

Neurotoxinas de una cianobacteria emergente en relación con sus depredadores potenciales

Maestría en Ciencias Biológicas Opción Ecología

Lic. Amelia Fabre



Defendida el 29 de setiembre de 2015

Neurotoxinas de una cianobacteria emergente en relación con sus depredadores potenciales

Lic. Amelia Fabre (ameliafabre@gmail.com)

Directora de tesis:

Dra. Sylvia Bonilla (sbon@fcien.edu.uy)

Co-directora de tesis:

Dra. Gissell Lacerot (glacerot@gmail.com)

Resumen

Las neurotoxinas producidas por cianobacterias (*i. e.* toxinas paralizantes de moluscos, PSP) impactan a organismos de distintos niveles tróficos, sin embargo su papel ecológico no ha sido elucidado. Para evaluar posibles papeles de las PSP en su interacción con depredadores, se determinaron, experimentalmente, efectos recíprocos entre *Cylindrospermopsis raciborskii* y sus depredadores. Además, para explorar la exposición de los depredadores a las neurotoxinas, se puso a punto un método de inmunofluorescencia *in situ* para visualizar al microscopio, la variante más tóxica de PSP (saxitoxina) dentro de las células de la cianobacteria. Se evaluaron cambios en la concentración de saxitoxina de una cepa local (MVCC19) a las 48 h de exposición indirecta a depredadores. Se determinó el efecto de dos cepas productoras de PSP (CYRF-01 y MVCC19) sobre la tasa de aclarado (TA, 3 h) de dos tipos de depredadores: no electivos (*Daphnia pulex*) y selectivos (*Notodiptomus iheringii* y *Argyrodiaptomus cf. bergui*). Se compararon la morfometría, fisiología y perfil de PSP (mediante HPLC) de MVCC19 y CYRF-01. Se determinó la supervivencia (48 h) de los depredadores a distintas concentraciones de MVCC19. Por primera vez se observó la distribución heterogénea de saxitoxina dentro de las células y entre filamentos de *C. raciborskii*, añadiendo un nivel de complejidad a la interacción cianobacteria-zooplancton. MVCC19 y CYRF-01 difirieron en su morfometría y en los análogos de PSP producidos, evidenciando diferentes ecotipos de la especie. La concentración de saxitoxina en MVCC19 estuvo asociada a su fase de crecimiento y no a la exposición indirecta a depredadores. MVCC19 disminuyó la TA de los depredadores, de forma similar para selectivos y no selectivos, pero no afectó su supervivencia, probablemente por la baja ingesta de cianobacterias que pudo deberse al tamaño del filamento. La saxitoxina no tendría un papel de defensa contra depredadores y estaría relacionada al crecimiento de la cianobacteria.

Abstract

Neurotoxins PSP (paralytic shellfish poison) impact different levels of freshwater trophic webs, however, their ecological role has not been elucidated yet. We run a series of experiments to evaluate possible ecological roles of saxitoxin (the most toxic variant of PSP) these molecules in the cyanobacteria-predator relationship. We tested the effects between the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its potential predators. We developed a new immune-fluorescence *in situ* technique to detect the toxin inside the cells. We evaluated changes in saxitoxin production in a local *C. raciborskii* strain (MVCC19), after 48 h of exposure to predator chemical signals. The effect of two PSP-producer strains (MVCC19 and CYRF-01) on the filtering rate (3 h) was determined for a non-selective (*Daphnia pulex*), and two selective (*Notodiaptomus iheringii* and *Argyrodiaptomus cf. bergii*) predators. Also, morphology, physiology and PSP profile (by HPLC) of both *C. raciborskii* strains were compared. We performed short-term experiments (48 h) to evaluate the survival of predators exposed to different concentration of MVCC19. Saxitoxin heterogeneous distribution inside cells and filaments was evidenced for the first time in this thesis, representing a new complexity level in cyanobacteria-zooplankton interaction. The procedure is simple and allows detection of intracellular saxitoxin in cyanobacteria filaments by confocal laser microscopy. The morphological and toxin profile differences between MVCC19 and CYRF-01 support the hypothesis of multiple ecotypes. Saxitoxin concentration in MVCC19 was related with the growth phase and no effects of the predator presence were found. MVCC19 decreased the clearance rate of selective and non-selective predators, but did not affect their survival rate, probably due to the length of the filaments that imperil their ingestion. There were no differences in the clearance rate between predator feeding modes, thus suggesting similar consequences of *C. raciborskii* to both types of predators. Our results do not support the hypothesis that saxitoxin has a defence role in *C. raciborskii* against predators.

Agradecimientos

Agradezco a mis orientadoras, Sylvia y Gige por acompañarme y guiarme durante la tesis. A Sylvia también por todos estos años de oportunidades y de trabajo juntas.

A todos los integrantes de la Sección Limnología, dónde se desarrolló gran parte del trabajo.

A Mariana Meerhoff, Carlos Iglesias y Renata Panosso por aceptar ser parte del tribunal.

A Claudia Piccini y el Laboratorio de Microbiología del IIBCE por su supervisión durante el trabajo con inmunofluorescencia. A Marcela Días por la ayuda con el microscopio confocal. A todos los compañeros del Laboratorio de Ecología Acuática de Juiz de Fora, en especial a Carol Soares por la orientación y acompañamiento, a Rafael Rodríguez de Paiva por ayudarme en los experimentos y explicarme todo mil veces, y a Marcela y Felipe por alojarme. A Valéria Freitas y los compañeros del laboratorio de la UFRJ por ayudarme con los análisis de toxinas y con mi estadía en Rio. A Macarena Pérez y Beatriz Brena, del Intituto de Higiene por realizar los análisis de toxinas.

A mamá por llevarme mil veces a coleccionar copépodos, a papá, Eli, Alberto, a la abuela por los abrazos de oso, tías y tíos, primas y primos, y a los amigos que son familia: Chechu, Eugi, Ana, Clau, Mirley, Liana, Vicky, Guada, Maia y Jacke. A los limno-amigos: Carne, Signe, Fati, Andre, Bruno, Fede, Marianita, Natalie y Nacho. A todas mis compañeras, compañeros y profes del Espacio, en especial a los Viajeros, Moni y Quili. A todos los que de una forma u otra conmigo en todo este tiempo e hicieron que esto fuera una realidad, entre ellos Luis, Caracas, Maite, Silvia M, Seba, Nati y Jhonny, Buni, Ana Inés, Graciela F y a mis sobrinas Emma, Serena y Emilia. Me agradezco a mí misma por seguir adelante y por tener tantas personas hermosas a quienes agradecer.

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Comisión Académica de Posgrado, el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA Biología) y la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, proyecto N° 3684).

CONTENIDO

1. Introducción	6
1.1. La problemática de las cianobacterias y las cianotoxinas	6
1.2. Localización de cianotoxinas	9
1.3. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , una cianobacteria emergente	10
2. Objetivo General	14
2.1. Objetivos específicos	14
3. Hipótesis y Predicciones	15
3.1. Hipótesis 1	15
3.2. Hipótesis 2	15
3.3 Hipótesis 3	¡Error! Marcador no definido.
4. Metodología	17
4.1. Organismos utilizados para los experimentos	17
4.2. Puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia para la detección de saxitoxina	18
4.3. Cambios en la concentración de saxitoxina por exposición indirecta de depredadores	21
4.4. Comparación de dos cepas tóxicas de <i>C. raciborskii</i>	23
4.5. Ensayos de tasa de aclarado	25
4.5.1. Ensayo de tasa de aclarado I	25
4.5.2. Ensayo de tasa de aclarado II	27
4.6. Ensayos de supervivencia del zooplancton frente a <i>C. raciborskii</i>	28
4.7. Análisis de datos	30
5. Resultados	32
5.1. Puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia para la detección de saxitoxina	32
5.2. Cambios en la concentración de saxitoxina por exposición indirecta de depredadores	34
5.3. Comparación de dos cepas tóxicas de <i>C. raciborskii</i>	37
5.4. Ensayos de tasa de aclarado	40
5.4.2. Ensayo de tasa de aclarado I	40
5.4.3. Ensayo de tasa de aclarado II	42
5.5. Ensayos de supervivencia del zooplancton frente a <i>C. raciborskii</i>	45
6. Discusión	46
6.1 Neurotoxinas en <i>C. raciborskii</i>	46
6.2 Concentración de neurotoxinas y presencia de señales químicas de depredadores	51
7 Conclusiones	57
Referencias	58
Anexo I	70

1. Introducción

1.1. Las cianobacterias y sus depredadores

Las cianobacterias son organismos procariotas que realizan fotosíntesis oxigénica y actualmente son causantes de diversas problemáticas ambientales (Whitton y Potts, 2000). En primer lugar, algunas especies desarrollan floraciones, aumentos importantes de su biomasa en un corto período de tiempo (Smayda, 1997). Dicho fenómeno es favorecido por la alta disponibilidad de nutrientes, por lo que están estrechamente relacionadas a la eutrofización (alta carga de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo) en sistemas lénticos (Whitton y Potts, 2000). La eutrofización es un fenómeno cada vez más frecuente en sistemas límnicos de todo el mundo (Huisman et al., 2005), incluyendo Uruguay (Bonilla, 2009) y el cambio climático agudizaría sus efectos a nivel global (Moss et al., 2011). Por lo tanto, es altamente probable que se intensifique la problemática de las floraciones de cianobacterias en las próximas décadas (Kosten et al., 2012).

Como consecuencia de las floraciones de cianobacterias, quedan restringidos los usos de los cuerpos de agua (*e.g.* potabilización de agua, recreación, pesca). Particularmente en Uruguay, se han registrado problemas en Montevideo (en 2013) y en Maldonado (en 2015) con el agua potable (Bonilla y Meerhoff, 2013). Además, la gran biomasa en descomposición puede ocasionar una disminución importante en los niveles de oxígeno del cuerpo de agua, provocando mortalidad de peces e invertebrados acuáticos (D'Agostino et al., 2014). Además de mal aspecto provocado por la biomasa, las cianobacterias liberan geosmina, un metabolito volátil que causa mal olor y sabor al agua (Chorus, 2012). Sin embargo, el mayor problema asociado a las floraciones de cianobacterias está relacionado a su capacidad de producir toxinas (cianotoxinas) altamente nocivas para los vertebrados (Chorus, 2012). Es por ello, que

las floraciones de cianobacterias no sólo constituyan un riesgo para la biota del ecosistema, sino también para la salud humana (Chorus y Bartram, 1999).

La naturaleza química de las cianotoxinas es variada y se clasifican según sus efectos en los mamíferos, en neurotoxinas, hepatotoxinas y dermatotoxinas, entre otras (Leflaive y Ten-Hage, 2007). A pesar de la gran cantidad de investigaciones sobre las cianotoxinas, aún no está claro su papel en la ecología de las cianobacterias, ni cuáles son los factores ambientales que regulan su producción (van Apeldoorn et al., 2007; Pearson et al., 2010; Antunes et al., 2012a). Se han planteado varias hipótesis, por ejemplo, se plantea que podrían ser parte del metabolismo normal de las células, sin un papel específico en la ecología del organismo (Leflaive y Ten-Hage, 2007). Además, dado el alto contenido de nitrógeno de muchas moléculas de cianotoxinas, éstas podrían constituir una reserva de nutrientes (Van de Waal et al., 2010, Shalev-Malul et al., 2008). Otras hipótesis proponen que las cianotoxinas tienen funciones de comunicación celular intra e interespecie (*quórum sensing*; Kaplan et al., 2012) o alelopáticos para afectar negativamente a posibles competidores (Leflaive y Ten-Hage, 2007; Antunes et al., 2012a). Otra hipótesis que actualmente está siendo ampliamente estudiada es que las toxinas tienen un papel de defensa contra sus depredadores (Wilson et al., 2006; Jang et al., 2007; Da Costa et al., 2013). A pesar de que las cianotoxinas son un carácter ancestral en las cianobacterias y surgieron antes que los propios depredadores, podrían haber adquirido un papel de defensa contra depredadores a lo largo de la evolución (Murray et al., 2010). Esta última hipótesis se apoya en numerosas evidencias de los efectos negativos del consumo de cianobacterias para el depredador. Se han observado efectos agudos sobre cladóceros, como parálisis corporal y muerte (Panosso et al., 2003; Ferraõ-Filho et al., 2008), y crónicos, que afectan los rasgos de su historia de vida (crecimiento poblacional, fecundidad y tamaño corporal; Wilson, 2006; Bednarska et al., 2014). Los efectos que se observan a corto y mediano plazo tienen luego, consecuencias a nivel de la comunidad de zooplancton, que disminuye en presencia de floraciones de cianobacterias (Whitton y Potts, 2000).

Por otro lado, las cianobacterias cuentan con estrategias de defensa contra sus depredadores, por ejemplo, son de gran tamaño y muchas presentan mucílago, por lo que son difícil de manipular e ingerir (Whitton y Potts, 2000). Además, otros mecanismos de defensa pueden ser inducidos por la presencia de depredadores o indirectamente por señales químicas de los mismos, como se han observado en plantas, animales terrestres (Tollrian y Harvell, 1999) y fitoplancton marino y de agua dulce (Van Donk et al., 2010). Por ejemplo, la clorofita *Scenedesmus acutus* pasa de ser unicelular a formar colonias y desarrolla espinas en presencia de señales químicas de *Daphnia magna* (Lürling y Van Donk, 2000). Para las cianobacterias en particular, se ha encontrado que *Microcystis aeruginosa* unicelular forma colonias pequeñas en presencia los ciliados *Ochromonas* sp., que son capaces de ingerir células individuales de la cianobacteria (Yang et al., 2006). Además, las cianotoxinas podrían ser una defensa inducible, se ha observado que tanto la presencia como la exposición indirecta a depredadores provoca un aumento en la producción de microcistinas por parte de *M. aeruginosa* y *Planktothrix agardhii* (Jang et al., 2003, 2007). Dichos resultados sobre inducción de microcistinas apoyarían la hipótesis de que las cianotoxinas puedan tener un papel de defensa contra depredadores.

Los principales depredadores de las cianobacterias planctónicas en los ecosistemas lénticos, son organismos pertenecientes al zooplancton, principalmente copépodos y cladóceros (Lampert y Sommer, 2007). Tanto copépodos como cladóceros son filtradores, por lo que su capacidad de ingesta de alimento (*e.g.* tasa de aclarado) está positivamente relacionada con su tamaño corporal y condicionada por la concentración y morfometría del alimento (Lampert y Sommer, 2007). A su vez, ambos grupos del zooplancton difieren en su estrategia de alimentación: los cladóceros son filtradores no selectivos, mientras que los copépodos son filtradores selectivos pudiendo rechazar partículas alimenticias por otras razones que aquellas relacionadas a su morfometría, como la calidad del alimento, o la presencia de toxinas (DeMott, 1988; revisado en Sommer y Stibor, 2002). Por ejemplo, se ha observado que el copépodo *Eudiaptomus gracilis* luego de 5 días de exposición a una dieta mixta de la

cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales) tóxica y una clorofita nutritiva (*Chlamydomonas*), aumenta el consumo de alimento no tóxico a la vez que disminuye su selectividad hacia la cianobacteria, evitando su ingesta (Ger et al., 2011). En cambio, los cladóceros, ingieren indistintamente organismos tóxicos y no tóxicos (Burns, 1968). Estas diferencias en el modo de alimentarse pueden resultar en una distinta exposición a las cianotoxinas a lo largo de la evolución. Dado que las interacciones depredador-presa implican cambios recíprocos en la fisiología de los organismos involucrados (Agrawal, 2001), una exposición más prolongada podría implicar cambios en la sensibilidad del zooplancton hacia organismos más resistentes (Ger et al., 2011). Sin embargo diferentes estudios son contradictorios al respecto, evidenciando que los efectos de las cianotoxinas pueden ser diferentes entre distintas cepas de cianobacterias y entre especies emparentadas del zooplancton.

1.2. Localización de las cianotoxinas

Un aspecto de la interacción entre cianobacterias tóxicas y zooplancton hasta ahora desconocido, son los relacionados a cómo el depredador percibe las cianotoxinas. No se conoce cómo se distribuye la toxina en las células de las cianobacterias ni dentro de la población. Hay pocos estudios al respecto, que revelan que dentro de una floración hay cepas tóxicas y no tóxicas de *Microcystis* (Kurmayer et al 2002). Además se ha observado, mediante técnicas inmunológicas (revelado con deposición de un compuesto coloreado) que la microcistina en *Ribularia* se localiza tanto en la células vegetativas como en los heterocitos y el mucílago (Marco et al., 2012). Profundizar en el conocimiento de la distribución de las cianotoxinas en las células y la población de otras especies de cianobacterias y otras toxinas, podrían ser un importante para comprender los resultados obtenidos en experimentos de interacción con sus depredadores (*e.g.* cambios en la tasas de aclarado del zooplancton, inducción de la producción de cianotoxinas por parte de la cianobacteria). Los métodos más

utilizados para detectar y cuantificar cianotoxinas son el análisis de inmunofluorescencia ligado a enzimas (ELISA) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Ambos, son altamente específicos y, en especial el HPLC, tiene costos elevados y ninguno permite la localización de las cianotoxinas dentro de las células. En otros campos de la ciencia, se han aplicado técnicas de inmunofluorescencia *in situ* que permiten visualizar moléculas específicas dentro de células u organismos. A grandes rasgos, la técnica consiste en marcar la molécula de estudio con un anticuerpo ligado a un fluoróforo. Luego, el fluoróforo se revela mediante microscopía confocal, lo que permite detectar fluorescencia en el lugar exacto donde está presente la molécula de estudio (Moyes, 2009). Por ejemplo, esta técnica fue utilizada en un estudio sobre los efectos de contaminantes en el crecimiento y la reproducción de poliquetos, permitiendo la evaluación de cambios moleculares en las células debido a estos contaminantes (García-Alonso et al., 2011). Además, la técnica de inmunofluorescencia *in situ* tiene la ventaja de ser de bajo costo, alta especificidad, sencilla y rápida de realizar. Una técnica similar permitiría revelar la localización exacta de las cianotoxinas en las células de las cianobacterias, y dentro de organismos que se alimenten de ellas. Innovar en las técnicas de detección de cianotoxinas permitiría entonces explorar aspectos hasta ahora desconocidos de la interacción entre las cianobacterias tóxicas y sus depredadores. Además, se podrá ampliar la aplicabilidad de la técnica a otros organismos del fitoplancton y del zooplancton, incluyendo aquellos que potencialmente bioacumulan la toxina (Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011). Por lo tanto, dicha herramienta es de gran interés tanto para el campo de la ecología como el de la ecotoxicología relacionada a cianobacterias.

1.3. *Cylindrospermopsis raciborskii*, una cianobacteria emergente

Dentro de las cianobacterias, una de las especies más estudiadas es *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wołoszyńska) Seenaya et Subba Raju (1972). Esta cianobacteria es ampliamente estudiada por ser considerada emergente (Morse y Hughes, 1996) debido a la rápida

expansión de su distribución geográfica en los últimos años (Antunes et al., 2012b; Wood et al., 2014), y por ser frecuentemente tóxica (Mehnert et al., 2010; Vasconcelos, 2015). Es una especie filamentosa (largo del tricoma entre 12 a 300 μm ; Vidal y Kruk, 2008) del Orden Nostocales dado que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico para utilizarlo como nutriente y generar células de resistencia. Utilizar nitrógeno atmosférico podría constituir una ventaja competitiva para la especie (Reynolds, 1984), a pesar de que el proceso fisiológico involucrado es energéticamente costoso (Ferber et al., 2004). En Uruguay, dicha especie ya ha sido registrada en ecosistemas acuáticos destinados a la potabilización y recreación (Vidal y Kruk, 2008; Fabre et al., 2010; Bonilla et al., 2012), por lo que el estudio de su ecofisiología adquiere especial relevancia a nivel local.

Cylindrospermopsis raciborskii originalmente fue descrita como una especie tropical, sin embargo, hoy en día desarrolla floraciones en sistemas acuáticos en diferentes regiones del mundo incluyendo subtropicales y templadas (Padisák, 1997; Briand et al., 2004; Kaplan et al., 2012). La expansión hacia regiones templadas estaría favorecida por el aumento de la temperatura debido al cambio climático (Wiedner et al., 2007; Sinha et al., 2012). El éxito de la expansión de *C. raciborskii* hacia climas templados no está claro aún, aunque se han planteado varias hipótesis. Una de ellas, es que la especie presenta gran plasticidad fenotípica que le permite aclimatarse a diferentes condiciones ambientales, como ajustar la concentración de pigmentos frente a distintas condiciones de intensidad lumínica (Fabre, 2011) y modificar la tasa de captación de fósforo según la disponibilidad en el ambiente (Amaral et al., 2014). Otro aspecto que podría ser clave en el éxito de expansión de *C. raciborskii* es la existencia de ecotipos (Chonudomkul et al., 2004; Piccini et al., 2011). Los ecotipos son poblaciones de la misma especie que difieren en su fenotipo debido a adaptaciones evolutivas a su ambiente particular (Begon, 2006). Dado que los microorganismos en general tienen alta tasa de mutación en las secuencias intergénicas, cada ecotipo se corresponde con un cluster filogenético o cepa (Giovannoni y Stingl, 2005; Cohan, 2006). En el caso particular de *C. raciborskii* también se ha observado dicha correspondencia

(Piccini et al., 2011) y además, que varias cepas de la especie diferían en sus preferencias lumínicas, constituyendo ecotipos diferentes (en Fabre, 2011).

Las toxinas que puede producir *C. raciborskii* son diversas, y parecen estar relacionadas con su distribución geográfica. En Europa y Australia las poblaciones de *C. raciborskii* producen la citotoxina cilindrospermopsina (Haande et al., 2008, Yilmaz et al., 2008; Sinha et al., 2014), mientras que en Norteamérica, generalmente no son tóxicas (Stucken et al., 2009). Por último, en África y Sudamérica las cepas de esta especie producen toxinas paralizantes PSP (de su nombre en inglés, “paralytic shellfish poisons toxins”; Lagos et al., 1999, Piccini et al., 2011). Las PSP son un grupo de neurotoxinas inicialmente descritas para especies de dinoflagelados causantes de mareas rojas e incluye la saxitoxina y sus análogos de menor toxicidad (Chorus y Bartram, 1998). Este grupo de cianotoxinas son alcaloides que bloquean los canales de sodio de las células nerviosas inhibiendo el potencial de acción. Constituyen un grupo de más de 57 variantes que difieren en los residuos moleculares unidos a un núcleo común (Wiese et al., 2010). Dichos residuos moleculares pueden ser: no sulfatados (saxitoxina, STX y neo-saxitoxina, NEO), mono -sulfatados (gonyautoxins, GTXs), di-sulfatados (C-toxinas) o tener ausente el grupo carbamoíl (dc-toxinas). Cada análogo de PSP presenta diferente afinidad por los residuos aminoacídicos del canal de sodio de las células nerviosas y tiene una ruta metabólica diferente. Estas diferencias hacen que la toxicidad sea diferente para cada análogo, siendo STX la de mayor toxicidad y por ello la más estudiada (LD_{50} intraperitoneal para ratón 8-10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; Strichartz et al., 1984; Deeds et al., 2008). Las PSP pueden causar parálisis y posterior muerte de animales por exposición directa, por ejemplo al zooplancton, o bioacumularse y alcanzar altas concentraciones en los tejidos de animales expuestos que no son gravemente afectados (Havens, 2008). Mediante la bioacumulación, dichas toxinas llegan a niveles superiores de la cadena trófica como peces, animales terrestres, aves y el hombre (Havens, 2008; Galvão et al., 2009). Dado que las consecuencias de las neurotoxinas pueden alcanzar a toda la trama trófica, éstas son consideradas como “moléculas clave” (Zimmer y Ferrer, 2007; Derby y Aggio, 2011).

Dos cepas uruguayas de *C. raciborskii* (MVCC14 y MVCC19) han sido ampliamente estudiadas en la Sección Limnología, Facultad de Ciencias, UdelaR. Se ha determinado que dichas cepas producen altas concentraciones de goniautoxinas GTX 2 y 3 (Piccini et al., 2011). Además se ha observado que en la cepa MVCC19 la expresión de genes relacionados a la producción de saxitoxina aumenta en fases de crecimiento tempranas, independientemente de los nutrientes disponibles (Vico et al., 2012; Martigani, 2012). En otro trabajo, se demostró que ambas cepas uruguayas disminuyen la sobrevivencia de neonatos de *Daphnia pulex* (cladóceros) en bioensayos de exposición aguda (48 horas; González et al., en preparación).

Dado el contexto regional y mundial en relación a *C. raciborskii*, profundizar en el perfil de toxinas de poblaciones uruguayas de esta especie (las variantes de PSP producidas en un momento dado y su concentración relativa) aportaría información relevante sobre nuestros ecosistemas acuáticos. Además la comparación de las cepas uruguayas con otras cepas de la región, permitiría evaluar las diferentes hipótesis sobre los factores que favorecen la expansión de la especie. En este sentido, es importante realizar experimentos de laboratorio sobre la interacción entre *C. raciborskii* y zooplancton de distintas especies y regiones, para evaluar el posible papel de las cianotoxinas como defensa contra depredadores. De esta forma se amplía el conocimiento sobre la dinámica depredador-presa en la producción de cianotoxinas.

2. Objetivo General

Determinar los efectos recíprocos entre la producción de saxitoxina de una cepa de *C. raciborskii* y dos depredadores potenciales, y poner a punto una técnica de inmunofluorescencia *in situ* que permita la detección de toxinas dentro de la cianobacteria.

2.1. Objetivos específicos

- 1) Puesta a punto de una técnica cualitativa de inmunofluorescencia *in situ* para la detección, al microscopio, de saxitoxina dentro de la cianobacteria.
- 2) Determinar si existen cambios en la producción de saxitoxina por parte de MVCC19 expuesta indirectamente a depredadores potenciales.
- 3) Comparar dos cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* productoras de PSP en cuanto a su morfometría y perfil de toxinas.
- 4) Determinar el efecto de dos cepas productoras de PSP, sobre la tasa de aclarado de un clon de cladóceros y tres poblaciones de copépodos, respecto a clorofitas palatables.
- 5) Determinar el efecto de MVCC19 sobre la supervivencia de un clon de cladóceros y dos poblaciones de copépodos.

3. Hipótesis y Predicciones

3.1. Hipótesis 1

Se ha evaluado que la producción de la cianotoxina microcistina producida por *Microcystis aeruginosa* y por *Planktothrix agardhii* aumenta en presencia de dos depredadores (cladóceros) mediante exposición indirecta y directa (Jang et al., 2003 y 2007). Sin embargo, no se han realizado estudios que vinculen la producción de las cianotoxinas PSP, y en particular su variante saxitoxina, por parte de cianobacterias y sus depredadores potenciales. En este contexto se plantea la hipótesis H1:

La concentración de cianotoxinas producida por las células de C. raciborskii aumenta por la presión por depredación ejercida por el zooplancton.

Predicción 1: La concentración de la saxitoxina producida por la cepa MVCC19 de *C. raciborskii* aumenta por la exposición a señales químicas de los depredadores potenciales.

3.2. Hipótesis 2

Los efectos de las PSP a corto plazo (pocas horas) incluyen provocar parálisis total o parcial de cladóceros y con ello modificar su tasa de aclarado (Panosso y Lüring 2010; Ferrão-Filho et al., 2010). A su vez, los depredadores no selectivos podrían haber desarrollado cierta resistencia por haber estado más expuestos a estas moléculas a lo largo de la evolución (Ger et al., 2010). En este contexto, se plantea la hipótesis H2:

Los efectos de las cianotoxinas producidas por C. raciborskii sobre la tasa de aclarado de los depredadores varían dependiendo de su condición de filtradores selectivos o no selectivos.

Predicción 2: La tasa de aclarado de los depredadores sobre las cepas tóxicas MVCC19 y CYRF-01 serán menores que sobre clorofitas palatables.

Predicción 3: La tasa de aclarado de los depredadores selectivos sobre la cepa tóxica MVCC19 será menor a la de los depredadores no selectivos.

3.3. Hipótesis 3

A corto plazo (48 h), las cianotoxinas PSP pueden provocar la muerte de los depredadores y a más largo plazo (semanas o meses) alterar el crecimiento de la población (Soares et al., 2009a). A su vez, distintos depredadores podrían variar en la sensibilidad a las cianotoxinas dependiendo de su exposición a las mismas durante la evolución (Ger et al., 2014), por lo que se plantea la hipótesis H3:

Los efectos de las cianotoxinas de C. raciborskii sobre la supervivencia de los depredadores varían dependiendo de su condición de filtradores selectivos o no selectivos.

Predicción 1: la cepa MVCC19 productora de saxitoxina tiene efectos negativos sobre la supervivencia de depredadores selectivos y no selectivos.

Predicción 2: La supervivencia de los depredadores selectivos es menor a la de los no selectivos en presencia de la cepa MVCC19.

4. Metodología

4.1. Organismos utilizados para los experimentos

Se utilizaron 3 cepas de la especie *Cylindrospermopsis raciborskii* identificadas como MVCC19, CYRF-01 y LB2897. La cepa local MVCC19 forma parte de la colección de la Sección Limnología (Fac. de Ciencias-UdelaR), dónde se desarrolló mayormente el trabajo, mientras que la cepa CYRF-01 fue gentilmente provista por el Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactéria (UFRJ, Brasil). Las cepas MVCC19 y CYRF-01 son productoras de PSP (Ferrão-Filho et al., 2010; Piccini et al., 2011) y fueron aisladas de ecosistemas lénticos eutrofizados (Tabla 4.1). Se incluyeron dos cepas tóxicas para comparar sus efectos sobre la tasa de aclarado de los depredadores (apartado 2.5.1). La cepa comercial LB2897 (UTEX) fue aislada del lago Lemon en Estados Unidos (Clark y Jones, 2006; Yilmaz y Philips, 2011), y dado que no produce toxinas (Cremella, 2014) fue utilizada como un control negativo a la presencia de toxinas en los experimentos de tasa de aclarado (apartado 4.5.2).

Se utilizaron clorofitas unicelulares como alimento palatable para los cultivos de zooplancton (DeMott y Moxter, 1991) y como control en los experimentos de tasa de aclarado. Las clorofitas utilizadas fueron *Scenedesmus* sp., que es parte del cepario de la Sección Limnología desde 2011, y dos cepas de *Chlamydomonas*: *C. reinardhii* (B2246, UTEX) y *C. chlorastera* (Ettl N°009; provista por el Laboratorio de Ecología Acuática de la UFJF, Brasil). Como depredadores se utilizaron: un cladóceros como filtrador no selectivo y tres poblaciones de copépodos calanoides como filtradores selectivos. El cladóceros fue un clon de *Daphnia pulex* (DAPA, Sec. Limnología) y las poblaciones de calanoides fueron: *Notodiaptomus iheringii* del Lago Manacás (Estado de Minas Gerais, Brasil) y *Argyrodiaptomus* cf. *bergei* de los lagos de canteras de areneras del Departamento de Colonia, Uruguay, Ferrando (población

1; 34° 28'S, 57° 49'W) y Riachuelo (población 2; 34° 26'S, 57°43'W). El lago Manacás (21° 45' S, 43° 21' W) tiene 2 ha de superficie y una profundidad máxima de 5 m. El fitoplancton está generalmente dominado por Chlorophyceae y se ha detectado una floración de una cianobacteria no productora de saxitoxina, *Limnothrix bicudo* (Soares et al., 2009b). Las canteras de Ferrando y Riachuelo son lagos artificiales pequeños (0,14 ha Ferrando y 0,03 ha Riachuelo), oligotróficos (fósforo total = 21,2 ± 1,2 µg l⁻¹ Ferrando y 24,6 ± 10,9 µg l⁻¹ Riachuelo, Método de Murphy y Rilley, 1962) sin presencia de cianobacterias productoras de saxitoxinas; determinado en esta tesis.

Tabla 4.1. Características geográficas y ambientales de los ecosistemas acuáticos donde fueron aisladas las cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* utilizadas en este trabajo. Se presentan media y máxima entre paréntesis de la profundidad y el rango para la temperatura del agua (mínima - máxima) (Soares et al., 2009c; Fabre et al., 2010 y Somma, 2014).

Cepa	CYRF-01	MVCC19
País	Brasil	Uruguay
Coordenadas	22°43'S - 22°46'S, 44°30'W - 44°60'W	34°51'S, 56°02'W
Área (ha)	40,0	23,5
Profundidad (m)	22,0 (70)	3,5 (11)
Temperatura (°C)	20,0 - 30,0	10,5 - 24,9
Estado trófico	Hipereutrófico	Eutrófico
Floraciones	Frecuentes	Frecuentes
Especies dominantes	<i>C. raciborskii</i> <i>M. aeruginosa</i>	<i>C. raciborskii</i> <i>P. agardhii</i>

4.2. Puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia para la detección de saxitoxina

La técnica de inmunofluorescencia *in situ* consiste en ligar un anticuerpo a la molécula blanco y luego evidenciar su posición mediante un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo (Fig. 4.1). Para el objetivo específico 1 *puesta a punto de una técnica cualitativa de inmunofluorescencia in situ para la detección, al microscopio, de saxitoxina dentro de la cianobacteria* se utilizó la cepa MVCC19 y la metodología se basó en Pernthaler et al. (2002).

Se partió de cultivos de MVCC19 con densidad óptica de entre 0,25 y 0,30 UA aprox., en crecimiento estacionario, cultivada a 26 ± 2 °C, en medio BG11 modificado para tener 25 %

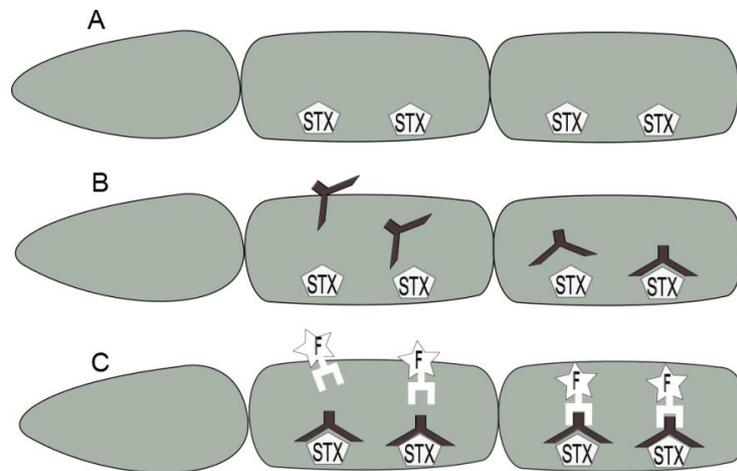


Figura 4.1. Técnica de inmunofluorescencia. A) Representación esquemática de las células de la cianobacteria productora de saxitoxina (hexágonos blancos, STX), B) durante la incubación con anticuerpo primario (anti-STX, gris oscuro), éstas moléculas penetran a la célula y se unen a las moléculas de saxitoxinas dentro de la célula. C) durante la incubación con la solución de anticuerpo secundario (anti-anticuerpo primario; blanco) ligado a un fluoróforo (estrella, “F”), se une a los anticuerpos primarios unidos a STX. La presencia del fluorocromo dentro de las células fue luego determinada con microscopía confocal.

del CuSO_4 de la receta original ($16,7 \text{ mg l}^{-1}$ de PO_4 Stanier et al., 1971), $32 \pm 5 \text{ } \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y agitación manual diaria. Se filtraron 300 μl de cultivo junto con 1 ml de PBS 1X (buffer solución salina-fosfato, 140 mM NaCl, 3 mM KH_2PO_4 , 11 mM Na_2HPO_4 , pH = 7,2) por filtros Millipore GTTP 0,22 μm . Luego se embebieron los filtros en agarosa (1% vol/vol en agua ultra pura) y se dejaron secar boca abajo sobre lámina plástica, a 37 °C. La incubación con el anticuerpo primario (anti-STX policlonal de conejo, del kit comercial para STX Abraxis) se realizó a 37 °C, en cámara húmeda colocando la solución con el anticuerpo primario directamente sobre los filtros. Al finalizar se lavaron con bloqueante, PBS/BSA 2% (PBS 1X, seroalbúmina bobina 2g/ml) y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-

conejo ligado a FITC, dilución 1/1000 en bloqueante) durante 30 min a 19-22 °C (temperatura ambiente del laboratorio). Luego se lavaron con PBS 1X durante 15 min en oscuridad, a 19-22 °C, luego con agua ultrapura y por último con etanol 95 %. Para contar con un marcador molecular general de las células se realizó tinción DAPI ($1 \mu\text{g l}^{-1}$ en PBS 1X, incubado durante 5 min a 19-22 °C, y posterior lavado con agua destilada; Porter y Feig, 1980). El montaje se realizó con Citifluor y se observó en microscopio confocal (Olympus fv300 con el software Fluoview), con objetivo de 60x de inmersión en aceite (apertura numérica 1,42). Se utilizaron los láseres: con excitación a 596 nm y emisión a 620nm para clorofila *a* (picos excitación/emisión 429 y 665/665 y 722); con excitación a 330-385 nm y emisión a 420 nm para revelar DAPI y láser con excitación a 460-495 y nm emisión a 510-550 nm para FITC (picos de excitación/emisión 494/518 nm). Como controles negativos se utilizaron filtros con MVCC19 sin la incubación con anticuerpo primario y filtros con la cepa control LB2897, que no produce STX.

Se ensayaron distintos protocolos para optimizar la penetración del anticuerpo a la célula: fijación de las células, de permeabilización de la membrana y distintos tiempos de incubación del anticuerpo primario. Respecto a la permeabilización de la membrana, se ensayaron: sin permeabilizar; Lisozima (10 mg l^{-1} en EDTA 0,05 M, Tris 0,1 M) durante 30, 40 ó 60 min a 37 °C; Proteinasa K ($0,09 \text{ U ml}^{-1}$, durante 15 min a 37 °C). Además, se realizaron pruebas con distintos métodos de fijación de las células: sin fijación y con fijación a 1 y 2 % de PFA (paraformaldehído) durante 30 min, 1 h o al menos 8 h. Los tiempos de incubación del anticuerpo primario ensayados fueron entre 3 y 5 h y entre 8 y 9 h.

Luego de establecidos la fijación, permeabilización y tiempo de incubación, se añadió al protocolo la amplificación de la señal por reacción de la tiramida, CARD (de su nombre en inglés “catalyzed reporter deposition”, modificado de Hunyady et al., (1996). Se utilizó un anticuerpo secundario de caballo anti-conejo ligado a HRP (peroxidasa de rábano picante, de

su nombre en inglés horseradish peroxidase, Invitrogen G21234). Al protocolo general se incluyó, luego del secado del agarosa, la incubación en HCl 0,01 M, 15 min, a 19-22 °C, para inhibir las peroxidases propias de las células. Luego, se lavó el HCl con 3 lavados con agua ultra pura. El sustrato pasa a ser: 1/1000 tiramida-FITC (de su nombre en inglés para isotiocianato de fluoresceína) en buffer de amplificación con H₂O₂ (30%), en oscuridad, durante 15 min a 37°C. El revelado se realizó en microscopio confocal (Leica TCS SP5 y software LAS-AF suite). El microscopio estaba equipado con los mismos láseres de 543 y 488 nm. Las imágenes fueron analizadas en 3 dimensiones mediante un escaneo del plano ortogonal (Z) cada 0,21 µm. Como controles negativos de las imágenes, se utilizaron filtros con MVCC19 sin la incubación con anticuerpo primario, realizadas simultáneamente al tratamiento. Por lo tanto, solo es posible observar fluorescencia en aquellos tratamientos donde la misma superaba la fluorescencia de base del sustrato.

4.3. Cambios en la concentración de saxitoxina por exposición indirecta de depredadores

Para el objetivo específico 2 *Determinar si existen cambios en la producción de saxitoxina por parte de MVCC19 expuesta indirectamente a depredadores potenciales* (hipótesis 2) se utilizaron como depredadores potenciales: *D. pulex* y *Argyrodiaptomus* cf. *bergei*. La cepa MVCC19 fue cultivada en medio BG11 modificado para tener 25 % del CuSO₄ de la receta original (16,7 mg l⁻¹ de PO₄ Stanier et al., 1971), 32 ± 5 µmol fotón m⁻² s⁻¹, fotoperíodo 16:8 h, 26 ± 2 °C, con agitación manual diaria. Para generar las señales químicas de los depredadores, el zooplancton fue cultivado durante 4 días en agua de clorada estéril, a 20 µmol fotón m² s⁻¹, 16:8 h luz:oscuridad, y 19 ± 3 °C, alimentados con *C. reinardhii* (Jang et al., 2003; Lurling y Beekman, 2006; Fig. 4.2). *Argyrodiaptomus* cf. *bergei* y *D. pulex* se cultivaron por separado a una densidad de 80 ind l⁻¹ (Jang et al., 2007). Luego, se filtró el agua de dichos cultivos (Millipore estéril 0,22 µm de poro) y se le agregó a cultivos de MVCC19 (en crecimiento exponencial) en proporción 50:50 (cultivo de zooplancton:cultivo

de cianobacteria), el volumen final fue de 60 ml y se utilizaron matraces de 125 ml. Como control se utilizó agua de cloroada estéril filtrada de la misma manera que el agua de cultivo de zooplancton. Los experimentos duraron 48 h, tuvieron 4 réplicas y se realizaron en las mismas condiciones que el cultivo de MVCC19 a 32 ± 2 °C en el experimento I y a 26 ± 2 °C en el experimento II.

Como indicador del estado fisiológico de los cultivos y para evaluar posibles efectos del crecimiento de *C. raciborskii* sobre la producción de toxinas, se determinó la tasa de crecimiento de cada réplica mediante densidad óptica (*DO*) determinada como la absorbancia a 750 nm, como:

$$\mu = a = [\ln(DO_f) - \ln(DO_i)]t^{-1}$$

Dónde: Ln es el logaritmo neperiano, DO_i y DO_f son la densidad óptica a tiempo inicial y final respectivamente y *t* es el tiempo total. A tiempo final de los experimentos, se determinó la concentración de saxitoxina (Kit ELISA para STX, Abraxis). Se realizaron conteos para calcular la concentración de STX por célula, en cámara Sedgewick-Rafter de 1 ml, contando 8 campos al azar. Además para calcular la concentración de saxitoxina por unidad de volumen de cianobacteria (STX μm^{-3}) se determinó el volumen de los tricomas (30 medidas por réplica), y de las células (10-15 medidas por réplica; Hillebrand et al., 1999). Para evaluar posibles efectos del agregado de nutrientes de los cultivos de zooplancton sobre la concentración de toxina, a tiempo final del experimento II, se determinaron las concentraciones de nitrato (NO_3 , método de Murphy y Rilley, 1962) y fosfato (PRS, método de Müller y Widemann, 1995).

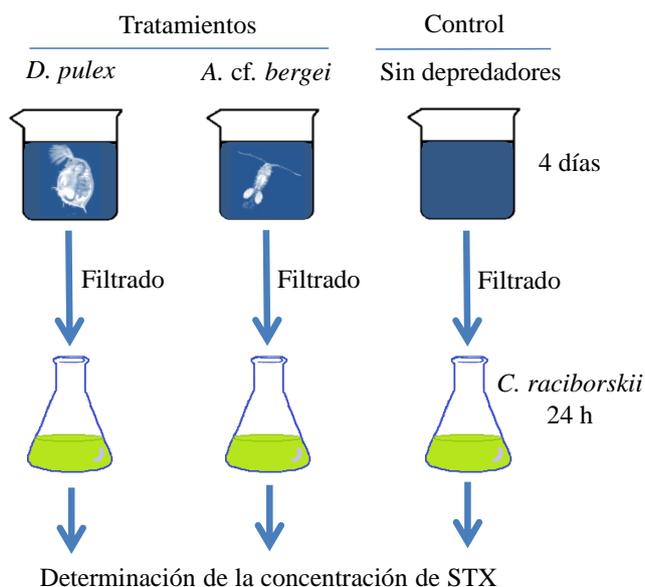


Fig. 4.2. Diagrama del diseño experimental para determinar los cambios en la concentración de saxitoxina (STX) en exposición indirecta a depredadores (*D. pulex* y *A. cf. bergei*). Se cultivaron los depredadores durante 4 días, luego el filtrado del agua de cultivo fue agregado a cultivos de *C. raciborskii* y finalmente, a las 48 h, se determinó la concentración de STX en los cultivos de la cianobacteria.

4.4. Comparación de dos cepas tóxicas de *C. raciborskii*

Para el objetivo específico 3 “Comparar dos cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* productoras de PSP” se compararon las cepas MVCC19 y CYRF-01 en su crecimiento, morfometría, perfil de toxinas y toxicidad.

Para caracterizar el patrón de crecimiento de ambas cepas se partió de sus cultivos madre a 24 ± 2 °C, 25 ± 2 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12:12 h L:D, en medio WC (Lürling y Beekman 2006). A partir de los cultivos madre se realizaron sub-cultivos por triplicado en las mismas condiciones de luz y temperatura, partiendo de una concentración de $3,3 \times 10^4$ cél ml^{-1} . El crecimiento de los sub-cultivos fue seguido durante 14 días como describe el apartado 4.3. Luego, a los datos de cada cepa, se ajustó una función sigmoidea y se estimó la duración de la fase de crecimiento exponencial, como el tiempo durante el cual $\text{Ln}(DO)$ presentaba una

relación lineal (testado con regresión lineal). Las morfometrías de cada una se caracterizó mediante microscopía óptica, durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo. Se determinaron el largo de la dimensión máxima del tricoma (LDM, 60 tricomas de cada cepa) y el largo y ancho de las células (20 células de cada cepa). Luego se calculó el biovolumen de las células y los tricomas mediante aproximaciones geométricas (Hillebrand et al., 1999).

Para determinar el perfil de PSP, MVCC19 y CYRF-01 fueron cultivadas a 24 ± 2 °C, 25 ± 2 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 12:12 h L:D, en medio WC (Lürling y Beekman 2006). Se utilizaron cultivos en distintas fases de crecimiento: crecimiento exponencial tardía (cultivo de 8 días, 2 réplicas) y crecimiento exponencial temprana (cultivo de 5 días, 3 réplicas) para MVCC19 y tardía (cultivo de 8 días, 3 réplicas) para CYRF-01. Las muestras fueron filtradas (filtros Millipore con tamaño de poro de 0,7 μm) y congeladas a -80 °C desde el momento del filtrado hasta su análisis. El perfil de toxinas fue determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, sigla de su nombre en inglés “High Performance Liquid Chromatography”) en el Laboratorio de Ecofisiología e Toxicología de Cianobacterias, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil (Anexo I). Se calculó la concentración de cada análogo de toxina por célula ($\mu\text{g análogo cél}^{-1}$) para cada fase de crecimiento a partir de conteos y mediciones al microscopio. A partir de la concentración de análogos por célula, se calculó la toxicidad de cada cepa a partir de coeficientes de equivalencia de STX (eq STX), siendo el equivalente para STX = 1; NEO = 0,92; GTX1 = 0,99; GTX2 = 0,36; GTX3 = 0,64; GTX4 = 0,73; Lukas et al., 2004). Luego, la toxicidad se expresó en términos de equivalentes de saxitoxina por célula (eq STX cél^{-1}).

4.5. Ensayos de tasa de aclarado

4.5.1. Ensayo de tasa de aclarado I

Para el objetivo específico 4 (*Determinar el efecto de dos cepas productoras de PSP, sobre la tasa de aclarado de un clon de cladóceros y tres poblaciones de copépodos, respecto a clorofitas palatables*) se evaluó la tasa de aclarado (TA) de una población de *N. iheringii* (Manacás) y un clon de *D. pulex* (Uruguay) (Tabla 4.2; Fig. 4.3) a distintas concentraciones de alimento palatable (*C. chlorastera*) y de las cepas tóxicas MVCC19 y CYRF-01 (en colaboración con Tesis de Maestría, Rodrigues de Paiva, 2014).

Los cultivos stocks de MVCC19 y CYRF-01 y *C. chlorastera* se realizaron en medio WC (Lürling y Beekman, 2006), con ciclo de 12:12 h de luz:oscuridad, a 24 ± 2 °C y 25 ± 2 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los cultivos de zooplancton se mantuvieron en agua mineral comercial estéril, a 20 ± 2 °C, con ciclo de luz natural, entre 20 y 30 ind l^{-1} , alimentados con *C. chlorastera*. *Daphnia pulex* fue alimentada además con levadura comercial, *Saccharomyces cerevisiae*, 17 g l^{-1} . La población de *N. iheringii* fue colectada una semana antes del experimento y mantenida en las condiciones de laboratorio para su aclimatación. Los cultivos de zooplancton no fueron alimentados durante las 24 h previas al experimento para evitar diferencias en la tasa de aclarado debido al contenido de alimento en el aparato digestivo. Ambas cepas de *C. raciborskii* fueron utilizadas en crecimiento exponencial.

Los experimentos fueron realizados en placas de acrílico multipozas (pozas de 3 ml) con 2,5 ml de suspensión de alimento, durante 2,5 a 3 h, a 20 ± 2 °C, en oscuridad, con 4 réplicas. En cada poza se colocaron 2 adultos de *D. pulex* sin huevos (72 h de vida; similar densidad a Panosso y Lürling, 2010) ó 3 adultos sin huevos de *N. iheringii* (densidad similar a la utilizada para *D. pulex*). Los tratamientos consistieron en utilizar MVCC19 ó CYRF-01 como

alimento, mientras que para el control se utilizó *C. chlorastera*. Las concentraciones de alimento ensayadas para *D. pulex* fueron 0,5; 1,5 y 5 mg C l⁻¹ (similar a Soares et al., 2009) y para *N. iheringii* fueron 0,125; 0,25; 0,375; 0,5 y 1 mg C l⁻¹ (similar a Kâ et al., 2012). La concentración de carbono (C, mg C l⁻¹) fue calculada a partir del volumen de las células (v , μm^3) como: $C = v a^b$; donde $a = 0,1204$ y $b = 1,051$ (Rocha y Duncan, 1985). La TA se definió como el volumen que un individuo limpia de células por hora ($\text{ml ind}^{-1} \text{h}^{-1}$) y fue calculada a partir de la concentración de clorofila a (Cl_a). Los cálculos se realizaron de acuerdo a Lürling y Vaschoor (2003):

$$TA = (b - a)VN^{-1}$$

Dónde: $b = [\text{Ln}(Cl_{a_{cf}}) - \text{Ln}(Cl_{a_{ci}})]t^{-1}$ y $a = [\text{Ln}(Cl_{a_{Tf}}) - \text{Ln}(Cl_{a_{Ti}})]t^{-1}$

$Cl_{a_{cf}}$ y $Cl_{a_{ci}}$ son las concentraciones de clorofila a en el control (sin zooplancton) a tiempo final e inicial del experimento respectivamente. $Cl_{a_{Tf}}$ y $Cl_{a_{Ti}}$ son las concentraciones de clorofila a en los tratamientos (con zooplancton), a tiempos inicial y final respectivamente. t representa el tiempo en horas y V el volumen de suspensión de alimento en el experimento (en ml) y N el número de animales por poza. La fluorescencia de la clorofila a *in vivo* fue determinada mediante PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, US-SQS; programa Phyto-Win V 1.45; rango de detección de clorofila a : 0,3-300 $\mu\text{g l}^{-1}$). Cada valor de concentración fue corregido por el valor de fluorescencia del agua luego de remover la suspensión algal por filtración por 1,2 μm (filtros estériles, Millipore). A tiempo final los animales fueron fijados con formol neutralizado al 4% y se determinó cada largo individual (L , en mm) al microscopio óptico para luego calcular el peso seco (PS , en μg) según las siguientes regresiones de largo-peso citadas en Bottrell et al., (1976): para copépodos calanoides:

$PS = 1,2431 + 2,2634 \ln(L)$ y para *Daphnia* sp. (de neonatos a adultos): $PS = 1,6 + 2,834 \ln(L)$.

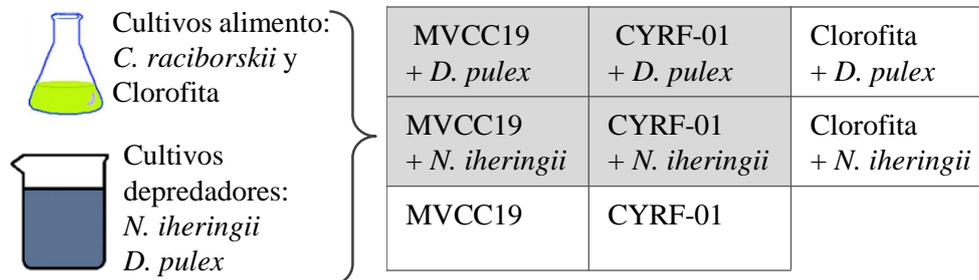


Figura 4.3. Diagrama de los experimentos de tasa de aclarado I. Por un lado se cultivaron, como alimento, dos cepas de *C. raciborskii* tóxicas (MVCC19 y CYRF-01) y una clorofita como control. Por otro lado se cultivaron los depredadores (*N. iheringii* y *D. pulex*). Luego, se combinaron alimentos y depredadores en placas multipozas (controles en blanco y tratamientos en gris).

4.5.2. Ensayo de tasa de aclarado II

Para continuar con el objetivo específico 3, se comparó la TA de un depredador selectivo y otro no selectivo sobre una cepa tóxica (MVCC19) y una cepa no tóxica (LB2987) de *C. raciborskii*. Se utilizó un diseño experimental igual al del apartado 4.5.1 pero se utilizó sólo la concentración óptima de alimento.

Previo a los experimentos, *C. raciborskii* y las clorofitas fueron cultivados como se indica en la sección 4.3. Los cultivos de zooplancton fueron alimentados con *C. reinhardtii* y mantenidos en agua deionada estéril, a $15 \pm 2 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Se realizaron con el clon de *D. pulex* y una población del calanoide *Argyrodiaptomus* cf. *bergei* (población 1, apartado 4.1) utilizando como alimento MVVCC19 y LB2897 como tratamientos y *Chlamydomonas reinhardtii* (experimento “a”). Además se realizó otro experimento (experimento “b”) utilizando otra alga palatable como control (*Scenedesmus* sp.).

Tabla 4.2. Tamaño de los organismos utilizados en cada experimento de tasa de aclarado I (sección 4.6.1) y de tasa de aclarado II (sección 4.6.2), experimento II-a (a) y experimento II-b (b). Se presenta el peso seco (PS) de los individuos de zooplancton utilizados en cada caso y el largo de la dimensión máxima (LDM) de cada alimento (promedio \pm desvío estándar). nc: no corresponde. Las concentraciones de alimento en los experimentos I fueron: para *D. pulex* 0,5; 1,5 y 1 mg C l⁻¹ y para *N. iheringii* 0,125; 0,25; 0,375; 0,5 y 1 mg C l⁻¹. La concentración de alimento en todos los experimentos II fue de 0,5 mg C l⁻¹.

Experimentos de tasa de aclarado I		
Zooplancton utilizado	<i>D. pulex</i>	<i>N. iheringii</i>
Largo (mm)	0,82 \pm 0,23	1,1 \pm 0,1
PS zooplancton (μ g PS)	7,3 \pm 1,1	4,4 \pm 0,8
LDM <i>C. chlorastera</i> (μ m)	12,0 \pm 2,0	ídem <i>D. pulex</i>
LDM MVCC19 (μ m)	168,5 \pm 52,9	ídem <i>D. pulex</i>
LDM CYRF-01 (μ m)	44,6 \pm 14,9	ídem <i>D. pulex</i>
Experimentos de tasa de aclarado II		
Zooplancton utilizado	<i>D. pulex</i>	<i>A. cf. bergei</i>
Largo (mm)	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
PS zooplancton (μ g PS)	5,5 \pm 1,6	2,7 \pm 0,5
LDM <i>C. reinhardtii</i> (μ m)	7,5 \pm 2,0	ídem <i>D. pulex</i>
LDM <i>Scenedesmus</i> sp. (μ m)	Nc	10,2 \pm 2,6
LDM MVCC19 (μ m)	155,2 \pm 54,0	(a) 162,1 \pm 66,3 (b) 148,8 \pm 61,7
LDM LB2897 (μ m)	147,3 \pm 77,6	290,3 \pm 180,6

Tanto las cianobacterias como las clorofitas se utilizaron en la concentración de mayor TA del experimento de tasa de aclarado I (0,5 mg C l⁻¹; apartado 4.5.1) y con 4 réplicas por tratamiento/control. Los cálculos de TA y PS fueron realizados de la misma manera que para

los experimentos I (apartado 4.5.1) excepto que la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* fue determinada mediante fluorómetro (Turner *Aqua Fluor*, 0,3 - 300 $\mu\text{g l}^{-1}$).

4.6. Ensayos de supervivencia del zooplancton frente a *C. raciborskii*

Para el objetivo específico 4 (*determinar el efecto de MVCC19 sobre la supervivencia de un clon de cladóceros y dos poblaciones de copépodos*), se realizaron experimentos agudos (48 h) con *D. pulex* (DAPA) y dos poblaciones de *Argyrodiaptomus cf. bergi* (canteras Ferrando y Riachuelo), en presencia de MVCC19. Se utilizaron individuos de *D. pulex* de 72 h de vida y copépodos adultos sin huevos, cultivados igual que los cultivos madre de los experimentos de la sección 4.5.2. Se utilizó MVCC19 en fase de crecimiento exponencial cultivada igual que en la sección 4.3. Dado que la concentración de alimento puede condicionar la ingesta y por ende la supervivencia, se testearon 4 concentraciones de MVCC19: 0; 0,5; 1,5; 3 y 6 mg C l^{-1} . Las concentraciones seleccionadas incluyeron la óptima para la tasa de aclarado (determinadas en la sección 4.5.1) y similares a las observadas en floraciones de MVCC19 (Somma, 2014). Las mismas fueron estimadas a partir de cálculo de densidad de células a partir de la DO. La concentración de 0 mg C l^{-1} corresponde al control, sin alimento.

Los ensayos se realizaron en placas de acrílico con múltiples pozas (pozas de 10 ml) conteniendo 9 ml de suspensión de alimento, en las mismas condiciones de luz y temperatura en las cuales se cultivó el zooplancton. Se colocaron 5 animales por poza y se realizaron 5 réplicas. Cada 24 h, los animales fueron observados bajo lupa binocular para registrar el número de individuos paralizados (inmóviles con actividad en el corazón) y muertos (sin actividad en el corazón). Al finalizar los experimentos (48 h), la supervivencia fue calculada como el porcentaje de individuos vivos respecto al total. Además, se determinó el largo de cada individuo y se calculó su PS según las ecuaciones presentadas en la sección 4.5.1. Se

calcularon la densidad de células y el biovolumen de MVCC19 y se determinó la concentración de STX (kit ELISA Abraxis; STX cel⁻¹) para cada réplica.

4.7. Análisis de datos

En todos los casos se testeó la normalidad (test de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (test de Fligner) de los datos. En los casos que los datos no cumplieron dichas características se procedió a transformarlos (especificado para cada caso más adelante), si continuaban sin cumplir los requisitos para un análisis paramétrico, se optó por uno no paramétricos (*i.e.* Mann-Whitney). Todos los análisis se realizaron en R y se consideraron $p < 0,05$ como significativo y $p < 0,01$ como altamente significativo.

Algunas de las diferencias en las variables morfométricas entre las cepas fueron testeadas mediante test de suma de rangos de Mann-Whitney largo y ancho de las células (N = 20), LDM (N = 60) y volumen del tricoma (N = 60). Las diferencias en el volumen de las células (N = 20) fue testeadas mediante test de t. Para evaluar las diferencias entre las cepas tóxicas de *C. raciborskii* se compararon: la concentración de cada análogo de PSP (N = 3), la concentración total de toxinas (N = 3), la toxicidad (N = 3) y la morfometría (ancho y volumen de las células, N = 20; largo y volumen del tricoma, N = 60) mediante test de Mann-Whitney. Para evaluar las diferencias en el perfil de toxinas en dos etapas del crecimiento de MVCC19 se compararon la concentración de cada análogo (N = 3), la concentración total de toxinas (N = 3) y la toxicidad (N = 3) mediante test de Mann-Whitney.

Para comparar la concentración de toxinas debido a la presencia de depredadores, se evaluaron las diferencias entre los tratamientos (*D. pulex* en el experimento I y de *D. pulex* y *Argyrodiaptomus cf. bergei* en el experimento II y el control) mediante ANOVAs de una vía (concentración de STX, N = 4, y tasa de crecimiento, N = 4). Las variables que no

presentaron distribución normal, fueron transformadas con logaritmo en base 10 (PRS, N = 4; LDM y volumen de los tricomas) y analizadas mediante ANOVAs de una vía. NO₃ (N = 4) y el volumen de las células (N = 20) se compararon mediante test de Mann-Whitney. Para evaluar la relación entre la concentración de saxitoxina y las diferentes variables, se realizaron regresiones lineales y correlaciones paramétricas y no paramétricas.

Se calculó el porcentaje de disminución de la TA en presencia de cianobacterias respecto al control (clorofitas, tomado como 100 %) para cada tratamiento. Para el experimento de TA I esto se calculó considerando sólo la concentración considerada óptima (0,5 mgC l⁻¹) para evitar los efectos de la concentración de alimento. Además, se realizaron correlaciones de Spearman para la tasa de aclarado de cada especie de zooplancton respecto al MLD del alimento, considerando sólo los experimentos a 0,5 mg C l⁻¹ por la razón antes mencionada. Se compararon los MLD de las cepas de cianobacterias utilizadas para cada experimento mediante test no paramétrico de Kruskal-Wallis. En los experimentos de tasa de aclarado II se descartó una réplica del tratamiento de *A. cf. bergei* alimentado con *C. reinhardtii* (exp. II a, quedando con 3 réplicas) porque el tamaño del individuo fue mayor a dos desvíos estándar de la media de tamaños (Montgomery y Rugner, 2002). En los experimentos de supervivencia, se evaluó la relación de la misma con la concentración de toxina mediante correlación paramétrica de Pearson.

5. Resultados

5.1. Puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia para la detección de saxitoxina

Fue posible evidenciar la saxitoxina dentro de los filamentos de la cepa MVCC19 de *C. raciborskii* mediante la técnica de inmunofluorescencia propuesta (Fig. 5.1 y 5.2; Anexo II). Respecto al método de fijación de las células, los mejores resultados se obtuvieron con la fijación con 1 % de PFA, por al menos 30 min. En los ensayos de permeabilización se observó que en la incubación con Proteinasa K muchos filamentos presentaron su protoplasma fuera de la pared celular, indicando su ruptura. Resultados similares fueron observados para filamentos tratados con Lisozima durante 60 y 40 min, mientras que en el tratamiento de 30 min los filamentos rotos fueron poco frecuentes. Sin embargo, se obtuvo mejor señal de fluorescencia tanto para DAPI como para FITC, sin realizar permeabilizaciones de membrana. Con estos resultados de permeabilización y fijación, las incubaciones del anticuerpo primario de al menos 8 h dieron mejores resultados que las incubaciones menos prolongadas (Fig. 5.1).

La tinción de DAPI, junto con la de la clorofila *a*, permitió distinguir entre las señales de FITC debidas a uniones inespecíficas del anticuerpo (unido a partículas distintas de la STX) de las señales positivas. Las señales positivas se observaron donde la señal de FITC coincidió con la señal de la clorofila *a* y de ADN (Fig. 5.1). A su vez, el análisis de fotografías mediante el scanning del plano Z permitió observar que las señales del FITC se encontraban efectivamente dentro de las células, dado que en el eje ortogonal se visualiza junto con la señal roja de la clorofila (Fig. 5.5 B y C). Según nuestros resultados, la saxitoxina se ubica en acúmulos discretos dentro de las células y no distribuida homogéneamente en el citoplasma (Fig. 5.2 B-E). Además, se observaron diferencias en la fluorescencia FITC entre filamentos de la misma (Fig. 5.2 C).

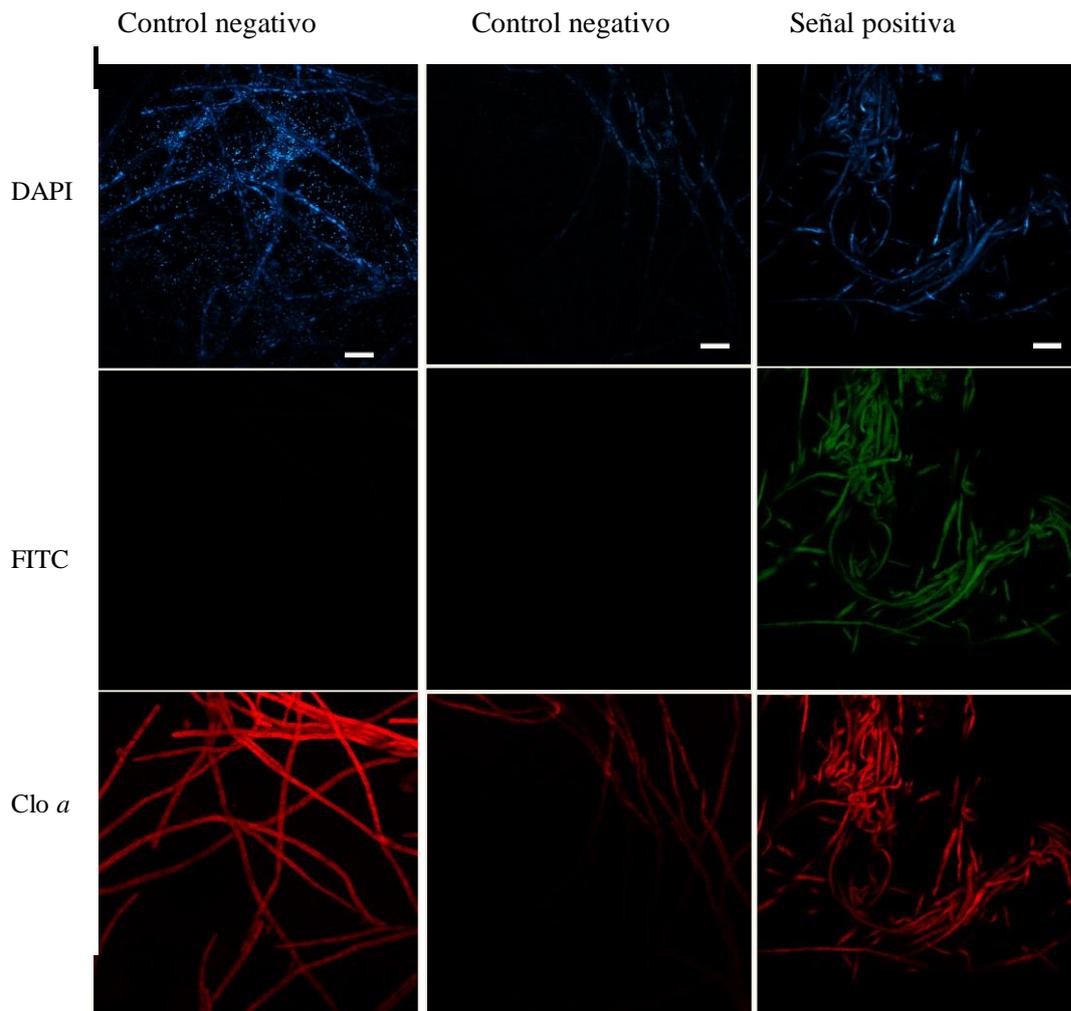


Figura 5.1. Fotografías en microscopía confocal de las cepas MVCC19 (tóxica) y LB2897 (no tóxica) de *C. raciborskii* con distintos filtros. En la primera fila se evidencia el ADN con tinción DAPI, en la segunda el fluorocromo FITC ligado a la STX y en la tercera fila la clorofila *a* (Clo *a*). Las dos primeras columnas corresponden a los controles negativos (LB2897 y MVCC19 tratada sin anticuerpo primario). La tercera columna corresponde a señales positivas en MVCC19 con el tratamiento completo, sin permeabilización. La barra blanca horizontal corresponde a 10 μm .

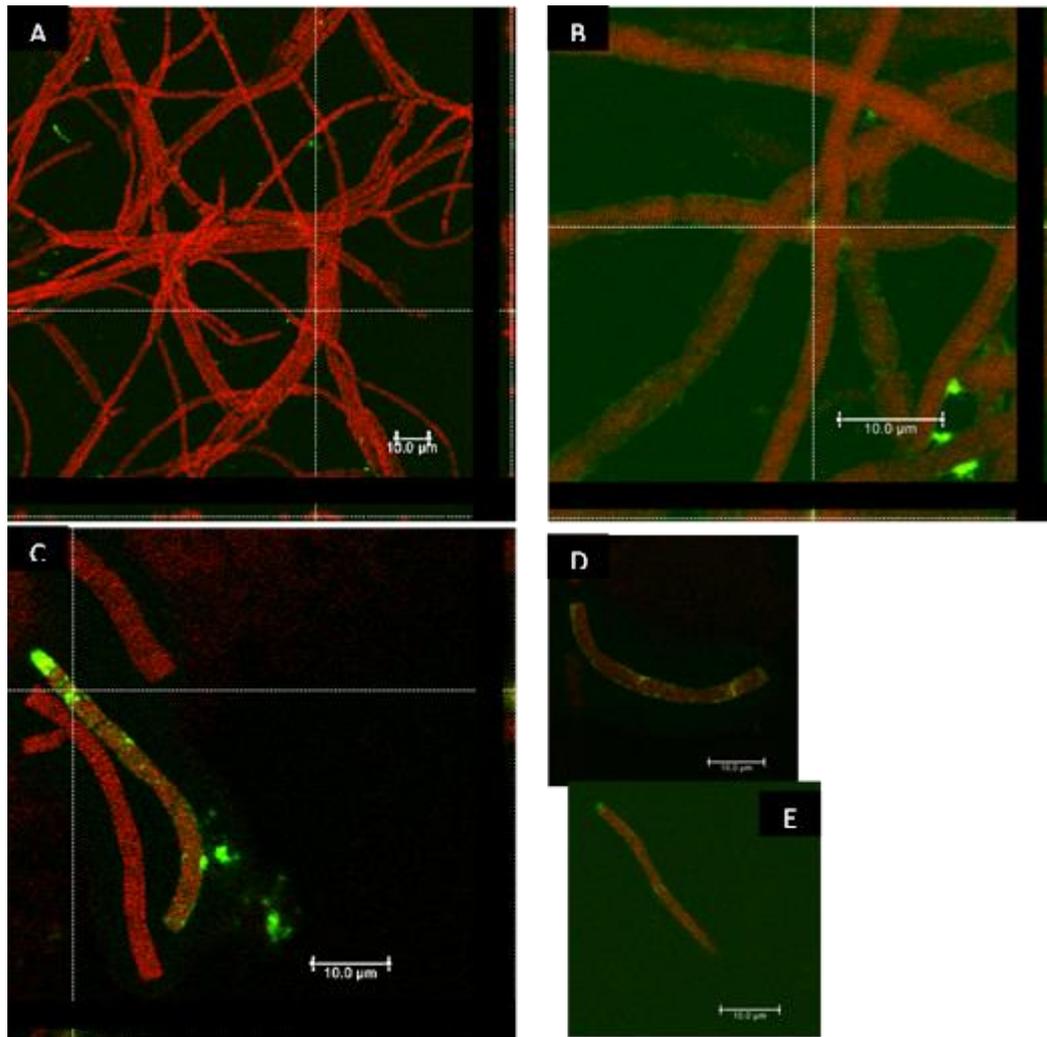


Figura 5.2. Fotografías al microscopio confocal de las cepas MVCC19 y LB2897 de *C. raciborskii* productora y no productora de STX respectivamente, tratadas con el protocolo desarrollado. A: control negativo (LB2897). B-E: MVCC19 tratadas según el protocolo propuesto. Se superpusieron las imágenes para clorofila *a* y FITC que se evidencian en rojo y verde respectivamente. En A, B y C se observa además el eje ortogonal en los bordes derecho (plano Y-Z) e inferior (plano X-Z) para el punto señalado con las líneas punteadas blancas.

5.2. Cambios en la concentración de saxitoxina por exposición indirecta de depredadores

La concentración de saxitoxina total (intra y extracelular) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos y el control en ninguno de los experimentos realizados (*F*

= 0,44; gl = 2; $p > 0,05$ y $F = 0,20$; gl = 2; $p > 0,05$ para los experimentos I y II respectivamente; Fig. 5.6). Además, no estuvo correlacionada con ninguna de las variables medidas (tasa de crecimiento, NO_3 , PRS).

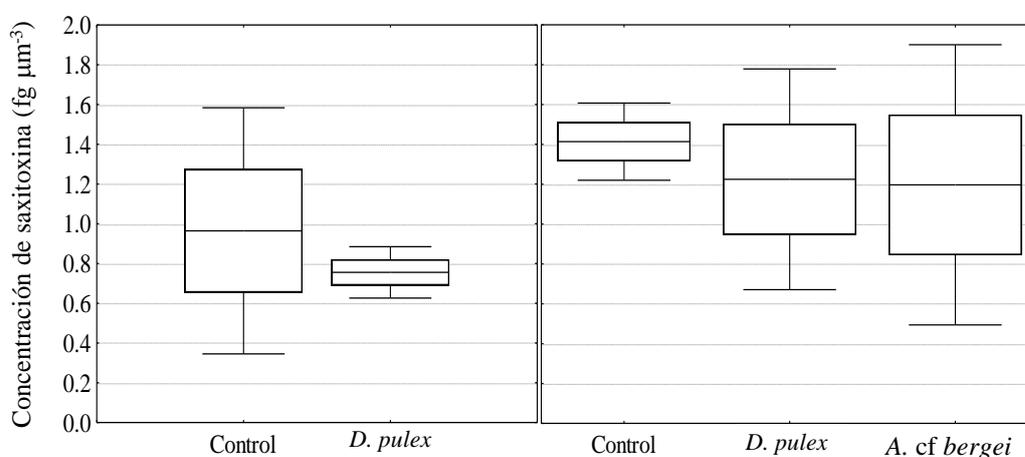


Figura 5.3: Concentración de saxitoxina (STX) por unidad de biovolumen de MVCC19 en el control y en los tratamientos con señales de *Daphnia pulex* (izquierda), y con señales de *D. pulex* y de *Argyrodiaptomus cf. bergei* (derecha). Las cajas representan la media \pm el error estándar, la línea horizontal representa la media y las barras verticales representan el desvío estándar, $N = 4$.

Durante los experimentos MVCC19 creció en todos los tratamientos y sus controles (Fig. 5.4). La densidad óptica (como $\text{Ln}(\text{DO})$) de todos los tratamientos y controles tanto del experimento I como del experimento II, presentaron tendencia lineal y positiva durante el experimento (regresiones lineales para el experimento I: $R = 0,85$; $F = 26,63$; $p < 0,001$ para el control y $R = 0,32$; $F = 6,60$; $p < 0,05$ para el tratamiento; para el experimento II: $R = 0,98$; $F = 215,21$; $p < 0,001$ para el control; $R = 0,99$; $F = 428,32$; $p < 0,001$ para el tratamiento con *D. pulex* y $R = 0,99$; $F = 644,92$; $p < 0,001$ para el tratamiento con *A. cf. bergei*; Fig. 5.4). La tasa de crecimiento promedio en el experimento I no se diferenció significativamente del control, siendo $0,10 \pm 0,05$ para el control y de $0,08 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ para el tratamiento con *D. pulex* ($F = 1,31$; gl = 1; $p > 0,05$). Mientras que en el experimento II las tasas de crecimiento

fueron de $0,24 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ para el control y $0,30 \pm 0,03$ y $0,26 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ y los tratamientos con *D. pulex*, *A. cf. bergei* respectivamente. Tampoco en este último experimento hubo diferencias significativas entre las tasas de crecimiento ($F = 3,86$; $gl = 2$; $p > 0,05$; Fig. 5.4).

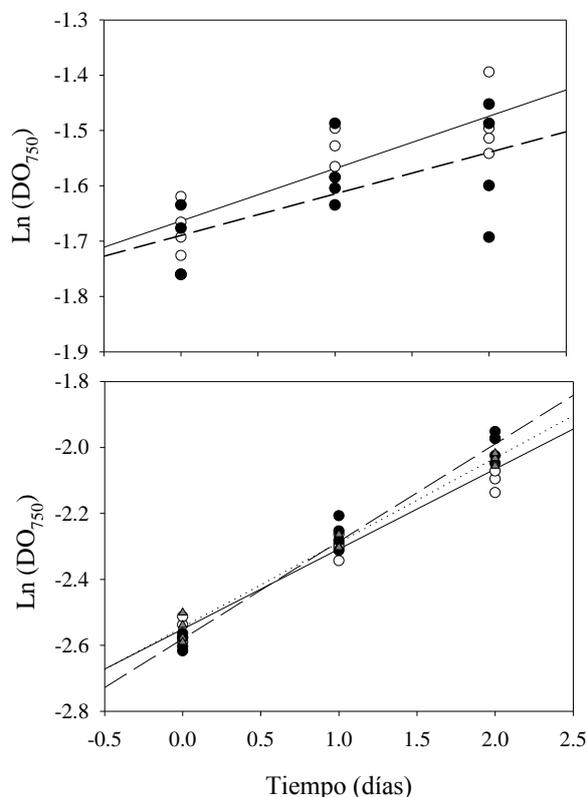


Figura 5.4. Densidad óptica a 750 nm (DO_{750}) logaritmizada (logaritmo neperiano) en función del tiempo para el control (círculos vacíos, línea continua), el tratamiento con *D. pulex* (círculos negros, línea a entrecortada) y *A. cf. bergei* (triángulos grises, línea punteada), durante los experimentos I (gráfica superior) y II (gráfica inferior). Las líneas representan los modelos lineales ajustados para cada set de datos, los valores de las mismas se presentan en el texto.

En el experimento II, el PRS fue significativamente menor en el control ($3,0 \pm 0,2 \mu\text{g l}^{-1}$) que en el tratamiento con *D. pulex* ($3,3 \pm 0,1 \mu\text{g l}^{-1}$) ($F = 2,87$; $gl = 2$; $p < 0,05$), mientras que no hubo diferencias en el tratamiento con *A. cf. bergei* ($3,2 \pm 0,2 \mu\text{g l}^{-1}$). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos con *D. pulex* y *A. cf. bergei* ni entre el tratamiento con *A.*

cf. *bergei* y su control en cuanto a PRS. La concentración de nitrato no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ni el control (KW= 4,11; gl = 2; p > 0,05). Las concentraciones fueron $11,7 \pm 0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ para el control, $12,9 \pm 1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ para el tratamiento con *D. pulex* y $12,0 \pm 0,4 \mu\text{g l}^{-1}$ para el tratamiento con *A. cf. bergei*. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en ninguna de las variables morfométricas de las células, ni los tricomas de MVCC19 en ninguno de los experimentos realizados.

5.3. Cepas productoras de PSP de *C. raciborskii*

Las dos cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* caracterizadas (MVCC19 y CYRF-01) presentaron filamentos rectos, aerótopos, y frecuente presencia de heterocitos en uno o ambos extremos (datos no mostrados). Los tricomas de MVCC19 fueron significativamente más largos (U = 4610; N = 59; p < 0,001) y de mayor volumen (U = 4594; N = 59; p < 0.001) que los de CYRF-01. El ancho, largo y volumen de las células fue similar para ambas cepas (U = 134,5; N = 18; p > 0,05; U = 155; N = 20 y p > 0,05; t = 1,66; gl = 31, p > 0,05, respectivamente) (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Caracterización morfométrica de las cepas MVCC19 y CYRF-01 de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Se presentan el promedio \pm el desvío estándar del largo y ancho de las células vegetativas, el largo de la dimensión máxima del tricoma (LDM, N = 60) y los volúmenes de las células y los tricomas. El asterisco indica diferencias significativas entre cepas para las variables (p < 0,05).

Cepa	Largo cél. (μm)	Ancho cél. (μm)	Vol cél. (μm^3)	LDM* (μm)	Vol tricoma * (μm^3)
MVCC19	$6,5 \pm 1,6$	$3,0 \pm 0,1$	$46,4 \pm 12,3$	125 ± 70	$863,5 \pm 483,3$
CYRF-01	$5,6 \pm 1,2$	$3,0 \pm 0,4$	$39,5 \pm 11,7$	51 ± 30	$338,7 \pm 190,3$

Las dos cepas presentaron crecimiento positivo en el tiempo del experimento (Fig. 5.5). La curva sigmoidea presentó un R^2 ajustado de 0,95 (p < 0,01) para MVCC19 y de 0,96 (p < 0,01) para CYRF-01. La fase de crecimiento exponencial fue para MVCC19 entre los días 2 y

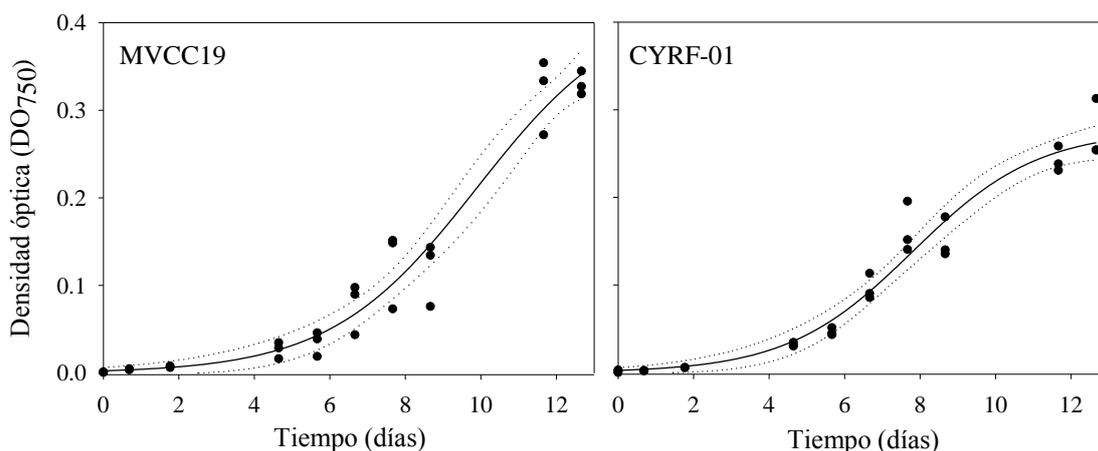


Figura 5.5: Densidad óptica (DO, absorbancia a 750 nm) en función del tiempo (días) de las cepas MVCC19 y CYRF-01. Se muestra el modelo de ajuste sigmoide para cada cepa (líneas continuas) y el intervalo de confianza del 95 % (líneas punteadas).

9 y para CYRF-01 entre los días 2 y 8. La tasa de crecimiento exponencial para MVCC19 fue de $0,20 \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,961$; $p < 0,001$) y para CYRF-01 fue de $0,26 \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,995$; $p < 0,001$).

Ambas cepas presentaron los análogos STX y NEO mientras que ninguna presentó GTX1 ni GTX4 en concentraciones superiores a los límites de detección (Fig. 5.6). Los análogos presentes en MVCC19 fueron STX, NEO y GTX 2-3 en la fase de crecimiento exponencial tanto temprana como tardía. Los análogos GTX2-3 exhibieron mayor concentración que STX y NEO en ambas fases. Las proporciones en la fase temprana fueron NEO:STX 1:1; GTX2-3:STX 1:8; GTX2-3:NEO 1:6. Mientras que en la fase tardía las proporciones fueron NEO:STX 1:3; GTX2-3:STX 1:12; GTX2-3:NEO 1:4. En cambio, los únicos análogos presentes en CYRF-01 fueron STX y NEO en proporción STX:NEO 1:2.

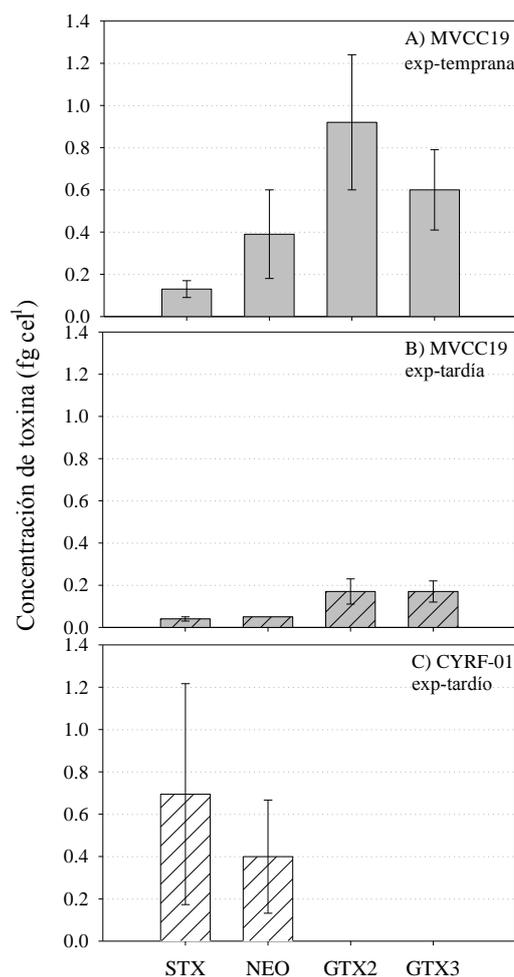


Figura 5.6. Perfil de toxinas de las cepas MVCC19 (A-B) y CYRF-01 (C) de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Para MVCC19 se presentan la fase de crecimiento exponencial-temprana (A) y tardía (B). NEO= Neo-saxitoxina; STX= saxitoxins; GTX2-3 = Gonyautoxinas 2-3. Las barras indican la media y las líneas verticales el desvío estándar. GTX2-3 fueron menores al límite de detección para CYRF-01 (C).

La concentración total de toxinas en MVCC19 fue de $2,3 \pm 0,5$ fg cel⁻¹ en la fase de crecimiento exponencial temprana y $0,4 \pm 0,12$ fg cel⁻¹ en la tardía, siendo significativamente menor en ésta última ($t = -5,47$; $gl = 3$; $p < 0,05$). En CYRF-01, la concentración total de toxinas fue de $1,1 \pm 0,7$ fg cel⁻¹ en la fase exponencial tardía (Fig. 5.6). La concentración tanto de STX como de NEO no difirió significativamente entre cepas, comparando las fases tardías

($t = 1,24$; $gl = 3$; $p > 0,05$). Tampoco se diferenciaron en la concentración total de toxinas en la fase de crecimiento exponencial tardía, ($t = 1,54$; $gl = 3$; $p > 0,05$). En la cepa MVCC19 la toxicidad fue mayor en la etapa de crecimiento exponencial temprana ($1,37 \pm 2,3$ fg STX eq cél^{-1}), que en la de exponencial-tardía ($2,60 \pm 0,6$ fg STX eq cél^{-1}). Para la cepa CYFR-01 se registró una toxicidad de $1,06 \pm 0,69$ ng eq STX cél^{-1} (Fig. 5.7).

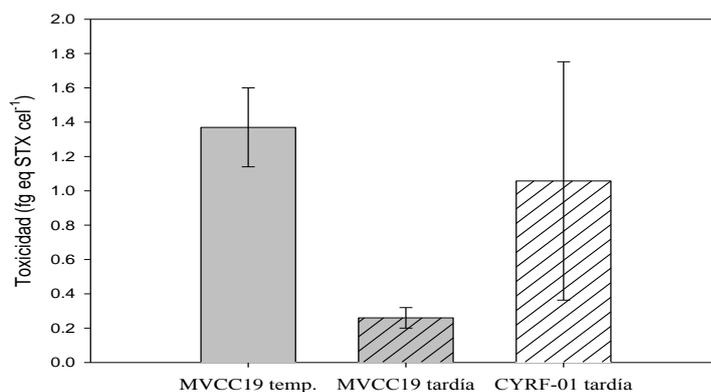


Figura 5.7. Toxicidad de las cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* MVCC19 en las fases exponencial-temprana (temp.; barra gris lisa) y exponencial-tardía (barra gris a rayas), CYRF-01 en la fase exponencial-tardía (barra blanca a rayas). Las barras representan la media y las líneas verticales representan el desvío estándar.

5.4. Ensayos de tasa de aclarado

5.4.2. Ensayo de tasa de aclarado I

La tasa de aclarado varió según el tipo y la concentración del alimento. Tanto *D. pulex* como las poblaciones de copéodos, removieron células tanto de *C. chlorastera* como de *C. raciborskii*, al menos para algunas concentraciones (Fig. 5.8). Las tasas de aclarado de ambas especies del zooplancton alimentados con *C. chlorastera* fueron significativamente mayores

que cuando fueron alimentados con *C. raciborskii*, para las cepas MVCC19 y CYRF-01 ($t = -5,6$; $gl = 29$; $p < 0,001$ y $t = -6,12$; $gl = 20$; $p < 0,001$ respectivamente, Fig. 5.8). La tasa de aclarado de *D. pulex* sobre *C. reinhardtii* fue significativamente mayor a $0,5 \text{ mg C l}^{-1}$ ($1,36 \text{ mg C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que a las otras concentraciones ($F = 0,05$; $gl = 7$; $p < 0,05$). La máxima tasa de aclarado de *N. iheringii* sobre *C. reinhardtii* fue también a $0,5 \text{ mg C l}^{-1}$ ($0,27 \text{ mg C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$) aunque esta no difirió significativamente del resto de las concentraciones testeadas. Por tales motivos, $0,5 \text{ mg C l}^{-1}$ fue considerada óptima y utilizada para los subsiguientes experimentos (ver sección 5.5.2).

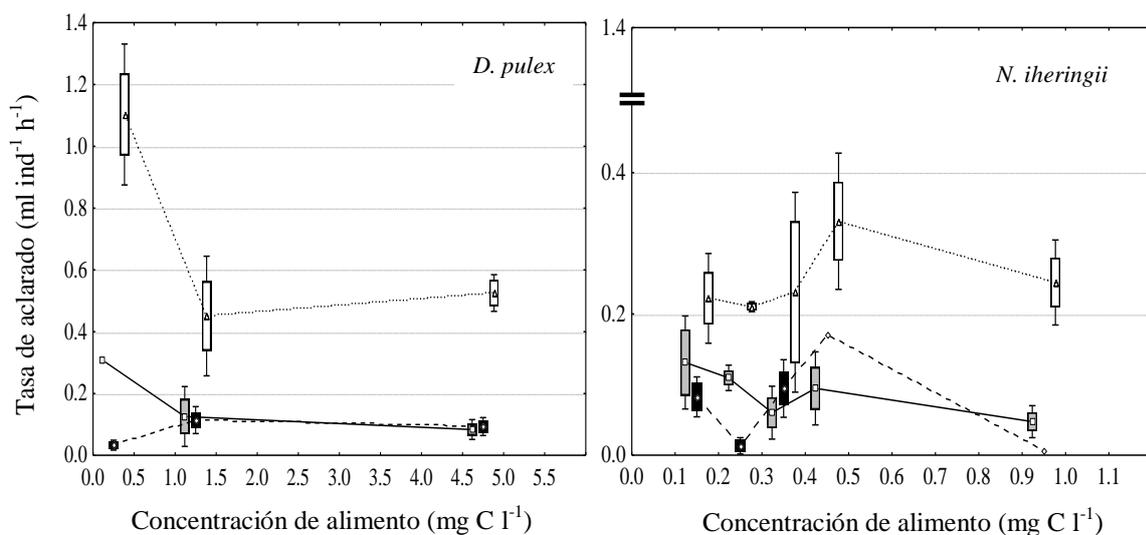


Figura 5.8: Ensayo de tasa de aclarado I. Tasa de aclarado ($\text{ml ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$) del cladóceros *D. pulex* y el copépodo *N. iheringii*, a distintas concentraciones de alimento: $0,5$; $1,5$ y 5 mg C l^{-1} y $0,125$; $0,25$; $0,375$; $0,5$ y 1 mg C l^{-1} respectivamente. Las cajas vacías corresponden a *C. reinhardtii* en el experimento con *D. pulex* y a *C. chlorastera* en el experimento con *N. iheringii*, las cajas negras a CYRF-01 y las grises a MVCC19. La caja representa el error estándar, el símbolo central representa la media y las barras verticales representan \pm el desvío estándar, hay un leve desplazamiento entre cajas para evitar superposición de los tratamientos. Note que la escala de las ordenadas varía entre gráficas. $N = 4$ para cada nivel de cada experimento.

A la concentración óptima de alimento, la tasa de aclarado sobre *C. raciborskii* fue significativamente menor que sobre *C. reinhardtii* para ambos depredadores aunque no difirieron significativamente entre cepas de la cianobacteria ($F = 7,8$; $gl = 2$; $p < 0,05$ para *D*

pulex y $F = 153,3$; $gl = 3$; $p < 0,05$ para *N. iheringii*). Para *N. iheringii*, la disminución de la tasa de aclarado en presencia de *C. raciborskii* respecto a las clorofitas, fue entre 48,7 y 97,5 % en presencia de CYRF-01 y entre 47,9 y 80,6 % para MVCC19. Las máximas disminuciones ocurrieron a la mayor (1 mg C l^{-1}) y a la menor ($0,5 \text{ mg C l}^{-1}$) concentración ensayada. Frente a MVCC19, la máxima disminución también se observó a 1 mg C l^{-1} (80,6 %) y la mínima disminución fue similar a la de CYRF-01, 47,9 %, para $0,25 \text{ mg C l}^{-1}$. Para *D. pulex*, la disminución en la tasa de aclarado debida a CYRF-01 fue entre 82,3 y 97,0 %, mientras que frente a MVCC19, la misma fue entre 72,2 y 84,1 %.

No hubo diferencias significativas en la tasa de aclarado entre ambas cepas de cianobacteria (MVCC19 y CYRF-01) para ninguna de las dos especies de zooplancton ($t = -1,18$; $gl = 12$; $p > 0,05$ para *D. pulex* y $t = -0,11$; $gl = 17$; $p > 0,05$ para *N. iheringii*). El MLD de las cepas de cianobacteria fue significativamente mayor para MVCC19 que para CYRF-01 ($H = 89,30$; $gl = 1$; $N = 120$; $p < 0,05$).

5.4.3. Ensayo de tasa de aclarado II

En el segundo grupo de ensayos también se observaron tasas de aclarado positivas para las clorofitas mientras que para las cepas de *C. raciborskii* fueron cercanas a cero o nulas (Fig. 5.9). La tasa de aclarado de *D. pulex* sobre *C. reinhardtii* fue significativamente superior que sobre las cepas MVCC19 y LB2897 ($t = 6,4$; $gl = 10$; $p < 0,001$; Fig. 5.9). Sin embargo no hubo diferencias significativas en la tasa de aclarado entre ambas cepas de cianobacteria ($t = -1,1$; $gl = 6$; $p > 0,05$). En este experimento, ambas cepas de *C. raciborskii* difirieron significativamente en el MLD, siendo mayor LB2897 que MVCC19 ($H = 4,148$; $gl = 1$; $N = 180$; $p < 0,05$).

Para *A. cf. bergei*, la tasa de aclarado sobre *C. raciborskii* (MVCC19) fue significativamente menor que para *C. reinhardtii* ($t = 6,4$; $gl = 10$; $p < 0,001$). Sin embargo, la tasa de aclarado sobre *Scenedesmus* sp. no difirió de la tasa de aclarado sobre MVCC19 ($t = 1,9$; $gl = 5$; $p > 0,05$). Asimismo, la tasa de aclarado sobre MVCC19 no difirió significativamente de la tasa de aclarado sobre LB2897 ($U = 2,0$; $N = 3-4$; $p > 0,05$, Fig. 5.9). La TA sobre MVCC19 no difirió entre *A. cf. bergei* (experimentos a y b) y *D. pulex* ($U = 34$; $N = 4-8$; $p > 0,05$).

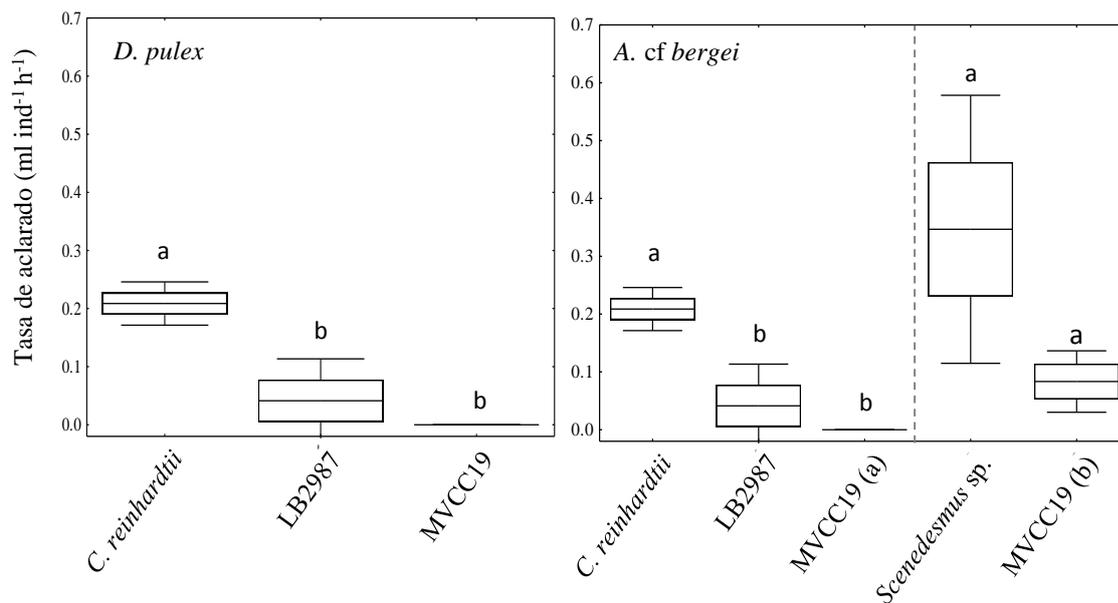


Figura 5.9: Ensayo de tasa de aclarado II. Tasas de aclarado para *Argyrodiaptomus cf. bergei* de cantera Ferrando y para de *D. pulex* a $0,5 \text{ mg C l}^{-1}$. Para *A. cf. bergei* se muestran dos experimentos de tasa de aclarado (a y b) utilizando dos cepas de *C. raciborskii* MVCC19 (tóxica) y LB2897 (no tóxica), y distintas ofertas de alimento palatable: *C. reinhardtii* (a) y *Scenedesmus* sp. (b). Para *D. pulex* se muestra un experimento utilizando dos cepas de *C. raciborskii* MVCC19 (tóxica) y LB2897 (no tóxica), y *C. reinhardtii* como alimento palatable. La caja representa la mediana \pm el error estándar, la línea representa la media, las barras verticales representan \pm el desvío estándar. Las letras indican diferencias significativas. $N = 4$ para cada nivel de cada experimento.

La tasa de aclarado de *A. cf. bergei* debido a *C. raciborskii* disminuyó respecto al alimento palatable. Dicha disminución fue de 76 y 80,5 % para MVCC19 (experimentos a y b respectivamente) y del 91,6 % para LB2897. Para *D. pulex*, la disminución frente a MVCC19

respecto al alimento palatable fue de 100 % mientras que frente a LB2897 fue del 80,2 %. Las tasas de aclarado no estuvieron correlacionadas con el peso seco de los animales ni para *D. pulex* ni para los copépodos (*A. cf. bergei* y *N. iheringii*) ($r_{\text{spearman}} = -0,34$; $p > 0,05$; $N = 20$ y $r_{\text{spearman}} = 0,3$; $p > 0,05$; $N=30$ respectivamente).

Respecto al tamaño de las cianobacterias, el LDM de LB2897 fue significativamente mayor a MVCC19 en el experimento “b” ($H = 11,19$; $gl = 1$; $N = 78$; $p < 0,01$) mientras que el largo de la cepa MVCC19 no varió entre los experimentos “a” y “b” ($H = 0,35$; $gl = 1$; $N = 84$; $p > 0,05$). La tasas de aclarado en los experimentos I y II, a $0,5 \text{ mg C l}^{-1}$, estuvo correlacionado negativamente con el LDM tanto para *D. pulex* como para los copépodos ($r_{\text{spearman}} = -0,82$; $p < 0,05$; $N = 20$ y $r_{\text{spearman}} = -0,67$; $p < 0,01$; $N=30$, respectivamente). A su vez, la interacción entre el LDM y la TA fueron significativas, con tendencia de decaimiento exponencial, tanto para copépodos como para *D. pulex* ($F = 27,1$; $p < 0,001$; $N = 70$ y $F = 76,2$; $p < 0,001$; respectivamente, Fig. 5.10).

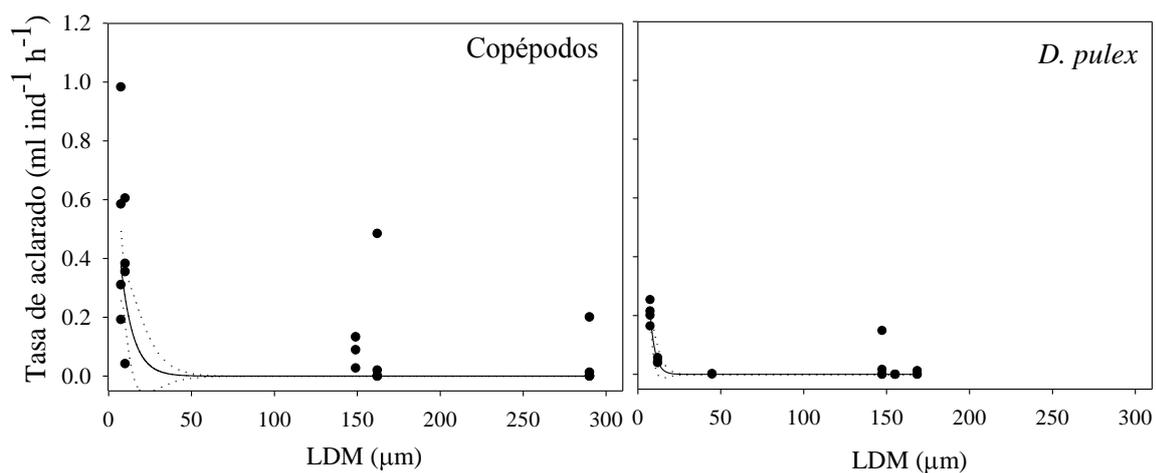


Figura 5.10. Tasa de aclarado de todos los experimentos realizados con los copépodos *Argyrodiaptomus cf. bergei* y *Notodiatomus iheringii* y con el cladócer *Daphnia pulex* en función del largo de la dimensión máxima del alimento (LDM). Se presentan las líneas de tendencia de los modelos de decaimiento exponencial. Las líneas punteadas indican el intervalo de confianza del 95 %.

5.5. Ensayos de supervivencia del zooplancton frente a *C. raciborskii*

Todos los organismos del zooplancton presentaron alto porcentaje de supervivencia (entre 74 y 100 %) en presencia de la cepa tóxica MVCC19 a las 48 h de exposición (Tabla 5.2). En los controles (sin alimento) la supervivencia estuvo entre 92 y 100 % y no se diferenció significativamente de los tratamientos. La concentración de saxitoxina de MVCC19 varió entre experimentos (Tabla 5.2), sin embargo, esto no se correlacionó con la supervivencia del zooplancton ($r_{\text{pearson}} = 0,36$; $p > 0,05$).

Tabla 5.2: Experimentos de supervivencia indicando la especie de zooplancton, las concentraciones de *C. raciborskii* (MVCC19) ensayadas, la concentración de saxitoxina (STX) en la suspensión de alimento a tiempo final de cada experimento y el porcentaje de supervivencia a las 48 h (promedio \pm desvío estándar). Los tratamientos con 0 ng STX ml⁻¹ y 0 mg C l⁻¹ de MVCC19 corresponden a los controles. Exp = número de experimento.

Exp	Zooplancton	MVCC19 (mg C l ⁻¹)	STX (ng ml ⁻¹)	Supervivencia (%)
1	<i>D. pulex</i>	0	0	92 \pm 18
		0,5	2,9	96 \pm 9
		1,5	6,1	100 \pm 0
2	<i>D. pulex</i>	0	0,4	96 \pm 9
		3	0,8	95 \pm 10
		6	3,8	96 \pm 9
3	<i>A. cf. bergei</i> (población 2)	0	0	89 \pm 19
		0,5	0,4	74 \pm 16
		1,5	1,3	80 \pm 20
		3	2,4	83 \pm 19
		6	4,7	90 \pm 12
4	<i>A. cf. bergei</i> (población 1)	0	0	100 \pm 0
		6	22,1	100 \pm 0

6. Discusión

Las cepas de *C. raciborskii* estudiadas, MVCC19 y CYRF-01, difirieron en los análogos de PSP producidos y en su morfometría. La concentración de toxinas por célula y la toxicidad de la cepa MVCC19 estuvieron relacionadas a su fase del crecimiento y no a la exposición indirecta a depredadores. La técnica de inmunofluorescencia *in situ* puesta a punto en esta tesis, permitió la detección de saxitoxina en las células de cianobacteria, evidenciando su distribución heterogénea dentro de la célula y entre filamentos. Los depredadores se vieron afectados por la presencia de *C. raciborskii* en cuanto a su tasa de aclarado pero no en cuanto a su supervivencia. Esto sugiere que las PSP podrían tener un papel biológico diferente al de defensa contra depredadores.

6.1 Localización de la saxitoxina

En este trabajo se desarrolló una técnica de inmunofluorescencia *in situ* que permitió evidenciar la presencia de STX dentro de los filamentos de la cepa MVCC19 de *C. raciborskii*, cumpliendo con el objetivo específico número 1. Fue posible visualizar, por primera vez, pequeños acúmulos de saxitoxina cuya concentración varía entre las células de un mismo filamento y entre filamentos. Estas observaciones son similares a las obtenidas para otras cianobacterias mediante técnicas de tinción. En la cianobacteria filamentosa *Rivularia* (Nostocal), se observaron microcistinas en acúmulos citoplasmáticos en las células vegetativas, en los heterocitos y en la vaina mucilaginosa (Marco et al., 2012). Nuestros resultados sobre saxitoxina implican que la exposición del zooplancton a la toxina no sería homogénea sino parcheada. Por otro lado, en la naturaleza, muchas veces es difícil relacionar número de células a la toxicidad esperada. En primer lugar, esto ocurre porque en las poblaciones naturales de cianobacterias pueden estar compuestas por cepas productoras y no productoras de toxina (*e.g.* Moore et al., 1998). En segundo lugar, porque pueden coexistir

más de una especie potencialmente tóxica en un mismo ecosistema acuático (Bonilla et al., 2012). En estos casos, la inclusión de la técnica de inmunofluorescencia en protocolos de monitoreo de cianobacterias y alertas temprana permitiría detectar toxina fácil y rápidamente e identificar cepas y/o especies productoras y no productoras, complementando otros análisis. Además podría ser un paso previo, al uso posterior de análisis cuantitativo de toxinas (e.g. ELISA), dado que es fácil y económico. Técnicas similares de inmunofluorescencia *in situ* han sido aplicada con fines similares en poliquetos, con resultados exitosos (Rebscher et al., 2007; García-Alonso et al., 2011). Dados dichos antecedentes, podría extenderse la aplicabilidad de la técnica a otros organismos productores de saxitoxina, como el dinoflagelado causante de mareas rojas *Alexandrium* spp (Cusick y Sayler, 2013) y a organismos que pudieran estar expuestos a la toxina, como ciliados o zooplancton. Esto permitiría ampliar el conocimiento sobre las interacciones bióticas entre las cianobacterias y otros componentes del plancton.

6.2 Cepas productoras de PSP de *C. raciborskii*

Los análogos de STX con mayor concentración por célula en MVCC19 fueron GTX2 y GTX3, cuya producción había sido reportada anteriormente (Piccini et al., 2011). Sin embargo, esta es la primera caracterización de las toxinas presentes en la cepa uruguaya MVCC19 en términos de concentración por célula y asociado a una etapa de crecimiento determinada. Hasta el momento, no se han reportado cepas de dicha especie productoras de PSP fuera Sudamérica y sólo han sido descritas cepas de Brasil y Uruguay. Los análogos GTX2 y GTX3, también están presentes en otra cepa uruguaya (MVCC14) y en cepas brasileras de *C. raciborskii* (T2 y C10; Lagos et al., 1999; Castro et al., 2004). A su vez, la mayoría de las cepas descritas como productoras de GTX2, producen también GTX3, y no producen NEO (C10 y T2) (Lagos et al., 1999; Castro et al., 2004). Sin embargo, la cepa MVCC19 tiene la particularidad de que produce GTX2-3 a la vez que produce NEO. Al igual

que en la mayoría de las cepas registradas en la bibliografía, STX se encuentra en menor proporción que las demás variantes (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002; Bernard et al., 2003; Soto-Leibe et al., 2010). La baja concentración de STX en cepas productoras de GTXs y NEO podría deberse a que STX es un sustrato necesario para la producción de GTX2-3 y NEO, por lo que la alta producción de dichos productos podría ocasionar la baja concentración del reactivo STX (Soto-Liebe et al., 2010). Sólo las cepas C10 y CYRF-01 presentan STX como análogo predominante y en menor concentración GTX2-3 y NEO (Ferrão-Filho et al., 2010). Por otro lado, la naturaleza de los análogos producidos por MVCC19 fue estable durante el crecimiento, mientras que su concentración varió según la etapa del crecimiento. Dichos resultados coinciden con trabajos anteriores realizados en otras cepas de la misma especie (Soto-Liebe et al., 2010).

En la cepa brasilera CYRF-01 los análogos detectados en el presente estudio fueron STX y NEO, constituyendo el primer reporte de NEO para esta cepa. En estudios anteriores fue reportada como productora sólo de STX y GTX1, siendo el único reporte de GTX1 para *C. raciborskii* (Ferrão-Filho et al., 2010). Dicho trabajo utilizó HPLC con procedimientos similares a los del presente trabajo, excepto en que se utilizó material liofilizado para el análisis. Si bien es esperable que la concentración total de toxinas por célula varíe según las condiciones de cultivo para una misma cepa, no así para los análogos que produce (Soto-Liebe et al., 2010). La ausencia de datos fisiológicos sobre la CYRF-01 utilizada en el estudio de Ferrão-Filho et al. (2010) impide un análisis más detallado de las posibles causas de estas diferencias. Análisis exhaustivos de nuevas cepas y de CYRF-01 en distintos estados fisiológicos serían necesarios para esclarecer este punto.

Las diferencias en el perfil de toxinas entre ambas cepas se reflejaron en su toxicidad, lo que podría tener consecuencias en la interacción con sus depredadores y por lo tanto, en su ecología. Además, ambas cepas difirieron en el largo máximo del tricoma, lo que se reflejó en

diferencias significativas en su volumen. En el fitoplancton, la morfometría refleja aspectos ecológicos (Reynolds, 1984; Kruk et al., 2010), por lo tanto, dichas diferencias sugieren que son ecotipos diferentes. Otros autores han señalado la existencia de ecotipos dentro de *C. raciborskii*, por ejemplo, al comparar la fisiológica, morfología y genética dos cepas uruguayas (MVCC19 y MVCC14; Piccini et al., 2011). También, para la cianobacteria marina *Prochlorococcus* se conocen dos cepas con diferentes propiedades fisiológicas respecto a la luz (alta y baja intensidad) y que por lo tanto, constituyen dos ecotipos distintos (Moore et al., 1998). La presencia de ecotipos en *C. raciborskii*, adaptados a las condiciones ambientales particulares en los que se desarrolla cada población, permitirían una gran capacidad de éxito en ambientes muy diferentes (Piccini et al., 2011).

La concentración de toxinas en MVCC19 estuvo afectada por la fase de crecimiento, siendo mayor durante el crecimiento exponencial temprano que en el tardío. En este sentido, nuestros resultados coinciden con otros trabajos en los que la tasa de crecimiento es uno de los factores determinantes de la concentración de toxina tanto en *C. raciborskii* (NEO y STX; Castro et al., 2004; Carneiro et al., 2009) como en otras cianobacterias, por ejemplo en *Microcystis aeruginosa* (Long et al., 2001). El hecho de que la concentración de cianotoxinas intracelular disminuya al pasar de la fase exponencial temprana a la tardía, implica que la misma pudo haber sido metabolizada a otras moléculas, o exudada al medio externo. Otros trabajos evidencian que la cianotoxina cylindrospermopsina (CYN) puede ser liberada al ambiente con funciones infoquímicas en la cianobacteria Nostocal *Aphanizomenon ovalisporum* (Bar-Yosef et al., 2010). Sin embargo, en *C. raciborskii* no se ha observado exudado de saxitoxina (Carneiro et al., 2009). Por otro lado, GTX2-3 son precursores de los análogos NEO y C1-2, por lo que podrían haberse interconvertido (Wiese et al., 2010). También podrían haberse generado los análogos decarboxilados de STX y NEO, que han sido observados en otras cepas de la misma especie (Molica et al., 2002, Bernard et al., 2003; Soto-Liebe et al., 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo sobre los cambios en la concentración de toxinas dentro de las etapas de crecimiento implican que la concentración de toxina es un aspecto fenotípico

flexible en MVCC19. Sumado a esto, otros estudios sobre esta cepa han registrado gran flexibilidad fenotípica en otros caracteres fenotípicos, como la captación de nutrientes y la estructura pigmentaria (Bonilla et al., 2012; Fabre, 2011; Amaral et al., 2014). La flexibilidad fenotípica podría ser un aspecto clave en el éxito de *C. raciborskii* para colonizar y dominar ambientes diversos.

La variación en la concentración de análogos de STX a lo largo del ciclo de vida de las cianobacterias dificulta en gran medida predecir niveles de toxicidad durante el desarrollo de floraciones en los ecosistemas acuáticos. En principio, para la caracterización experimental de cepas de *C. raciborskii*, sería importante evaluar un amplio rango de condiciones que puedan alterar la producción de toxinas, para conocer su verdadero potencial tóxico. En el ambiente, la fase de crecimiento exponencial-tardía puede corresponderse con el comienzo de una floración. Uno de los niveles de alerta de la Organización Mundial de la Salud es el recuento de número de células, por lo que en fases tempranas del crecimiento, a pesar de que podrían presentar gran concentración de toxinas, no generarían una alerta sanitaria (Chorus, 2012). Por ejemplo, la normativa brasilera de aguas recreacionales para baño, aceptan hasta 50.000 cél ml⁻¹ para baño y recreación (Resolução CONAMA N°357, 2005), que corresponderían, en el caso de MVCC19, a toxicidades potencialmente muy diferentes: 13 ng eq STX ml⁻¹ en fase de crecimiento exponencial tardío y 70 ng eq STX ml⁻¹ en exponencial temprano. En Uruguay, la normativa de bañabilidad y otros usos de los ecosistemas acuáticos no establece ningún parámetro relacionado a las cianobacterias (DINAMA 1979). Además la fase exponencial *per se*, tampoco generaría alerta en la sociedad dado que es imperceptible a simple vista. Sumado a esto, *C. raciborskii* genera floraciones dispersivas de color marrón, difícil de distinguir de la coloración del sedimento resuspendido (Bonilla, 2009). Por lo tanto, sería importante evaluar la toxicidad de los ambientes repetidas veces para conocer los riesgos reales para la salud, ya que una medida puntual podría no ser representativa.

6.3 Concentración de saxitoxina en la interacción *C. raciborskii* con sus depredadores

Los experimentos de exposición indirecta de MVCC19 a dos especies de zooplancton no produjeron cambios en la concentración total (intra y extracelular) de saxitoxina. Por lo que se rechaza la hipótesis alternativa de H1 (*La concentración de cianotoxinas producida por las células de *C. raciborskii* no aumenta por la presión por depredación ejercida por el zooplancton*).

Los resultados de los experimentos de inducción difieren de los hallados por otros autores, quienes observan un aumento en la concentración de cianotoxinas en presencia de depredadores. En especies productoras de PSP, la cianobacteria bentónica *Lyngbya wollei* (Oscillatoria) aumenta la producción de STX al ser depredada directamente por moluscos (Thacker et al., 2005). En *Microcystis aeruginosa* la producción de microcistinas totales aumenta 5 veces en exposición directa a depredadores y en menor medida en exposición indirecta a los 4 días (Jang et al., 2003). La concentración de animales utilizada para generar infoquímicos en el agua de cultivo agregada a los experimentos en el presente trabajo, fue similar a la de dicho trabajo de Jang et al. (2003 y 2007). Sin embargo, se ha observado que *C. raciborskii* es capaz de cambiar la concentración de cilindrospermopsina producida en pocas horas (Carneiro et al., 2003). Dado que la mayoría de los estudios sobre la producción de cianotoxinas en relación a la presión de depredación son sobre *Microcystis* y no hay estudios previos en *Cylindrospermopsis* u otras cianobacterias productoras de STX, sería esclarecedor realizar experimentos con otras cepas productoras de PSP y distintos tiempos de exposición a señales químicas de depredadores. Son necesarios más estudios comparando diferentes cepas y clones para ampliar la perspectiva sobre el papel de las cianotoxinas en la interacción con los depredadores.

A pesar que la concentración de fósforo fue mayor en el tratamiento con *D. pulex*, no se encontraron influencias significativas de este nutriente sobre la tasa de crecimiento. La disponibilidad de dicho nutriente, tampoco tuvo influencia sobre la concentración de toxinas producidas por la cepa MVCC19. Es probable que no haya tenido ningún efecto sobre el crecimiento dado que ninguna de las concentraciones observadas limitaría el crecimiento de MVCC19 (Amaral et al., 2014). Es de destacar, que la concentración de toxina medida en los experimentos de inducción incluyó la cianotoxina intra- y extra-celular. Si bien no es posible saber si hubo cambios en la localización de la cianotoxina en la célula durante el experimento, sí fue posible determinar posibles cambios en la concentración total. Además, en una cepa productora de saxitoxinas de *C. raciborskii* se observó que la toxina extracelular era indetectable en etapa de crecimiento exponencial y estacionaria (Carneiro et al., 2013). Por lo tanto, es de esperar que de haber habido cambios en la concentración de PSP intracelular, el diseño experimental utilizado hubiera permitido observarlos. Por lo tanto, la concentración de saxitoxina dentro de MVCC19 no estaría relacionada a la presencia indirecta de depredadores en el plazo ensayado. Por otro lado, este es el primer estudio en analizar posibles cambios en la morfometría de *C. raciborskii* debida a la exposición a depredadores y no se observaron cambios en el tiempo ensayado. Estudios en otras especies han reportado cambios, por ejemplo, en *Aphanizomenon gracile* (Nostocal) aumenta el ancho y disminuye el largo del filamento a los 6 días de exposición indirecta a *Daphnia magna* (Cerbin et al., 2013).

En cuanto a los efectos de *C. raciborskii* sobre el zooplancton, tanto las cepas tóxicas como no tóxicas afectaron de forma negativa la ingesta de alimento de *D. pulex*, *Notodiaptomus iheringii* y *Argyrodiaptomus cf. bergei*. A su vez, este efecto no estuvo relacionado al tipo de alimentación del depredador, no cumpliéndose la predicción 2 de la hipótesis 2 (*la tasa de aclarado de los filtradores selectivos sobre C. raciborskii tóxica será menor a la de los filtradores no selectivos*). En el caso de *Notodiaptomus* hubo diferencias entre el alimento palatable (clorofitas) y *C. raciborskii*, pero no entre ambas cepas de cianobacteria. Otros estudios muestran selectividad de *Notodiaptomus iheringii*, evitando la ingesta de las

cianobacterias tóxicas (Panosso et al., 2003). Sin embargo, la selectividad no se cumpliría de forma general para todas las poblaciones de *N. iheringii* ni para otras especies de copépodos herbívoros (Koski et al., 1999; Kâ et al., 2012; Rodríguez de Paiva, 2014). En el caso de *D. pulex*, tampoco hubo diferencias significativas entre las cepas de *C. raciborskii* a pesar de sus diferencias en toxicidad. La baja ingesta sobre las cepas de *C. raciborskii* podría estar influenciada por el tamaño de la cianobacteria. Se ha observado que al aumentar el tamaño del filamento aumenta la dificultad de manipulación por parte del cladóceros (Bednarska et al., 2014), sin embargo otros estudios no encuentran un efecto claro del largo del filamento de CYRF-01 sobre la capacidad de ingesta de *D. magna* (Panosso y Lüring, 2010). Además, en presencia de una cianobacteria tóxica de filamentos cortos, un aumento en la tasa de aclarado podría implicar una mayor ingesta de cianotoxinas, por lo que sus efectos podrían ser más importantes que los de los filamentos largos. En el caso de PSP, esto causaría inmovilidad total o parcial del aparato filtrador (Ferrão-Filho et al., 2014b). Otros estudios han observado que neonatos de *D. pulex* de entre 1.5 y 2 mm pueden ingerir filamentos de entre 100 y 1000 μm en condiciones similares a las del presente trabajo (Ferrao-Filho et al., 2014). Por lo tanto, es esperable que neonatos de 0,8-1,1 mm puedan ingerir filamentos de $< 200 \mu\text{m}$, como fue observado en el presente trabajo. Aun así, el tamaño del filamento, podría haber influido de forma importante la ingesta por parte de *D. pulex*. Además, otros compuestos activos de las cianobacterias, diferentes de las toxinas conocidas, podrían estar afectando a la actividad del zooplancton (da Costa et al., 2013).

En concordancia con la baja ingesta de *C. raciborskii* por ambas especies de zooplancton, en los ensayos de supervivencia, la exposición a *C. raciborskii* tóxica no afectó la supervivencia ni de *D. pulex* ni de dos poblaciones de *A. cf. bergei*, no cumpliendo con la predicción 3 de la hipótesis 2 (*la supervivencia de los depredadores no selectivos es menor a la de los no selectivos en presencia de MVCC19*). Los experimentos de tasa de aclarado muestran la baja o nula depredación de ambas especies de zooplancton sobre la cianobacteria tóxica. La bibliografía presenta resultados contradictorios en cuanto a la supervivencia del zooplancton

frente a cianobacterias tóxicas, especialmente de copépodos. En general hay consenso en que las cianobacterias filamentosas disminuyen el crecimiento poblacional del zooplancton a largo plazo (semanas/meses; Panosso et al., 2003; Berdnaska et al., 2013). Sin embargo, un estudio reciente de supervivencia de la población de *N. iheringii* utilizada en este trabajo, con CYRF-01 de 12 días, revela que esta población tuvo mayor supervivencia cuando es alimentada 100% con CYRF-01 que sin alimento (sobrevive hasta los días 10 y 8 respectivamente) y se hipotetiza que hay ingesta de alimento (Rodríguez de Paiva, 2014). Se ha planteado que los resultados de la interacción cianobacteria-zooplancton, pueden llegar a ser cepa-clon dependiente, lo cual podría explicar la diversidad de resultados experimentales (Asselman et al., 2014; Ferrão-Filho et al., 2014). Además, es importante considerar que la exposición previa del zooplancton a las cianotoxinas puede alterar la respuesta del zooplancton (Ger et al., 2011). En el presente trabajo, los organismos fueron aislados de sistemas sin cianobacterias productoras de PSP, por lo que dicho efecto no estaría presente. A su vez, las distintas especies y/o cepas de cianobacteria pueden tener, no sólo diferencias en la producción de toxinas, sino en la producción de otras moléculas alelopáticas que no han sido descritas con tanto detalle como las toxinas más conocidas (Zimmer y Ferrer, 2007). En los ambientes naturales, las diferencias en la sensibilidad de los clones de cladóceros pueden conllevar a cambios en las frecuencias genotípicas y por tanto la microevolución de las poblaciones (Ger et al., 2014). En ambientes con floraciones de cianobacterias permanentes los clones presentes estarían mejor adaptados a dichas condiciones ambientales, ya sea por ser más tolerantes a las toxinas (Ger et al., 2014; Kâ et al., 2012) o por tener la capacidad de evitar el alimento tóxico (Teegarden et al., 2001). Las floraciones de cianobacterias están generalmente acompañadas de otros grupos algales, pudiendo servir de alimento al zooplancton, particularmente a los filtradores selectivos. Experimentalmente se ha observado que *Eudiaptomus gracilis* puede aumentar la selectividad evitando la ingesta de *Microcystis* tóxica luego de 5 días exposición (Ger et al., 2011). Además, en estudios de campo, en el lago Javier, de dónde fue aislada la cepa MVCC19, las floraciones de *C. raciborskii* tóxica y *M. aeruginosa* son frecuentes (Somma, 2014). Durante dichas floraciones, la comunidad de

zooplancton está compuesta principalmente por calanoides y rotíferos, estando ausentes los cladóceros (Carballo, 2015). Las poblaciones del zooplancton presentes podrían estar siendo sostenidas por otros organismos del fitoplancton no cianobacterias, como algas eucariotas de pequeño tamaño (Lacerot et al., 2013).

Las cianotoxinas son metabolitos conservados a lo largo de la evolución de las cianobacterias a pesar de su alto costo de síntesis, dado que implican gran maquinaria metabólica (Leflaive et al., 2007). A su vez, dichas moléculas se producen de forma constitutiva y se acumulan dentro de las células, lo que suma al costo de la maquinaria metabólica, costos energéticos de síntesis y acumulación (resultados de inmunofluorescencia del presente trabajo; D' Agostino et al., 2014). Para que este costoso proceso se mantenga a lo largo de la evolución, dichas moléculas deben presentar ventajas ecológicas o fisiológicas para el organismo productor (Begon, 2006). Sin embargo, si estuvieran estrechamente relacionadas al metabolismo general de las células, el costo de producción extra podría disminuir incluso hasta ser despreciable. En este caso, la selección actuaría favoreciendo el proceso metabólico mientras que la defensa contra depredadores sería un beneficio secundario (Pohnert et al., 2007). Por ejemplo, se ha observado que metabolitos de defensa contra depredadores en microalgas marinas están estrechamente relacionados al mantenimiento osmótico de las células, por lo que las células no necesitan producir costosos metabolitos específicamente para la defensa (Steinke et al., 2002). En particular, para la saxitoxina producida por *C. raciborskii*, la producción de saxitoxina puede estar asociada positivamente a la tasa de crecimiento, pero no hay estudios que evalúen el cambio en la concentración de toxinas asociado a la tasa de crecimiento *per se*. En otros estudios, los cambios en la tasa de crecimiento están asociados a la variación en factores ambientales (Carneiro et al., 2009; Carneiro et al., 2013). Por ejemplo, en Carneiro et al. (2013) la dureza del agua altera el crecimiento de la cepa T3, cuando se inhibe el crecimiento la concentración de STX y NEO es indetectable, mientras que cuando la tasa de crecimiento aumenta, la concentración de cianotoxinas aumenta. En este trabajo, la producción de cianotoxinas en *C. raciborskii* estuvo relacionada a la tasa de crecimiento, no

estuvo relacionada a la presión de depredación y los efectos sobre los depredadores no fueron letales a corto plazo. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las cianotoxinas son productos del metabolismo asociado al crecimiento de las células antes que defensa contra depredadores. Por otro lado, es conocido que los metabolitos secundarios (incluidas las toxinas) son importantes en el ensamblaje de las especies que componen una comunidad (Raguso, 2012). Por lo tanto, las cianotoxinas podrían tener un papel vinculado al *quórum sensing*, ya sea entre organismos de la misma especie o de otra especie pero de la misma comunidad. Por ejemplo, podrían mediar interacciones alelopáticas para aliviar presión de competencia. Es de interés seguir profundizando en el o los papeles ecológicos que pueden llegar a tener estas moléculas.

7 Conclusiones

- › Se amplió el conocimiento de estas moléculas al visualizar su distribución intracelular mediante la puesta a punto de una técnica de inmunofluorescencia *in situ*. Dicha técnica es reproducible y óptima para la detección de saxitoxina dentro de *C. raciborskii* y puede ser de utilidad para estudios eco-fisiológicos en cianobacterias.
- › La concentración de saxitoxina en MVCC19 está relacionada a la fase de crecimiento en la que se encuentre y no dependería de la presencia indirecta de depredadores. Por lo tanto, la producción de saxitoxina estaría relacionada a factores del metabolismo celular más que a la presión por depredación.
- › La ingesta de cianobacterias tóxicas tanto para depredadores selectivos como no selectivos, estaría relacionada en parte al tamaño del filamento además de que podría estar influenciada por la toxicidad del alimento y otros compuestos activos de las cianobacterias, en el rango de tamaños estudiado.
- › La supervivencia de los depredadores utilizados (selectivos y no selectivos) frente a cianobacterias tóxicas, a corto plazo, estaría relacionada a su capacidad de ingerirlas. Por lo tanto, filamentos tóxicos de gran tamaño *per se* no representarían un riesgo para los depredadores a corto plazo.

Referencias

- Agrawal A.A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294: 321-326.
- Amaral V., Bonilla S. y Aubriot L. 2014. Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations. *European Journal of Phycology* 49: 134–141.
- Antunes J.T., Leão P.N. y Vasconcelos V.M. 2012 a. Influence of biotic and abiotic factors on the allelopathic activity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* strain LEGE 99043. *Microbial Ecology* 64:584-92.
- Antunes J.T., Leão P.N. y Vasconcelos V.M. 2012 b. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology* 6: 473.
- Asselman J., Hochmuth J.D. y De Schamphelaere K.A.C. 2014. A comparison of the sensitivities of *Daphnia magna* and *Daphnia pulex* to six different cyanobacteria. *Harmful Algae* 39: 1–7.
- Bar-Yosef Y., Sukenik A., Hadas O., Viner-Mozzini Y. y Kaplan A. 2010. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Current Biology* 20: 1557–61.
- Bednarska A., Pietrzak B. y Pijanowska J. 2014. Effect of poor manageability and low nutritional value of cyanobacteria on *Daphnia magna* life history performance. *Journal of Plankton Research* 36: 838–847.
- Begon M., Townsend C.R., Harper J.L. 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems*. Wiley-Blackwell, Malden.
- Bernard C., Harvey M., Briand J.F., Biré R., Krys S. y 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.
- Bonilla, S. 2009. *Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de monitoreo*. PHI-VII Documento técnico 16, UNESCO. Montevideo.

- Bonilla S., Aubriot L., Soares M.C.S., González-Piana M., Fabre A., Huszar V.L.M., Lüring, M. Antoniadis D., Padisák J. y Kruk C. 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology* 79: 594–607.
- Bonilla S. y Meerhoff M. 2013. Estado actual de la calidad del agua de sistemas acuáticos superficiales en Uruguay y recomendaciones, con énfasis en la cuenca del Río Santa Lucía; Informe Calidad de Agua de Sistemas Acuáticos Superficiales, Fac. Ciencias-CURE, UdelaR, Uruguay. 22 pp.
- Bottrell H.H., Duncan A., Giliwicz Z.M., Grygierek E., Herzig A., Hilbricht A., Kurasawa H., Larsson P. y Weglenska, T. 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norwegian Journal of Zoology* 24: 419–456.
- Briand J.F., Bernard C. y Dufour P. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Phycological Society of America* 40: 231-238.
- Burns C.W. 1968. The relationship between body size of filter-feeding Cladocera and the maximum size of particle ingested. *Limnology and Oceanography* 13: 675–678.
- Carballo C. 2015. Implicancias del zooplancton en la exportación de carbono en lagos subtropicales. Tesis de Maestría, Universidad de la República, Uruguay.
- Carneiro R.L., Venancio M.E.D.S., Furlanetto A.B. y Azevedo S.M.F.O. 2009. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton Research* 31: 481–488.
- Castro D., Vera D., Lagos N., García C. y Vásquez M. 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 44: 483–9.
- Cerbin S., Wejnerowski Ł. y Dziuba M. 2013. *Aphanizomenon gracile* increases in width in the presence of *Daphnia*. A defence mechanism against grazing? *Journal of Limnology* 72: 505–511.
- Chonudomkul D., Yongmanitchai W. y Theeragool G. 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 345–355.

- Chorus I. y Bartram J. 1999. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chapman y Hall. London.
- Chorus I. 2012. *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Federal Environment Agency, Germany.
- Clark M. y Jones W.W. 2006. Lake Lemon annual monitoring report for 2005, Prepared for the Lake Lemon Conservancy District, Unionville, IN. School of Public y Environmental Affairs, Indiana University, Bloomington, Indiana. 37 pp.
- Cohan F.M. 2006. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361: 1985–1996.
- Cremella B. 2014. Factores involucrados en la expansión de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* en el continente americano. Tesis de Licenciatura, Universidad de la República, Uruguay.
- Cusick K.D. y Sayler G.S. 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs* 11: 991–1018.
- D'Agostino P.M., Moffitt M.C. y Neilan B.A. 2014. Current knowledge of paralytic shellfish toxin biosynthesis, molecular detection and evolution. En: *Toxins and biologically active compounds from microalgae. Origin, chemistry and detection*. (G.P. Rossini), pp. 251–280, CRC Press, Florida.
- Da Costa S.M., da S Ferrão-Filho A. y Azevedo S.M.F.O. 2013. Effects of saxitoxin- and non-saxitoxin-producing strains of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on the fitness of temperate and tropical cladocerans. *Harmful Algae* 28: 55-63.
- Deeds J.R., Landsberg J.H., Etheridge S.M., Pitcher G.C. y Longan S.W. 2008. Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. *Marine Drugs* 6: 308–48.
- DeMott W.R. 1988. Discrimination between algae and artificial particles by freshwater and marine copepods. *Limnology and Oceanography* 33: 397–408.
- DeMott W.R. y Moxter F. 1991. Foraging cyanobacteria by copepods: responses to chemical defense and resource abundance. *Ecology* 72: 1820-1834.
- Derby C.D. y Aggio J.F. 2011. The neuroecology of chemical defenses. *Integrative and Comparative Biology* 51: 771-780.

- Fabre A., Carballo C., Hernández E., Píriz P., Bergamino L., Mello L., González S., Pérez G., León J.G., Aubriot L., Bonilla S. y Kruk C. 2010. Nitrogen and euphotic/mixing zone ratio explain cyanobacterial occurrence in small subtropical man-made lakes (Uruguay). *Pan-American Journal of Aquatic Science* 5: 212.
- Fabre A. 2011. Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* en un gradiente lumínico. Tesis de Licenciatura, Universidad de la República, Uruguay.
- Ferber L.R., Levine S.N., Lini A. y Livingston G.P. 2004. Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshwater Biology* 49: 690-708.
- Ferrão-Filho A.S., da Costa S.M., Leitao Rivero M.G. y Azevedo S.M.F.O. 2008. Effects of a saxitoxin producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology* 23: 161-168.
- Ferrão-Filho A.S., Soares M.C.S., Freitas de Magalhães V. y Azevedo S.M.F.O. 2010. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. *Environmental Pollution* 158: 2084-2093.
- Ferrão-Filho A.S., y Kozlowsky-Suzuki B. 2011. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine Drugs* 9: 2729-2772.
- Ferrão-Filho A.S., Galvão L.E.C. y Magalhães V.F. 2014. Differential susceptibility of cladoceran species to a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 9: 33-41.
- Ferrão-Filho A. da S., Soares M.C.S., Lima R.S. y Magalhães V.F. 2014(b). Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* (cladocera). *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 33, 223-9.
- Galvão J.A., Oetterer M., Bittencourt-Oliveira M.C., Gouvea-Barros S., Hiller S., Erler K., Lukas B., Pinto E. y Kujbida P. 2009. Saxitoxin accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. *Toxicon* 54: 891-894.
- García-Alonso J., Ayoola J.A.O., Crompton J., Rebscher N. y Hardege D. 2011. Development and maturation in the nereidid polychaetes *Platynereis dumerilii* and *Nereis succinea* exposed to xenoestrogens. *Comparative Biochemistry and Physiology* 154: 196-203.
- Ger K.A., Arneson P., Goldman C.R. y Teh S.J. 2010. Species specific differences in the ingestion of *Microcystis* cells by the calanoid copepods *Eurytemora affinis* and *Pseudodiaptomus forbesi*. *Journal of Plankton Research* 32: 1479-1484.

- Ger K.A., Panosso R. y Lürling M. 2011. Consequences of acclimation to *Microcystis* on the selective feeding behavior of the calanoid copepod *Eudiaptomus gracilis*. *Limnology and Oceanography* 56: 2103-2114.
- Giovannoni S.J. y Stingl U. 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437: 343–8.
- Haande S., Rohrlack T., Ballot A., Røberg K., Skulberg R., Beck M. y Wiedner C. 2008. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 7: 692–701.
- Havens K. 2008. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. En: *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer. New York.
- Hillebrand H., Dürselen C.-D., Kirschtel D., Pollinger U. y Zohary T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403–424.
- Huisman J., Matthijs C. y Visser P.M. (Eds.). 2005. *Harmful Cyanobacteria*. Springer. Dordrecht.
- Humpage A.R., Magalhaes V.F. y Froscio S.M. 2010. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397: 1655–1671.
- Hunyady B., Krempels K., Harta G. y Mezey E. 1996. Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its amplification in double immunostaining. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 44: 1353-1362.
- Jang M-H., Ha K., Joo G. y Takamura N. 2003. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology* 48: 1540-1550.
- Jang M-H., Ha, K. y Takamura N. 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon* 49: 727-733.
- Kâ S., Mendoza-Vera J.M., Bouvy M., Champalbert G., N’Gom-Kâ R. y Pagano M. 2012. Can tropical freshwater zooplankton graze efficiently on cyanobacteria? *Hydrobiologia* 679: 119-138.
- Kaplan A., Harel M., Kaplan-Levy R.N., Hadas O., Sukenik A. y Dittmann E. 2012. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Environmental Toxicology* 19: 453-459 .

- Koski M., Engström J. y Viitasalo M. 1999. Reproduction and survival of the calanoid copepod *Eurytemora affinis* fed with toxic and non-toxic cyanobacteria. *Marine Ecology Progress Series* 186: 187–197.
- Kosten S., Huszar V.L.M., Bécares E., Costa L.S., Donk E., Hansson L.-A., Jeppesen E., Kruk C., Lacerot G., Mazzeo N., Meester L., Moss B., Lürling M., Nöges T., Romo S. y Scheffer M. 2012. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology* 18: 118–126.
- 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.
- Kurmayer R., Dittmann E., Fastner J. y 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.
- Lacerot G., Kruk C., Lürling M. y Scheffer M. 2013. The role of subtropical zooplankton as grazers of phytoplankton under different predation levels. *Freshwater Biology* 58: 494–503.
- Lagos N., Onodera H., Zagatto P.A., Andrinolo D., Azevedo S.M.F.O. y Oshima Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359–1373.
- Lampert W. y Sommer U. 2007. *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*, Oxford University Press. Nueva York.
- Leflaive J. y Ten-Hage L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52:199-214.
- Long B.M., Jones G.J. y Orr P.T. 2001. Cellular microcystin content in N-Limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 278–283.
- Lukas B., Hummert C. y Oshima Y. 2004. Analytical methods for paralytic shellfish poisons. En: *Manual on harmful marine microalgae* (Hallegraedd G.M., Anderson D.M. y Cebella A.D.). pp: 191-209. UNESCO publishing. Paris.
- Lürling M. y Verschoor A. 2003. FO-spectra of chlorophyll fluorescence for the determination of zooplankton grazing. *Hydrobiologia* 491: 145–157.

- Lürling M. y Beekman W. 2006. Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: defence against rotifer predators? *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 42: 65-72.
- Marco S., Aboal M., Chaves E., Mulero I. y García-Ayala A. 2012. Immunolocalisation of microcystins in colonies of the cyanobacterium *Rivularia* in calcareous streams. *Marine and Freshwater Research* 63: 160-165.
- Martigani 2012. Influencia de la deficiencia por nutrientes en el crecimiento y la producción de toxinas de una cianobacteria invasora. Tesis de Licenciatura, Universidad de la República, Uruguay.
- Mehnert G., Leunert F., Cires S., Johnk K.D., Rucker J., Nixdorf B. y Wiedner C. 2010. Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *Journal of Plankton Research* 32: 1009-1021.
- Molica R., Onodera H., García C., Rivas M., Andrinolo D., Nascimento S., Meguro H., Oshima Y., Azevedo S. y Lagos N. 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41: 606–611.
- Montgomery D.C y Runger G.C. 2002. *Applied Statistics and Probability for Engineers*, John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Moore L.R., Rocap G. y Chisholm S.W. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Letters to Nature* 576: 220–223.
- Morse S.S. y Hughes J.M. 1996. Developing an integrated epidemiologic approach to emerging infectious diseases. *Epidemiologic Reviews* 18: 1–3.
- Moss B., Koten S., Meerhoff M., Battarbee R.W., Jeppensen E., Mazzeo N., Havens K., Lacerot G., Liu Z., De Meester L., Paerl H. y Scheffer M. 2011. Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland Waters* 1: 101-105.
- Moyes R.B. 2009. Fluorescent staining of bacteria: viability and antibody labeling. En: *current protocols in microbiology* (McBride A., Quarles J., Stevenson B., y Taylor R.). pp. 15:A.3K.1-A.3K.13. Ultimo acceso 14/02/2015. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mca03ks15/abstract>.

- Murray S.A., Mihali T.K. y Neilan B.A. 2010. Extraordinary conservation, gene loss and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Molecular Biology and Evolution* 28: 1173-1182.
- Neilan B., Pearson L., Muenchhoff J., Moffitt M.C. y Dittmann E. 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 15: 1239–1253.
- Nogueira I.C.G., Saker M.L., Pflugmacher S., Wiegand C. y Vasconcelos V.M. 2004. Toxicity of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology* 19: 453-459.
- Padisák J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv Für Hydrobiologie Supplement* 107: 563-593.
- Panosso R., Kozlowsky-Suzuki B., Azevedo S.M.F.O. y Granélli E. 2003. Effect of grazing by a neotropical copepod, *Notodiaptomus*, on a natural cyanobacterial assemblage and on toxic and non-toxic cyanobacterial strains. *Journal of Plankton Research* 25: 1169-1175.
- Panosso R. y Lürling M. 2010. *Daphnia magna* feeding on *Cylindrospermopsis raciborskii*: the role of food composition, filament length and body size. *Journal of Plankton Research* 10:1393-1404.
- Pearson L., Mihali T., Moffitt M., Kellmann R. y Neilan B. 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8: 1650-1680.
- Pernthaler A., Pernthaler J. y Amann R. 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3094-3101.
- Piccini C., Aubriot L., Fabre A., Amaral V., González-Piana M., Giani A., Figueredo C.C., Vidal L., Kruk C. y 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.
- Pohnert G., Steinke M. y Tollrian R. 2007. Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 198–204.

- Porter K.G. y Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948.
- Raguso R. 2012. New synthesis: exploring the chemical links in ecological food webs. *Journal of Chemical Ecology* 38: 441.
- Rebscher N., Zelada-González F., Banisch T.U., Raible F. y Arendt D. 2007. *Vasa unveils* a common origin of germ cells and of somatic stem cells from the posterior growth zone in the polychaete *Platynereis dumerilii*. *Developmental Biology* 306: 599-611.
- Reynolds C.S. 1984. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Rocha O. y Duncan A. 1985. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *Journal of Plankton Research* 7: 279-294.
- Rodríguez de Paiva R. 2014. Efeitos da cianobactéria tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* na alimentação, sobrevivência e reprodução de um copépodo calanpide neotropical. Tesis de Maestría, Universidad Federal do Juiz do Fora, Brasil.
- Shalev-Malul G., Lieman-Hurwitz J., Viner-Mozzini Y., Sukenik A., Gaathon A., Lebendiker M. y Kaplan A. 2008. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. *Environmental Microbiology* 10: 988-999.
- Sinha R., Pearson L., Davis T.W., Burford M., Orr P.T. y Neilan B. 2012. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones - Is climate change responsible? *Water research* 46: 1408-19.
- Sinha R., Pearson L. a, Davis T.W., Muenchhoff J., Pratama R., Jex A., Muenchhoff J., Pratama R., Jex A., Burford M. y Neilan B. 2014. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BioMed Central Genomics* 15: 83p.
- Smayda T.J. 1997. What is a bloom? *Limnology and Oceanography* 42:1132-1136.
- Soares M.C.S., Lürling M., Panosso R. y Huszar V. 2009a. Effects of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on feeding and life-history characteristics of the grazer *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1183-1189.

- Soares M.C.S., Vidal L.O., Roland F. y Huszar V.L.M. 2009b. Cyanobacterial equilibrium phases in a small tropical impoundment. *Journal of Plankton Research* 31: 1331–1338.
- Soares M.C.S., De A. Rocha M.I., Marinho M.M., Azevedo S.M.F.O., Branco C.W.C. y Huszar V.L.M. 2009c. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: Physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquatic Microbial Ecology* 57: 137–149.
- Soares M.C.S., Huszar V.L.M., Miranda M.N., Mello M.M., Roland F. y Lüring M. 2013. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia* 717: 1-12.
- Somma A. 2014. El papel de la luz y la temperatura en la dinámica de cianobacterias en un lago de uso recreativo. Tesis de Licenciatura, Universidad de la República, Uruguay.
- Sommer U. y Stibor H. 2002. Copepoda – Cladocera – Tunicata: The role of three major mesozooplankton groups in pelagic food webs. *Ecological Research* 7: 161-174.
- Soto-Liebe K., Murillo A., Krock B., Stucken K., Fuentes-Valdés J.J., Trefault N., Cembella A. y Vásquez M. 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon* 56: 1350–61.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M. y Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriology Reviews* 35: 171-205.
- Steinke M., Malin G. y Liss P.S. 2002. Trophic interactions in the sea: an ecological role for climate relevant volatiles? *Journal of Phycology* 38: 630–638.
- Strichartz G. 1984. Structural determinants of the affinity of saxitoxin for neuronal sodium channels. Electrophysiological studies on frog peripheral nerve. *The Journal of General Physiology* 84: 281–305.
- Stucken K., Murillo A.A., Soto-Liebe K., Fuentes-Valdés J.J., Méndez M.A. y Vásquez M. 2009. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 37–48.
- Teegarden G., Campbell R. y Durbin E. 2001. Zooplankton feeding behavior and particle selection in natural plankton assemblages containing toxic *Alexandrium* spp. *Marine Ecology Progress Series* 218: 213-226.

- Thacker R.W., McLeod A.M. y McLeod S.W. 2005. Herbivore-induced saxitoxin production in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie* 117: 415-425.
- Tollrian R. y Harvell C.D. 1999. *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press.
- van Apeldoorn M.E., van Egmond H.P., Speijers G.J.A. y Bakker G.J.I. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition y Food Research* 51: 7-60.
- Van de Waal D.B., Ferreruella G., Tonk L., Van Donk E., Huisman J., Visser P.M. y Matthijs H.C.P. 2010. Pulsed nitrogen supply induces dynamic changes in the amino acid composition and microcystin production of the harmful cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 430-438.
- Van Donk E., Ianora A. y Vos M. 2010. Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: a review. *Hydrobiologia* 668: 3–19.
- Vico P., Aubriot L., Martigani F., Bonilla S. y Piccini C. 2012. Evaluación de la expresión de genes involucrados en la producción de saxitoxina en *C. raciborskii*: ¿el estado nutricional influye en la síntesis de la toxina? XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (Piriápolis, Uruguay).
- Vidal L. y Kruk C. 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 3:142-151.
- Whitton B.A. y Potts M. 2000. *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Wiedner C., Rücker J., Brüggeman R. y Nixdorf B. 2007. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia* 152: 473–484.
- Wiese M., D'Agostino P.M., Mihali T.K. y Moffitt M.C. 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8: 2185-2211.
- Wilson A.E. 2006. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. *Limnology and Oceanography* 51:1915-1924.

- Wood S.A., Pochon X., Luttringer-Plu L., Vant B.N. y Hamilton D.P. 2014. Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *Harmful Algae* 39: 64-74.
- Yang Z., Kong, F.X., Shi X.L. y Cao H.S. 2006. Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. *Hydrobiologia* 563:225–230.
- Yilmaz M., Philips E.J., Szabo N.J. y Badylak S. 2008. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon* 51: 130-139.
- Yilmaz M. y Philips E.J. 2011. Toxicity and genetic diversity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Florida, USA. *Lake Reservoir Management* 27: 235-244.
- Zimmer R.K. y Ferrer R.P. 2007. Neuroecology, chemical defense, and the keystone species concept. *The Biological Bulletin* 213: 208-225.

Anexo I

Metodología detallada de HPLC

La extracción de PSP se realizó con ácido acético (0,5 M), posterior agitación con vortex durante 1 min y luego en agitador automático durante 30 min, por último sonicación durante 15 min. Cada solución fue luego centrifugada (12000 rpm, 20 min) a temperatura controlada ($< 4^{\circ}\text{C}$) y filtrada (filtro de fluoruro de polivinilideno hidrófilo, de $0,45\ \mu\text{m}$ de poro, Tedia). Las muestras se analizaron mediante HPLC Shimadzu según el protocolo de Oshima (1995). Se utilizó una columna reversa de gel de sílice (125 mm x 4,0 mm; $5\ \mu\text{m}$; Lichrospher 100 RP 18), inyector de repetición (SIL-10AF) y detector de fluorescencia (RF 10A XL) con excitación a 330 nm y emisión a 390 nm. Se inyectaron $10\ \mu\text{l}$ de cada muestra y las variantes analizadas fueron saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO) en una primera corrida y gonayautoxinas 1 a 4 (GTX1-4) en una segunda instancia. La fase móvil para STX y NEO fue: heptansulfato (2 mM) en fosfato de amonio (30 mM) y 6% de acetonitrilo; pH = 7,1 y flujo $0,8\ \text{ml}\ \text{min}^{-1}$. Para GTX 1-4: heptanosulfato (2 mM) en fosfato de amonio (10 mM); pH final = 7,1 y flujo $0,8\ \text{ml}\ \text{min}^{-1}$. Las toxinas fueron identificadas y cuantificadas mediante comparación con curvas de calibración con estándares comerciales para cada análogo de toxina. Los estándares fueron provistos por el Instituto de Biociencias Marinas, Consejo Nacional de Investigación de Canadá (Halifax, Canadá). Los límites de detección fueron: $0,89\ \text{ng}\ \text{STX}\ \text{l}^{-1}$; $2,33\ \text{ng}\ \text{NEO}\ \text{l}^{-1}$; $1,03\ \text{ng}\ \text{GTX1}\ \text{l}^{-1}$; $0,72\ \text{ng}\ \text{GTX2}\ \text{l}^{-1}$; $0,21\ \text{ng}\ \text{GTX3}\ \text{l}^{-1}$ y $0,24\ \text{ng}\ \text{GTX4}\ \text{l}^{-1}$.

Anexo II

Protocolo definitivo de la técnica de inmunofluorescencia *in situ*

- Fijar un cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* (DO entre 2,5 y 3,0 UA) con 1% de PFA, 1 h en oscuridad.
- Filtrar 300 µl del cultivo con 1 ml de PBS 1X (buffer solución salina-fosfato, 140 mM NaCl, 3 mM KH₂PO₄, 11 mM Na₂HPO₄, pH = 7,2) por filtros Millipore GTTP 0,22 µm.
- Embeber los filtros en agarosa (1% vol/vol en agua ultra pura) y dejar secar boca abajo sobre lámina plástica, a 37 °C.
- Incubar en HCl 0,01 M, 15 min, a temperatura ambiente. Lavar 3 veces con agua ultra pura.
- Incubar con el anticuerpo primario (anti-STX policlonal de conejo, del kit comercial para STX Abraxis) a 37 °C, en cámara húmeda, durante toda la noche.
- Lavaron con bloqueante, PBS/BSA 2% (PBS 1X, seroalbúmina bobina 2g/ml).
- Incubar con el anticuerpo secundario (anti-conejo-peroxidasa, dilución 1/1000 en bloqueante) durante 30 min a la temperatura ambiente. Lavar con PBS 1X durante 15 min.
- Incubar con el sustrato (tiramida-FITC, 1/1000) en buffer de amplificación con H₂O₂ (30%) en oscuridad, durante 15 min a 37°C. Lavar con PBS 1X, durante 15 min, en oscuridad, a temperatura ambiente, luego con agua ultrapura y finalmente con etanol 95 %.
- Montar en portaobjeto con Citifluor y revelar en microscopio confocal.

Anexo III

Publicaciones científicas producidas

“Combining immunofluorescence and catalyzed reporter deposition to detect intracellular saxitoxin in a cyanobacterium”, Claudia Piccini, Amelia Fabre, Gissell Lacerot y Sylvia Bonilla. Aceptado en “Journal of Microbiological Methods”. Documento adjunto.

“South American strains of *Cylindrospermopsis raciborskii*: toxin profiles and effects on zooplankton” Amelia Fabre, Rafael Rodrigues de Paiva, Gissell Lacerot, M. Carolina S. Soares, Valéria Freitas de Magalhães y Sylvia Bonilla, en preparación.

Amelia Fabre, Gissell Lacerot, María Carolina S. Soares, Rafael Rodrigues de Paiva y Sylvia Bonilla. Presentación oral en Simposio “Ecotoxicologia: Importância, Interfaces e Perspectivas” titulada “Efectos de una cianobacteria neurotóxica sobre la tasa de aclarado y supervivencia de zooplancton con filtración selectiva y no selectiva”, “XIV Congresso Brasileiro de Limnología”, Bonito, Brasil.