

EFFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MICROCISTINAS EN UNA CEPA DE *Microcystis aeruginosa* EN CULTIVOS DE LABORATORIO

Melina Celeste Minaglia Crettaz^{1,3,4}, Lorena¹ Rosso
Jorge Oswaldo Aranda¹, Sandro Goñi^{2,4}, Daniela Sedan^{1,4},
Dario Andrinolo^{1,4}, Leda Giannuzzi^{1,2,4}

¹Area de Toxicología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP-CONICET), La Plata, Argentina, 48 y 115 (1900).

² Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-CONICET), La Plata, Argentina, 47 y 116 (1900).

³Laboratorio de Indicadores Biológicos y Gestión Ambiental de Calidad de Agua (IBGA-FCyT-UADER), San Martín 555, Gualeguaychú, Argentina.

⁴CONICET.

Introducción

Las floraciones de cianobacterias son un problema global en ecosistemas de agua dulce que ponen en riesgo las fuentes de agua potable y recreacionales. Las altas temperaturas favorecen el desarrollo de floraciones en regiones templadas (Robarts y Zohary, 1987). Por ello, los escenarios de cambio climático podrían provocar aumentos de temperatura incrementando la frecuencia e intensidad de las floraciones algales con dominio de cianobacterias. En particular, *Microcystis aeruginosa* es una especie frecuente en todo el mundo y es conocida por producir más de 80 variantes de una potentes hepatotoxinas denominadas microcistinas (MCs). Además, durante las floraciones se incrementan las interacciones, que pueden ser mutuamente beneficiosas, entre las algas y otros microorganismos en la ficosfera. Algunos de estos pueden ser patógenos y están representados por bacterias, hongos, ciliados y ameboides. Dziallas y Grossart (2011^a) hallaron importantes diferencias en las comunidades bacterianas asociadas a *M. aeruginosa* bajo diferentes temperaturas con impactos en la producción de MCs; observando que a temperaturas mayores de 20 °C se incrementan los grupos de bacterias patógenas para humanos. Es por esto que las floraciones tienen implicancias ecológicas y sanitarias.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la temperatura en la producción de MCs y su relación con los ensambles de bacterias mesófilas asociados a la cepa tóxica nativa de *Microcystis aeruginosa* CAAT-03-2005 en cultivos de laboratorio.

Materiales y métodos

Cepa utilizada: Se utilizó una cepa tóxica autóctona (CAAT-03-2005) productora de [D-Leu¹] MC-LR caracterizada previamente por Rosso y col. (2014).

Diseño experimental. El experimento fue realizado por triplicado en medio de cultivo BG11 modificado (Rippka y col., 1979) en condiciones controladas de temperatura (26 °C, 28 °C, 30 °C y 35 °C), aireación constante con aire estéril húmedo, a intensidad de luz de 30 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con ciclo luz: oscuridad 10:14 horas. Los cultivos fueron aclimatados por 7 días adicionando periódicamente medio de cultivo a 28 °C y baja intensidad de luz con el fin de

obtener un inoculo a baja densidad y sincronizado. El inoculo inicial fue de 10^5cél.mL^{-1} . Los cultivos fueron examinados periódicamente durante 15-20 días y se realizaron las siguientes mediciones:

Recuento de células (cél.mL^{-1}); por conteo directo en microscopio óptico a 400 X con cámara de Neubauer previa disgregación de colonias y adición de solución de Lugol.

Clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$); con espectrofotómetro, posterior a una extracción con metanol al 100% a 4°C por 24 horas, a longitudes de onda de 665 y 750 nm, antes y después de acidificar con ácido clorhídrico (HCl) 1N.

[D-Leu¹] MC-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$); se sonicaron alícuotas de cultivo durante 30 minutos (Omni Ruptor 400) y luego se centrifugaron por 15 minutos a 5.000 rpm/min. El sobrenadante fue pasado por cartuchos Sep-Pak C-18 (Waters) previo acondicionamiento (10 ml de metanol 100%, 50 mL de agua destilada 100%) y las MCs fueron eluidas en metanol al 80%. Las MCs se cuantificaron con HPLC/MS Shimadzu LCMS-2020 determinando el principal componente de *[D-Leu¹] MC-LR* (m/z 520) usando una columna C18 (Hyperprep HS, 5- μm poro, 250 mm 10 mm). La columna fue equilibrada con una mezcla compuesta de 65% de la solución A [agua con 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético] y 35% de la solución B [acetoneitrilo con 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético]. La fase móvil consistió en un gradiente discontinuo de las soluciones A y B. El flujo fue de 1,0 mL/min. Se utilizó un patrón estándar de MC-LR de Sigma (St. Louis, MO, USA).

La producción de *[D-Leu¹] MC-LR* fue descrita como una tasa de crecimiento dependiente de acuerdo con el modelo dinámico propuesto por Jähnichen y col. (2001):

$$\frac{dM}{dt} = p * \frac{dx}{dt} - d_m * M \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde **M** es la concentración de MC, **p** es el coeficiente de la producción de MC que describe una cantidad constante de MC que pasa a cada nueva célula durante la división celular y **d_m** es la velocidad de depleción de primer orden de MC la cual tiene en cuenta la disminución intracelular de MC en el tiempo en el cultivo *batch* (Jähnichen y col., 2001). **dx/dt** corresponde a la derivada del crecimiento de *M. aeruginosa* aplicando la ecuación de Gompertz que fuera previamente descrito en un trabajo (Crettaz Minaglia y col., 2016).

$$\frac{dX}{dt} = 10^{a + \exp(c * \exp(-\exp(-b * (t-m)))) * c * \exp(-\exp(-b * (t-m))) * -\exp(-b * (t-m)) * (-b) * \ln(10)} \quad \text{Ec. 2}$$

Dónde **a**, **c**, **b** and **m** fueron ajustados a los datos experimentales de curvas de crecimiento luego de aplicar la ecuación de Gompertz para los recuentos celulares (Crettaz Minaglia y col., 2016).

Las ecuaciones fueron resueltas analíticamente usando un método de cuarto orden Runge-Kutta. El coeficiente **p** (fg.célula^{-1}), la tasa de depleción **d_m** (días^{-1}) y la producción de *[D-Leu¹] MC-LR* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) fueron determinados con el procedimiento de cuadrados mínimos.

Además, la MC se expresó de dos formas diferentes: en relación al número de células ($Q_{MC}(\text{fgMC} \cdot \text{cel}^{-1})$) y en relación a la clorofila-a como $Q_{\text{clo-a}}(\text{fgMC} \cdot \text{ngClo-a}^{-1})$ que es el cociente entre $[\text{D-Leu}^1]\text{-MC-LR}$ y la clorofila-a.

Bacterias aerobias mesófilas totales (AMT; $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$); por recuento en placa, sembrando 1 mL de las diluciones seriadas en buffer fosfato en agar Plate Count e incubadas a 37 °C por 48 horas.

Análisis estadístico; se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Fisher a un nivel de significación de 0,05 y 0,01 utilizando el *software Systat* (Systat Inc., version 5.0).

Resultados

Los valores iniciales de producción $[\text{D-Leu}^1]\text{ MC-LR}$ variaron entre 100 – 150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; lo que fue atribuido a los inóculos iniciales. Al finalizar el experimento (~20 días), los valores de $[\text{D-Leu}^1]\text{ MC-LR}$ fueron 950, 500, 365 y 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ a 26 °C, 28 °C, 30 °C y 35 °C, respectivamente. La máxima producción de $[\text{D-Leu}^1]\text{ MC-LR}$ (a 26 °C) decreció 9,5 veces cuando la temperatura se incrementó de 26 °C a 35 °C. Estos resultados son coincidentes con lo informado por Dziallas y Grossart (2011^b) y Giannuzzi y col. (2016) que hallaron similares relaciones entre la temperatura y la producción de cianotoxinas. La disminución de la concentración de toxina encontrada a mayor temperatura puede ser el resultado del aumento en la biomasa celular debido a la producción y acumulación de ácidos grasos de alto peso molecular y de carbohidratos más que del contenido de toxina.

En la Figura 1, se observa la aplicación del modelo propuesto para las 4 temperaturas ensayadas. Se obtuvo una buena correlación ($R^2=0,917-0,987$) entre los datos experimentales y los valores predichos. Al aumentar la temperatura, el valor de p decreció y hubo diferencias significativas ($p<0,05$) entre 26 °C y las demás temperaturas ensayadas (Tabla I).

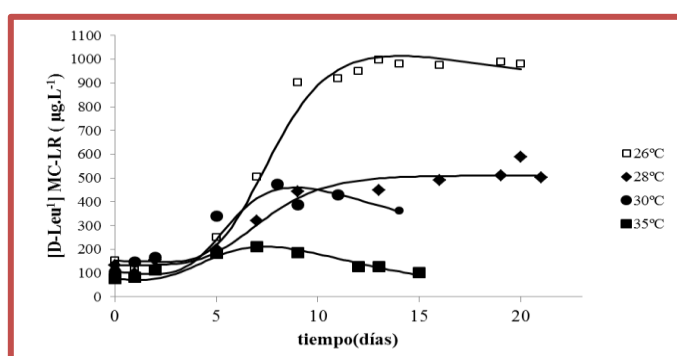


Figura 1: Modelado de la producción de $[\text{D-Leu}^1]\text{ MC-LR}$ en medio de cultivo, las líneas sólidas corresponden a la aplicación del modelo (ecuación 1) de los datos experimentales a ● 26 °C, ▼ 28 °C, ■ 30 °C y ▲ 35 °C.

Estos resultados se corresponden con los valores de p informados por Jähnichen y col. (2001) para *M. aeruginosa* en cultivos no axénicos.

T (°C)	p (fg.cél ⁻¹)	d _M (día ⁻¹)	R ²
26	63,89±3,68 ^a	1,37×10 ⁻² ±6,19×10 ⁻³	0,987
28	18,24±2,67 ^b	7,96×10 ⁻⁴ ±9,30×10 ⁻³	0,965
30	27,91±8,05 ^b	6,89×10 ⁻² ±4,88×10 ⁻²	0,917
35	31,35±4,80 ^b	1,63×10 ⁻¹ ±2,95×10 ⁻²	0,926

Tabla I: Parámetros estimados de la aplicación del modelo (ecuación 1) a los datos experimentales, coeficiente de producción de [D-Leu¹] MC-LR (p) y tasa de reducción de [D-Leu¹] MC-LR (d_M).

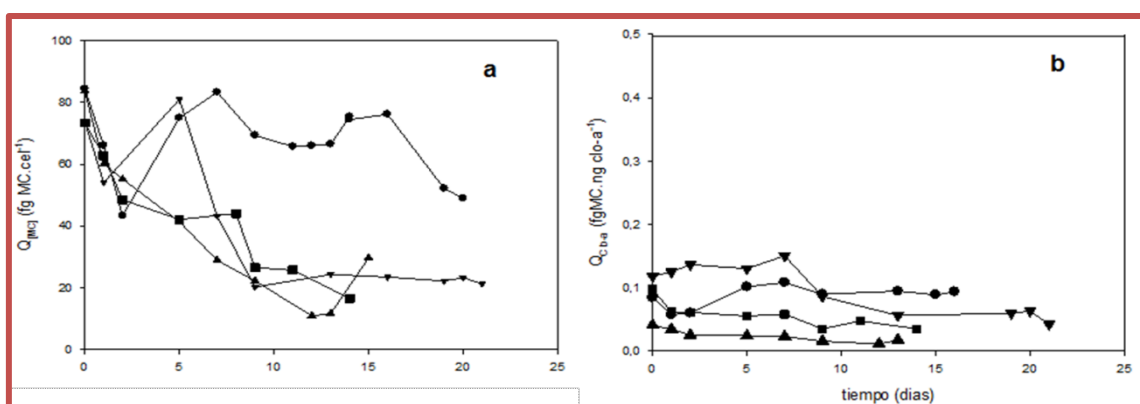


Figura 2: Evolución de a) $Q_{[D-Leu1-MC-LR]}$ por célula; b) $Q_{[D-Leu1-MC-LR]}$ por ng de clorofila, durante los experimentos a ● 26 °C, ▼ 28 °C, ■ 30 °C y ▲ 35 °C.

El valor de Q_{MC} normalizada por número de células Q_{MC} (fgMC.célula) se relaciona a los aspectos fisiológicos de la producción de toxina. Los Q_{MC} iniciales variaron entre 73-84 fg.célula⁻¹ provenientes del inóculo (Figura 2a); esto puede deberse a la aclimatación previa a 28 °C. Los Q_{MC} máximos se observaron en la fase exponencial a 26 y 28 °C (83-80fg.célula⁻¹, respectivamente) y fueron dos a tres veces mayores que los correspondientes en la fase estacionaria tardía (Figura 2a). A 30 y 35°C, Q_{MC} decreció durante el tiempo de incubación. A 26 °C, Q_{MC} fue constante durante los primeros 15 días y luego, decreció. Al finalizar el estudio, los Q_{MC} fueron similares para 28, 30 y 35 °C (20±10fg.célula⁻¹) (Figura 2a).

El Q_{MC} muestra una tendencia decreciente a medida que la temperatura aumenta, y es significativamente mayor a 26 °C en comparación con otras temperaturas. Mowe et al. (2015) hallaron resultados similares para *M. aeruginosa* aislada de ambientes tropicales, advirtiendo sobre los efectos indirectos de los aumentos de la temperatura (1,4 -6 °C) debido al cambio climático. Sin embargo, estudios en muestras ambientales en China informaron incrementos de MCs en florecimientos al aumentar la temperatura (Shen y col., 2003).

Para Q_{Cla-a} (Figura 2b), no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el ensayo. Algunos autores han descrito que las MCs se encuentran

asociadas a la membrana de los tilacoides de *M. aeruginosa* sugiriendo una cercana asociación física entre las MCs y la maquinaria fotosintética de la célula. La relación constante de $Q_{\text{cla-a}}$ (Figura 2b)) encontrada en este trabajo soporta esta hipótesis y sugiere que la síntesis de MC y/o su función puede estar ligada al proceso fotosintético. Long y col. (2001) encontraron resultados similares al presente estudio. Los valores de $Q_{\text{Clo-a}}$ promedio fueron de $0,59 \pm 0,03$ (fgMC.ngClo-a⁻¹) lo que coincide con nuestros resultados, sin embargo, también estos autores sugieron que las MCs puede no ser esenciales en la fotosíntesis.

Las bacterias AMT al inicio del experimento fueron $3,74 \log\text{UFC.mL}^{-1}$ variando significativamente ($p > 0,05$) durante los experimentos a 26 °C y 36 °C; los mayores recuentos se encontraron a 26 °C. Dziallas y Grossart (2011^b) encontraron que a altas temperaturas (32 °C) disminuía la producción de toxina la que era menor en cultivos axénicos que en los no axénicos. Sin embargo, a 26 °C no existió esta diferencia dado que la producción de toxina en ambos fue similar. Nuestros resultados indican que los mayores recuentos de AMT y producción de toxina ocurrieron a 26 °C pudiendo los ensambles de bacterias estimular la producción de MCs. Sin embargo, la técnica empleada sólo considera a las bacterias mesófilas cultivables. Por otro lado, es posible que, debido a que la cepa de *M. aeruginosa* ha sido aislada de ambientes templados, su ensamble específico de bacterias no pueda crecer a temperaturas de 35-37 °C. Dziallas y Grossart (2011^a) hallaron que Actinobacteria de *Microcystis* spp no pueden crecer a temperaturas mayores de 20 °C y que por encima de esta temperatura predomina *Alphaproteobacteria* con miembros de *Sphingomonas*, muchas de estas reconocidas como patógenos humanos. Asimismo, las *Sphingomonas* aisladas de florecimientos de cianobacterias han sido informadas como bacterias con el potencial de degradar MCs en numerosos trabajos (Amé y col. 2006). Asimismo, Dziallas y Grossart (2011^a) hallaron en muestras ambientales la presencia *Archaea*, pero no pudo ser aislada al cultivar la cepa de cianobacteria en laboratorio. Al respecto, es sabido que existe pérdida de un número de bacterias y compuestos al cultivar cepas de *Microcystis* implicadas en la conformación de las colonias típicas halladas en ambientes y que luego se pierden irreversiblemente en laboratorio.

Lo anterior indica que los ensambles de bacterias influyen sobre el crecimiento y metabolismo de las cianobacterias y estos son específicos de cada cepa.

Conclusión

Este es el primer informe sobre el modelado de la producción de [D-Leu¹] MC-LR de una cepa nativa no axénica de *M. aeruginosa* de ambiente templado de la Argentina. Fue posible modelar la producción de toxina en forma vinculada al crecimiento abarcando las fases de latencia, exponencial y estacionaria que caracterizan a esta cepa. Bajo condiciones de laboratorio, la producción de las MCs y Q_{MC} decrece al incrementarse la temperatura. Si bien no son claros los mecanismos, es posible que los ensambles de bacterias de *M. aeruginosa* estén implicados y su estudio debe profundizarse. Estos resultados son

obtenidos en cultivos de laboratorio y no pueden ser proyectados a ambientes con florecimientos cianobacterianos debido a la compleja interacción e influencia en la síntesis y degradación de MCs modulada por factores bióticos y abióticos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP X526), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT0861-2013) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Referencias Bibliográficas

- Amé V, Ricardo EJ, Stephan P, Alberto WD. Degradation of microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Cordoba—Argentina). *Biodegradation* 2006; 17: 447–55.
- Crettaz-Minaglia, MC; Rosso, L; Aranda JO; Sedan D.; Juárez, I; Ventosi E; Andrinolo D, Giannuzzi L. Modelado matemático del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio bajo diferentes temperaturas. *Ing. Sanitaria y Ambiental*. AIDIS. En prensa, 2016.
- Dziallas C, Grossart HP. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environmental microbiology* 2011; 13: 1632- 41.
- Dziallas C, Grossart HP. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. *PLoS One*. 2011; 6: 25569.
- Giannuzzi L, Krockc B, Crettaz Minaglia MC, Rosso L, Houghton C, Sedan D et al. Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress. *CBP: part C*, 2016; 189:22–30.
- Jähnichen S, Long BM, Petzoldt T. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa*: direct regulation by multiple environmental factors. *Harmful Algae* 2001; 12: 95–104.
- Long B, Jones G y Orr F. Cellular Microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl. Environ Microb.* 2001; 67: 278–83.
- Rippka R., Deruells J., Waterburry J.B., Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 1979; 111, 1-61.
- Robarts R.D. y Zohary T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zeal J Mar Fresh* 1987; 391-99.
- Rosso L, Sedan D, Kolman M, Caixach J, Flores C, Oteiza JM, et al. *Microcystis aeruginosa* strain [D-Leu¹] Mcyst-LR producer, from Buenos Aires Province, Argentina. *Journal of Coastal Life Medicine* 2014; 2: 287-96.
- Shen PP, Shia Q, Hua ZC, Kong FX, Wang ZG, Zhuang SX et al. Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Environ. Int.* 2003; 29, 641–647. .