in lakes. *PLoS One* 10, e0125353. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125353>.
- Blottière, L., Rossi, M., Madricardo, F., Hulot, F.D., 2014. Modeling the role of wind and warming on *Microcystis aeruginosa* blooms in shallow lakes with different trophic status. *Theor. Ecol.* 7, 35–52. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s12080-013-0196-2>.
- Briand, J.-F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J.-F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361–377. doi:<http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2003019>.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2002. *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*, 2nd ed. Springer, New York.
- Chen, L., Mao, F., Kirumba, G.C., Jiang, C., Manefield, M., He, Y., 2015. Changes in metabolites, antioxidant system, and gene expression in *Microcystis aeruginosa* under sodium chloride stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 126–135.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. Chapman & Hall, London.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 264–272.
- Cutler, D.R., Edwards Jr, T.C., Beard, K.H., Cutler, A., Hess, K.T., Gibson, J., Lawler, J.J., 2007. Random forests for classification in ecology. *Ecology* 88, 2783–2792.
- 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. *Harmful Algae* 8, 715–725. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.004>.
- De Leon, L., Yunes, J.S., 2001. First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata river, South America. *Environ. Toxicol.* 16, 110–112.
- Dittmann, E., Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins—occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 7–17.
- Dittmann, E., Neilan, B.A., Erhard, M., Von Döhren, H., Börner, T., 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.* 26, 779–787.
- Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M., Codd, G., 1999. Safe levels and safe practices. *Toxic Cyanobacteria in Water. E & FN Spon*, London, pp. 155–178.
- González-Piana, M., Fabian, D., Delbene, L., Chalar, G., 2011. Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Rio Negro reservoirs, Uruguay. *Harmful Algae News* 43, 16–17.
- Guedes, I.A., da Costa Leite, D.M., Manhães, L.A., Bisch, P.M., Azevedo S.Mfo. Pacheco, A.B.F., 2014. Fluctuations in microcystin concentrations, potentially toxic *Microcystis* and genotype diversity in a cyanobacterial community from a tropical reservoir. *Harmful Algae* 39, 303–309.
- 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.
- Hautala, H., Lamminmäki, U., Spoof, L., Nybom, S., Meriluoto, J., Vehniäinen, M., 2013. Quantitative PCR detection and improved sample preparation of microcystin-producing *Anabaena*, *Microcystis* and *Planktothrix*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 87, 49–56.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403–424. doi:<http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>.

- Huisman, J., Hulot, F.D., 2005. Population dynamics of harmful cyanobacteria. *Harmful Cyanobacteria*. Springer, pp. pp. 143–176.
- Huisman, J., Matthijs, H.C., Visser, P.M., 2006. *Harmful Cyanobacteria*. Springer Science & Business Media.
- ISO, I., 2005. Standard 20179: 2005. Water quality—Determination of Microcystins—Method Using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) Detection. International Organization for Standardization, Geneva.
- Ibelings, B.W., Mur, L.R., 1992. Microprofiles of photosynthesis and oxygen concentration in *Microcystis* sp. scums. *FEMS Microbiol. Lett.* 86, 195–203. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb04810.x.
- Jespersen, A.-M., Christoffersen, K., 1987. Measurements of chlorophylla from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Archiv für Hydrobiologie* 109, 445–454.
- 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. *Harmful Algae* 10, 188–193. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2010.09.005.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 1–9.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., Borner, T., Dittmann, E., 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3387–3392. doi:http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.8.3387-3392.2000.
- Kaebnick, M., Dittmann, E., Borner, T., Neilan, B.A., 2002. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 449–455. doi:http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.2.449-455.2002.
- Kardinaal, W.E.A., Janse, I., Kamst-van Agterveld, M., Meima, M., Snoek, J., Mur, L.R., Huisman, J., Zwart, G., Visser, P.M., 2007a. Microcystis genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquat. Microb. Ecol.* 48, 1–12.
- Kardinaal, W.E.A., Tonk, L., Janse, I., Hol, S., Slot, P., Huisman, J., Visser, P., 2007b. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium microcystis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2939–2946.
- Khomutov, G., Fry, I.V., Huflejt, M.E., Packer, L., 1990. Membrane lipid composition, fluidity, and surface charge changes in response to growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311 under high salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 263–267. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(90)90577-L.
- 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. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 93–102. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00947.x.
- Komárek, J., Komárková, J., 2002. Review of the European microcystin-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycol. Olomouc* 2, 1–24.
- Kruk, C., Segura, A.M., 2012. The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia* 698, 191–202. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10750-012-1072-6.
- Kurmayer, R., Kutzenberger, T., 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6723–6730. doi:http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.11.6723-6730.2003.
- Lawton, L.A., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *The Analyst* 119, 1525. doi:http://dx.doi.org/10.1039/an9941901525.
- Lehman, P.W., Boyer, G., Satchwell, M., Waller, S., 2008. The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. *Hydrobiologia* 600, 187–204. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10750-007-9231-x.
- Lei, L., Li, C., Peng, L., Han, B.-P., 2015. Competition between toxic and non-toxic *Microcystis aeruginosa* and its ecological implication. *Ecotoxicology* 24, 1411–1418. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10646-015-1456-2.
- Liaw, A., Wiener, M., 2002. Classification and regression by random forest. *R News* 2, 18–22.
- Liu, Y., 2006. Effects of salinity on the growth and toxin production of a harmful algal species, *Microcystis aeruginosa*. *JUS SJWP* 1, 91–111.
- Lund, J., Kipling, C., Le Ren, E., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11, 143–170.
- Martínez de la Escalera, G., Antoniadou, 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. *Mol. Ecol.* 23, 5791–5802. doi:http://dx.doi.org/10.1111/mec.12979.
- Milutinović, A., Živin, M., Zorc-Plesković, R., Sedmak, B., Šuput, D., 2003. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins –LR and –YR. *Toxicol* 42, 281–288. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00143-0.
- Nasr, H.S., Zaher, S.S., El-Awamri, A., 2012. Factors possibly affecting growth of *Microcystis aeruginosa* and *M. flos aquae* isolated from Wadi El-Rayian Upper Lake (Egypt) under laboratory conditions. *Egypt J. Aquat. Biol. Fish* 16, 35–46.
- Ngwa, F.F., Madramootoo, C.A., Jabaji, S., 2014. Comparison of cyanobacterial microcystin synthetase (*mcy*) *E* gene transcript levels, *mcy* *E* gene copies, and biomass as indicators of microcystin risk under laboratory and field conditions. *MicrobiologyOpen* 3, 411–425. doi:http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.173.
- O’Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14, 313–334.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Watanabe, M.M., 1999. Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycol. Res.* 47, 189–197. doi:http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.1999.00162.x.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Watanabe, M.M., 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 873–879. doi:http://dx.doi.org/10.1099/00207173-51-3-873.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2008. Blooms like it hot. *Science* 320, 57–58.
- Paerl, H.W., Otten, T.G., 2013. Harmful cyanobacterial blooms: causes consequences, and controls. *Microb. Ecol.* 65, 995–1010. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y.
- Paerl, H., 2014. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human- and climatically-impacted world. *Life* 4, 988–1012. doi:http://dx.doi.org/10.3390/life4040988.
- Pinckney, J.L., Millie, D.F., Vinyard, B.T., Paerl, H.W., 1997. Environmental controls of phytoplankton bloom dynamics in the neuse river estuary, North Carolina, USA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2491–2501.
- Puddick, J., Prinsep, M., Wood, S., Kaufononga, S., Cary, S., Hamilton, D., 2014. High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Mar. Drugs* 12, 5372–5395. doi:http://dx.doi.org/10.3390/md12115372.
- R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 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.
- Reynolds, C.S., 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. University Press, Cambridge.
- Rinehart, K.L., Namikoshi, M., Choi, B.W., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6, 159–176. doi:http://dx.doi.org/10.1007/BF02186070.
- Rinta-Kanto, J.M., Konopko, E.A., DeBruyn, J.M., Bourbonniere, R.A., Boyer, G.L., Wilhelm, S.W., 2009. Lake Erie Microcystis: relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae* 8, 665–673. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2008.12.004.
- Robson, B.J., Hamilton, D.P., 2003. Summer flow event induces a cyanobacterial-bloom in a seasonal Western Australian Estuary. *Mar. Freshwater Res.* 54, 139–151.
- Schatz, D., Keren, Y., Hadas, O., Carmeli, S., Sukenik, A., Kaplan, A., 2005. Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains: toxic and non-toxic subcultures of *Microcystis*. *Environ. Microbiol.* 7, 798–805. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00752.x.
- Sevilla, E., Martín-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L., 2008. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: iron starvation triggers microcystin synthesis. *Environ. Microbiol.* 10, 2476–2483. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01663.x.
- Sipari, H., Rantala-Ylänen, A., Jokela, J., Oksanen, I., Sivonen, K., 2010. Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase *e* gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3797–3805. doi:http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00452-10.
- Sivonen, K., 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 35, 12–24.
- Srivastava, A., Singh, S., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., Asthana, R.K., 2013. Monitoring approaches for a toxic cyanobacterial bloom. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8999–9013. doi:http://dx.doi.org/10.1021/es401245k.
- Sudhir, P., Murthy, S.D.S., 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42, 481–486. doi:http://dx.doi.org/10.1007/S11099-005-0001-6.
- Te, S.H., Gin, K.Y.-H., 2011. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore. *Harmful Algae* 10, 319–329. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2010.11.006.
- Therneau, T., Atkinson, B., Ripley, B., Ripley, M.B., 2015. Package rpart.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., Neilan, B.A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7, 753–764. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00021-1.
- Tonk, L., Bosch, K., Visser, P.M., Huisman, J., 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat. Microb. Ecol.* 46, 117.
- Tooming-Klunderud, A., Mikalsen, B., Kristensen, T., Jakobsen, K.S., 2008. The mosaic structure of the *mcyABC* operon in *Microcystis*. *Microbiology* 154, 1886–1899. doi:http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/015875-0.
- Utermöhl, H., 1958. Toward the improvement of the quantitative phytoplankton method. *Mitteilungen-Internationale Vereinigung für Limnologie* 9, 1–38.
- Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Mokolke, L., Sivonen, K., 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase *E* copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7289–7297. doi:http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003.
- Vezie, C., Briant, L., Sivonen, K., Bertru, G., Lefevre, J.-C., Salkinoja-Salonen, M., 1998. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in lake Grand-Lieu (France). *Microb. Ecol.* 35, 126–135. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s002489900067.

- Visser, P., Ibelings, B., Van Der Veer, B., Koedood, J., Mur, R., 1996. Artificial mixing prevents nuisance blooms of the cyanobacterium *Microcystis* in lake Nieuwe Meer, the Netherlands. *Freshwater Biol.* 36, 435–450.
- Wangwibulkit, S., Limsuwan, C., Chuchird, N., 2008. Effects of salinity and pH on the growth of blue-green algae *Oscillatoria* sp. and *Microcystis* sp., isolated from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ponds. *Kasetsart Univ. Fish. Res. Bull.* 32, 1–9.
- World Health Organization, 2004. Guidelines for Drinking-Water Quality, Vol. 1. WHO Publishing, Geneva (Recommendations).
- Xu, Y., Wang, G., Yang, W., Li, R., 2010. Dynamics of the water bloom-forming *Microcystis* and its relationship with physicochemical factors in lake Xuanwu (China). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 1581–1590. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-010-0345-8>.
- Yoshida, M., Yoshida, T., Takashima, Y., Hosoda, N., Hiroishi, S., 2007. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 49–53. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00496.x>.
- Zhang, T., Gong, H., Wen, X., Lu, C., 2010. Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Plant Physiol.* 167, 951–958. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.12.020>.