

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLOGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Caracterización de una cepa argentina de *Microcystis aeruginosa* y evaluación del posible rol de la Microcystina en cultivos

> <u>Tesista</u>: Lorena Beatriz Rosso <u>Director/a</u>: Dr. Darío Andrinolo <u>Codirector/a</u>: Dr. Ricardo Echenique

> > <u>Año</u>: 2022

A mi hija

Agradecimientos

A mi familia y amigos, porque fueron son y serán un gran sostén para poder concretar este sueño.

A mi hija Ailín, especialmente por ser una fuente inagotable de fuerzas para seguir luchando.

A mi Fernando, por su amor incondicional y paciencia infinita.

A mi padre, por sus enseñanzas y desde donde esté me sigue acompañando. También así lo hacen a la distancia mi madre, hermano, sobrinos Valen y Anto, y otros familiares.

A mis amigas del alma, Daniela y Paola, que admiro profundamente y agradezco su gran ayuda y apoyo. A Dani, por su lealtad, exigencia y sabiduría. A Pao, por su tenacidad, hermandad y visión de la vida.

A mi director Dr. Darío Andrinolo y codirector Dr Ricardo Echenique, que sin ellos esto no existiría. Especialmente a Darío, que nunca dijo: en tus condiciones no vas a poder realizar el doctorado.

A la Dra. Leda Giannuzzi por permitirme realizar en el laboratorio de Toxicología, los ensayos necesarios para la tesis. Así también a la colaboración de compañeros del laboratorio y otras instituciones.

Desde niña he sentido un gran respeto por la Escuela Normal Nacional Antonio E. Díaz, donde realicé la primaria y la secundaria, y a la Facultad de Ciencias Exactas, donde me recibí de Bioquímica. En cada una de ellas he vivido muchísimos momentos, aprendiendo, estudiando, discutiendo y pudiendo valorar la educación recibida.

Los resultados experimentales derivados de esta Tesis Doctoral han sido comunicados en reuniones científicas de la especialidad o publicados en revistas internacionales con referato. A continuación, se enumeran:

- XXXII Jornada Argentina de Botánica

Caracterización de la primera cepa argentina de Microcystis aeruginosa aislada de un limnótopo de la Provincia de Buenos Aires. Yema L. Rosso L. Sedán D. Echenique R.O. Andrinolo D. Del 5 al 8 de octubre 2009. Presentación oral. Huerta Grande. Córdoba. Argentina.

- V° CONGRESO ARGENTINO Sociedad de Toxicologia y Química Ambiental (SETAC)

¿Es Microcystina una molécula señal para Microcystis aeruginosa? Lorena Rosso, Daniela Sedan, Cristian Oliver, Melina Crettaz-Minaglia, Ezequiel Ventosi, Jorge Oswald Aranda, Leda Giannuzzi, Darío Andrinolo. Del 22 al 25 de octubre del 2014, Neuquén, Argentina

- Cianobacterias: Del conocimiento a la gestión. Encuentro Uruguayo

Detección, aislamiento, cultivo y caracterización de una cepa de Microcystis aeruginosa en la prov. de Bs As-Argentina. Rosso L, Kolman, M., Sedan D, Salerno G, Giannuzzi L, Echenique R, Andrinolo D. Del 7 al 9 de octubre, 2009 Montevideo, Uruguay

 XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades de Grupo Montevideo (AUGM)

Caracterización filogenética y toxicológica de una cepa de Microcystis aeruginosa productora de microcystinas aislada del ambiente. Rosso, Lorena Beatriz; Kolman, María. Del 19 al 21 de octubre del 2010. Modalidad: exposición oral. Cuidad de Santa fe. Santa fe. Argentina.

- VII Congreso de Medio Ambiente AUGM

Caracterización filogenética y toxicológica de una cepa de Microcystis aeruginosa productora de Microcystina aisladas del ambiente. Lorena Rosso, Josep Caixach, Maria Kolman, Daniela Sedan, Cintia Flores, Ricardo Omar Echenique, Graciela Salerno, Leda Giannuzzi, Darío Andrinolo. Del 22 al 24 de mayo del 2012. UNLP. La Plata. Argentina.

- 9th International Conference on Toxic Cyanobacteria taking place in South Africa

Microcystis aeruginosa CAAT 2005 strain from Argentina: phylogenetic and toxicological characterization. Rosso Lorena, Sedan Daniela, Kolman Maria, Caixach Josep, Flores Cintia, Salerno Graciela, Giannuzzi Leda, Andrinolo Darío. Del 11 al 16 Agosto 2013.

- 16th International Congress on Photobiology

Physiological responses and toxin production of M. aeruginosa in short term exposure to solar UV radiation. Hernando Marcelo, Rosso Lorena, Malanga Gabriela, Houghton Cristian, Giannuzzi Leda, Andrinolo Darío. Del 7 al 12 de septiembre del 2014. UNC, Córdoba, Argentina.

Publicaciones

- Rosso L., Sedan D., Kolman M., Caixach J., Flores C., Oteiza J.M., Salerno G., Echenique R., Giannuzzi L., Andrinolo D. *Microcystis aeruginosa* strain [D-Leu¹] Mcyst-LR producer, from Buenos Aires province, Argentina. Journal of Coastal Life Medicine 2014; 2(4): 287-296

- Qi Y, Rosso L, Sedan D, Giannuzzi L, Andrinolo D and Volmer D. Seven new microcystin variants discovered from a native *Microcystis aeruginosa* strain –

unambiguous assignment of product ions by tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2015, 29, 220–224

- Giannuzzi L, Krock B, Crettaz Minaglia M, Rosso L, Houghton C, Sedan D, Malanga G, Espinosa M, Andrinolo D, Hernando M. Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 189 (2016) 22–30

- Crettaz Minaglia M, Rosso L, Aranda O, Goñi S, Sedan D, Andrinolo D, Giannuzzi L. Mathematical modeling of *Microcystis aeruginosa* growth and [D-Leu¹] microcystin-LR production in culture media at different temperature. Harmful algae. Elsevier Science BV. Año: 2017 vol. 67 p. 13 – 25.

Otras publicaciones realizadas durante el período de formación doctoral

- Sedan D, Giannuzzi L, Rosso L, Marra C, Andrinolo D. Biomarkers of prolonged exposure to microcystin-LR in mice. Toxicon 68 (2013) 9–17.

- XXVII Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente

Control de sistemas lacustres eutrofizados mediante el uso de agentes químicos. Oliver Cristian, Bauzá Letizia, Rosso Lorena, Giannuzzi Leda, Andrinolo Darío. Del 21 al 23 de abril de 2010. Buenos Aires. Modalidad Poster

- The 8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8)

Plasmatic methemoglobin and hydroperoxides levels as biomarkers of microcystins exposure. Study in mice. Daniela Sedan, Leda Giannuzzi, Lorena Rosso y Dario Andrinolo. Istanbul, Turkey, 29th of August to 4th of September 2010. Exposición oral.

V° CONGRESO ARGENTINO Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC)

Aislamiento de una bacteria con potencial para la remoción de Microcystina en agua. Crettaz-Minaglia M, Rosso L, Aranda O, Oliver C, Sedan D, Andrinolo D, Giannuzzi L. Del 22 al 25 de octubre del 2014, Neuquén, Argentina

 V° CONGRESO ARGENTINO Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Estudio y evaluación de un oxidante alternativo para la degradación de cianobacterias y cianotoxinas en plantas de tratamientos de agua. Aranda O, Fernández V, Sedan D, Rosso L, Melina Crettaz-Minaglia, Darío Andrinolo, Leda Giannuzzi. Del 22 al 25 de octubre del 2014, Neuquén, Argentina

Capítulos de libros

 Rosso L, Giannuzzi L. Capítulo 5: Factores ambientales y antropogénicos que afectan la formación de floraciones de cianobacterias. En el manual Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Edición 2011. ISBN 978-950-38-0118-5.
Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. Ministerio de Salud de la Nación.

Rosso L, Giannuzzi L. Capítulo 5: Factores ambientales y antropogénicos que afectan la formación de floraciones de cianobacterias y cianotoxinas. Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Reeditado en 2017. ISBN 978-950-38-0255 7. Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. Ministerio de Salud de la Nación.

Abreviaturas

Adda: Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ala: Alanina

ALT: Alanina transaminasa

Arg: Arginina

AST: Aspartato transaminasa

BSA: Albúmina sérica bovina

CAT: Catalasa

EFA: Ácidos grasos esenciales

FAL: Fosfatasa alcalina

γGT: Gamma-glutamil transferasa

IGT: Espaciador intergenico

i.p.: Intraperitoneal

ITS: Espaciador transcripto interno

Hb: Hemoglobina

Leu: Leucina

M: Media

MC: Microcystina (s)

MC-LR: Microcystina-LR

MC-RR: Microcystina-RR

MC-YR: Microcystina-YR

MDA: Malondialdehido

Mdha: Metil dehidroalanina

MeAsp: Ácido metil aspártico

Met: Metionina

MetHb: Metahemoglobina

no-EFA: Ácidos grasos no esenciales

NRPS: Péptido sintetasa no-ribosomal

PAR: Radiación fotosintéticamente activa

PCD: Muerte celular programada

Phe: Fenilalanina PP: Proteínas fosfatasas PP1: Proteína fosfatasa 1 PP2A: Proteína fosfatasa 2 PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados **ROOHs:** Hidroperóxidos ROS: Especies reactivas de Oxígeno RuBisCO: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa RUV; Radiación ultravioleta RVUA: Radiación ultravioleta A RUVB; Radiación ultravioleta B SD: Desvío estándar SFA: Ácidos grasos saturados SOD: Superóxido dismutasa TBA: Ácido tiobarbitúrico TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TCA: Ácido tricloroacético TFA: Ácido trifluoroacético TR: Tiempo de retención Trp: Triptófano Tyr: Tirosina Val: Valina

Índice

IRESUMEN	15
IIINTRODUCCIÓN	19
2.1: Cyanobacteria	20
2.1.1: Características principales	20
2.1.2: Florecimientos: causas e impactos	24
2.1.3: Condiciones beneficiosas a su desarrollo	25
2.1.4: Eventos de intoxicaciones producidas en la salud humana	26
2.2: <i>Microcystis</i> : Generalidades	27
2.3: Microcystinas	28
2.3.1: Biosíntesis y estructuras químicas. Variantes	28
2.3.2: Toxicidad	33
2.3.2.1: Estudios de toxicidad en animales	33
2.3.3: Posibles funciones biológicas de las MCs	35
2.4: Comportamiento y adaptabilidad a condiciones adversas	38
2.4.1: Sistema redox de las cianobacterias. Comunicaciones	38
III OBJETIVOS E HIPÓTESIS	41
IV MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1: Antecedentes: Florecimiento en el partido de Pila	44
4.1.1: Muestreo	44
4.1.2: Parámetros fisicoquímicos	45
4.1.3: Muestras cualitativa y cuantitativa del fitoplancton	45
4.1.4: Evaluación de toxicidad	46
4.2: Aislamiento de Microcystis aeruginosa y estudio de crecimiento en condiciones de laboratorio	47
4.2.1: Aislamiento	47
4.2.2: Cultivo de la cepa aislada en distintas condiciones de laboratorio	49
4.3: Protocolos técnicos	50
4.3.1: Determinación de Densidad óptica	50
4.3.2: Recuento celular	51
4.3.3: Determinación de clorofila a	52
4.3.4: Determinación de proteínas	52
4.3.5: Detección de MCs	53
4.3.5.1: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	53
4.3.5.2: Espectrometría de masa-Electrospray/Cromatografía líquida LC/ESI-MS	54
4.3.6: Modelo de Gompertz	55
4.3.7: Filogenia	56
4.3.7.1: Extracción de ADN	57

4.3.7.2: Amplificación, clonación y determinación filogenética	57
4.3.8: PCR Multiplex para la detección de genes mcy	58
4.3.9: Marcadores de estrés oxidativo y sistema antioxidante	59
4.3.9.1: Determinación de MDA/TBA	59
4.3.9.2: Determinación de ROS	60
4.3.9.3: Determinación de CAT	61
4.4: Diseño experimental	62
4.4.1: Exposición a estrés térmico	62
4.4.2: Exposición a MC-LR	62
4.5: Análisis estadístico	63
VRESULTADOS	65
1 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA, FILOGENÉTICA Y TOXICOLÓGICA DE UNA CEPA	DE
MICROCYSTIS AERUGINOSA, AISLADA DEL AMBIENTE	67
1.1: Antecedentes del florecimiento en el canal de desagüe, en el partido de Pila	68
1.1.1: Parámetros fisicoquímicos en el muestreo	68
1.1.2: Fitoplancton: cualitativo y cuantitativo	69
1.1.3: Bioensayo para determinar la toxicidad de una muestra proveniente del florecimiento en estudio	70
1.2: Caracterización taxonómica de una cepa de Microcystis aeruginosa CAAT 2005-3	71
1.3: Aislamiento y cultivo de una cepa de <i>M. aeruginosa</i>	72
1.3.1: Curvas de crecimiento de la cepa aislada bajo distintas condiciones de cultivo	72
1.3.2: Cinética de crecimiento de la cepa de Microcystis aeruginosa CAAT 2005-3	76
1.4: Caracterización toxicológica de la cepa CAAT 2005-3	81
1.4.1: Identificación y cuantificación de MCs mediante Cromatografía Liquida de Alta Resolución	1
(HPLC)	81
1.4.2: Determinación de MC por LC / ESI-HRMS	83
1.4.3: Siete nuevas variantes de MCs en células de CAAT 2005-3	85
1.5: Modelado de la curva de crecimiento de CAAT 2005-3 y producción de [D-Leu ¹] MC-LR	87
1.6: Caracterización filogenética de la cepa CAAT 2005-3	89
1.7: Detección de genes <i>mcy</i>	92
1.8: Discusión	92
2 - EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> CAAT 2005	-3 FN
DIVERSAS CONDICIONES DE ESTRÉS	97
2.1: Estudio del efecto del H ₂ O ₂ sobre la cepa CAAT 2005-3 en distintas fases de crecimiento	98
2.1.1: Concentración de MC y estado oxidativo en los tratamientos con agua oxigenada	101
2.1.2: Electroforesis de ADN de la cepa expuesta à Smivi de H2O2, en la fase estacionaria de crecimiento	105

2.2: Evaluación de la cepa CAAT 2005-3 frente a radiación UV	106
2.3: Comportamiento de un cultivo de <i>M. aeruginosa</i> CAAT 2005-3 en fase exponencial avanzada, agregados de la misma cepa, pero en fase estacionaria	, por 109
2.4: Discusión	111
3 COMPARACIÓN DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> CAAT 2005-3 CON OTRAS CEPAS	118
	110
3.1: Paralelismo de dos cepas de <i>M. aeruginosa</i> (CAAT 2005-3 y ATCC) y una de <i>Arthrospira máxin</i> sobre distintas concentraciones de H ₂ O ₂	na, 119
22: Comparación de la cena CAAT 2005-3 con otra cena 24 A ambas de M <i>geruginosa</i> , frente al	
estrés térmico y la exposición de MC-LR	123
3.2.1: Cepa 24 A. Características generales	124
3.2.2: Exposición térmica	126
3.2.3: Exposición a MC-LR	130
3.3: Discusión	133
4 ANÁLISIS DE PERFILES TOXICOLÓGICOS DE MICROCYSTIS AERUGINOSA CAAT 2005	-3
POR EL AGREGADO DE MC-LR	139
4.1: Evaluación de la respuesta toxicológica de la cepa CAAT 2005-3 por tratamientos con varias	
concentraciones de MC-LR	141
4.1.1: Exposición de 15 ppm de MC-LR sobre CAAT 2005-3	141
4.1.2: Exposición de concentraciones de 5 y 10 ppm MC-LR sobre CAAT 2005-3	145
4.2: Comparación de los distintos agregados de MC-LR	149
4.3: Discusión	150
VI. CONSIDERACIONES FINALES	154
VIIBIBLIOGRAFÍA	159

I.-Resumen



Uno de los grupos de células más primitivas conocidos son las cianobacterias, organismos de vida libre, con capacidad de habitar una extensa variedad de nichos ecológicos, fundamentalmente aguas superficiales como lagos, lagunas, y embalses. Bajo condiciones adecuadas de luz, nutrientes y temperatura; algunos géneros de cianobacterias sufren un crecimiento exponencial que se denominan florecimientos.

Dentro de la división Cyanobacteria hay especies que sintetizan metabolitos llamados cianotoxinas que son un grupo de compuestos de diversa naturaleza química que por sus efectos se pueden catalogar como hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas. Además, se pueden clasificar teniendo en cuenta su estructura química, en péptidos cíclicos (Microcystinas y Nodularina), alcaloides (Anatoxina-a, Anatoxinas-a(S), Aplysiatoxinas, Cylindrospermopsinas, Lyngbiatoxina, Saxitoxinas) y lipopolisacáridos (LPS).

En Argentina si bien existen varios géneros potencialmente tóxicos como *Anabaena* y *Cylindrospermopsis* y se han descripto cianotoxinas como saxitoxinas y cilindrospermopsinas en distintos limnótopos de nuestro país; la especie presente en diversos ambientes en casi todo el territorio, y además usualmente productora de hepatotoxinas (Microcystinas) es *Microcystis aeruginosa*.

Esta especie ha afectado cuerpos de agua cruciales para nuestros desarrollo social y económico, como el Lago San Roque en Córdoba, los embalses de Salto Grande en Entre Ríos, Yacyretá en Misiones, Ameghino en Santa Cruz y sobre los Ríos Uruguay, Paraná y Río de La Plata. En particular en 2021 la planta potabilizadora de Ensenada "Donato Gerardi" (ABSA), fue fuertemente afectada por el fenómeno cianobacteriano que impidió el normal suministro de agua potable a la región durante varias semanas del periodo estival. Como consecuencia, se ha descripto la presencia de Microcystinas en la red de agua potable de las ciudades de La Plata, Ensenada, Berisso, Trelew, Rawson y Concordia.

Además de estos impactos, se han detallado fenómenos sobre la salud humana por contacto directo y animal que, en distintas situaciones causan muerte masiva de ganado y animales domésticos.

A nivel Internacional es tristemente conocido las intoxicaciones producidas en 1996 en Caruaru (Pernambuco, Brasil), donde decenas de personas fallecieron mientras estaban siendo dializadas a razón de quedar expuestas a MCs. Estos antecedentes en conjunto indican que es necesario prestar atención a este género de cianobacterias que constituye un riesgo para nuestro sistema sanitario y ambiental.

Un acercamiento al estudio de la cianobacterias es su monitoreo ambiental, sin embargo, hasta el momento no se ha podido identificar claramente las causas que desencadenan los florecimientos, predecirlos y conocer el rol fisiológico o ecológico que cumplen las toxinas.

Por ello, en función de contar con herramientas que nos permitan estudiar el fenómeno cianobacteriano, es el objetivo de este trabajo aislar del ambiente células de *Microcystis aeruginosa* y mantenerlas en cultivo a fin de poder realizar distintos estudios en condiciones controladas de laboratorio.

En este estudio, se ha identificado y caracterizado taxonómica, filogenética y toxicológicamente una cepa nativa de *Microcystis aeruginosa* (denominada CAAT 2005-3) aislada a partir de un cuerpo de agua dulce eutrófico situado en la ciudad de Pila, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Se logró la estabilización de un cultivo de *Microcystis aeruginosa* aislada del ambiente, determinando su cinética de crecimiento y la identidad de las Microcystinas mayoritarias.

Dentro de estas MCs mayoritarias se describe por primera vez la presencia de [D-Leu¹] MC-LR. Además, se han identificado otras siete Microcystinas minoritarias sintetizadas por CAAT 2005-3 que fueron descritas por primera vez en la Literatura internacional en 2015.

En la línea de investigación que plantean el rol de las Microcystinas como molécula señal involucrada en la comunicación intercelular de estos organismos coloniales y que además generan florecimientos; se realizaron distintos ensayos sobre estresores como peróxido de hidrógeno o radiaciones UV. La respuesta que se obtuvo de *Microcystis* y las MCs, indican una modificación de los perfiles toxicológicos.

Las MCs aparecen como un factor que se correlaciona con la aplicación de distintos estresores como ser H₂O₂, el agregado de células enteras o Microcystina externa, así como en estrés térmico.

Es particularmente interesante los resultados sobre las modificaciones del perfil de toxinas en repuesta a la adición externa de MC. En específico como respuesta a la adición

de MC-LR a células de CAAT 2005-3, se observó un aumento importante intracelular de la variante [D-Leu¹] MC-LR que produce la cepa en estudio, apoyando la hipótesis de Microcystina como molécula involucrada en sistemas de comunicación celular.

Contar con esta cepa de *Microcystis aeruginosa* en cultivo y produciendo [D-Leu¹] MC-LR, que no está comercialmente disponible, nos permite a la fecha dar respuesta a organismos de control como ABSA en la identificación de potenciales riesgos para la salud humana y colaborar con investigaciones futuras sobre la analítica y control de calidad de las aguas argentinas.

A través de cepas de *Microcystis* caracterizadas y mantenidas en condiciones controladas le ha permitido no solo a nuestro grupo realizar estudios sobre esta especie, sino que posibilita la comparación con cepas de otras partes del mundo que permiten avanzar en comprender su distribución y toxicidad.



II.-Introducción

2.1: Cyanobacteria

2.1.1: Características principales

Las cianobacterias, también llamadas comúnmente cianobacterias verdeazules, se originaron durante el período Pre-cámbrico, Era Proterozoico, hace aproximadamente 2700 millones de años, y por más de 1500 millones de años dominaron la biota del planeta. Su capacidad de generar oxígeno mediante la fotosíntesis las hizo protagonistas de la atmósfera oxidante que hoy tenemos, al producir cambios importantes en las formas de vida e impulsar la explosión de la biodiversidad (Stal, 2007).

Se trata de un grupo de organismos muy heterogéneo (unicelulares, cenobiales y filamentosos); por lo que la taxonomía ha decidido basarse en dos códigos: el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias y el Código Internacional de Nomenclatura Botánica.

La clasificación propuesta por (Cavalier-Smith, 2002, 2010), con nomenclatura botánica basada en la topología de membranas, indicó cinco reinos sucesivos de células: (i) Negibacterias, con dos membranas limitantes, (ii) Unibacterias, con una membrana límite y sin membranas internas, (iii) Eucariotas con endomembranas y mitocondrias, (iv) plantas con cloroplastos y (v) Cromistas con plastidios dentro del retículo endoplásmico rugoso. A su vez Negibacteria se divide en Glycobacteria (Cyanobacteria y Proteobacterias) y Eobacteria.

- División Cyanobacteria
 - Subdivisión Gloeobacteria
 - Clase Gloeobacteria
 - Orden Gloeobacterales
 - Subdivisión Phycobacteria (clase Cyanophyceae en otros sistemas)
 - Clase Chroobacteria Orden Chroococcales Unicelulares o coloniales con pocas células Grupo heterogéneo. Algunos ejemplos son *Chroococcus*, *Microcystis* (colonias irregulares), *Eucapsis* (colonias cúbicas), *Merispopedia* (colonias planas).
 - Orden Pleurocapsales
 - Orden Oscillatoriales Oscillatoria, Spirulina
 - Clase Hormogoneae

- Orden Nostocales Nostoc, Anabaena
- Orden Stigonematales

Debido a la duplicidad de nomenclatura frecuentemente se genera una gran confusión (Oren, 2004), por lo que en la actualidad la tipificación de Cyanobacteria se encuentra en revisión, a lo que se suma el desarrollo de técnicas moleculares de análisis filogenético.

La mayoría de las cianobacterias tienen metabolismo fotoautótrofo y aeróbico; por lo que comparten características estructurales con bacterias heterótrofas y funcionales con algas eucarióticas fotosintetizadoras. En la figura 1 se indica como es la envoltura de la célula, que consta de una capa celular exterior mucilaginosa, una pared de composición compleja (Šmarda y col., 2002), y una membrana plasmática interna.

En el citoplasma se encuentran varios corpúsculos, como ser los carboxisomas que Ribulosa-1,5-bisfosfato-carboxilasa-oxigenasa contienen la enzima (RuBisCO), encargada de la fijación del dióxido de carbono durante la fotosíntesis. También hay gránulos de inclusión capaces de almacenar nutrientes con gran eficacia, como glucógeno, lípidos, polímeros de arginina y ácido aspártico (cianoficinas) y polifosfatos entre otros. Pueden tener vesículas de gas que agrupadas forman aerótopos; se tratan de microestructuras formadas por proteínas cilíndricas con extremos cónicos y paredes impermeables al agua que contienen gas. Los tilacoides o membranas fotosintéticas presentes en la mayoría de las cianobacterias son un sistema intracelular. La posibilidad de que sean invaginaciones de la membrana plasmática se contradijo por estudios de microscopía electrónica que indican que las membranas tilacoides son físicamente discontinuas de la membrana plasmática (Liberton et al., 2006). Sin embargo, podrían estar conectados físicamente en algunos lugares los tilacoides con la membrana plasmática (Sasikumar y col., 2011).

Los pigmentos fotosintéticos son principalmente la clorofila a y una serie de pigmentos accesorios (alloficocianinas, ficocianinas y ficoeritrinas); que aparecen en las ficobilinas (unidades de los ficobilisomas), y se encuentran en hileras sobre la superficie exterior de los tilacoides. Son responsables del color verde-azul de las cianobacterias y es parte de la gran capacidad de adaptación a distintos tipos de ambientes. Algunas especies de cianobacterias pueden tener además clorofila b (Katz y col., 2007), y cierta especie de origen marino presenta clorofila d (Kühl et al., 2005).



Figura 1: Representación esquemática de la morfología de una célula de cianobacteria. Se incluyen los distintos corpúsculos, gránulos de inclusión, ADN, tilacoides y envoltura (Ilustración modificada de Luis Fernando Botter).

Algunos géneros de cianobacterias tienen un importante papel en la fijación de nitrógeno atmosférico (N₂), reduciéndolo a amonio (NH₄⁺) contribuyendo en la disponibilidad biológica del nitrógeno.

Su reproducción es de forma asexual, por fisión binaria, donde por fragmentación dan filamentos (hormogonios), o pueden aparecer esporas (fragmentos de la propia célula) o exosporas, las cuales salen al exterior al romperse la pared. Para el caso de colonias, hay desintegración con formación de pequeños cúmulos de células y/o células solitarias.

El material genético, como se muestra en la figura 1, denominado nucleoide presenta un cromosoma libre y circular (Koksharova y Wolk, 2002).

Algunas especies pertenecientes a distintos géneros de cianobacterias poseen la capacidad de sintetizar diferentes metabolitos secundarios que se conocen en general como

cianotoxinas. De acuerdo al órgano blanco sobre el cual ejercen su acción tóxica en mamíferos se las divide en hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas. Las de mayor importancia por su impactos ambientales, sanitarios y económicos, son las Microcystinas (MC), Noduralinas, Anatoxinas, Saxitoxinas y Cylindrospermopsinas; responsables de perjuicios en la salud humana, animal y de ecosistemas en todo el mundo (Pearson y col., 2016). En la tabla 1 se resumen las principales cianotoxinas y LPS (incluidos por sus efectos tóxicos, aunque no son metabolitos secundarios), su acción sobre el órgano blanco en mamíferos y los géneros productores más relevantes (Huisman y Hulot, 2005).

Cianotoxinas	Efecto Tóxico	Género de cianobacteria Productora			
Péptido cíclico					
Microcystina	Hepatotoxina	Microcystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis			
Nodularina	Hepatotoxina	Nodularia			
Alcaloide					
Anatoxina-a	Neurotoxina (sinapsis colinérgicas)	Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon, Phormidium, Rhaphidiopsis			
Anatoxina-a (S)	Neurotoxina (sinapsis colinérgicas)	Anabaena			
Aplysiatoxina	Dermatotoxina y citotoxina	Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix (Oscillatoria)			
Cylindrospermopsina	Hepatotoxina	Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia, Anabaena, Raphidiopsis			
Lyngbyatoxina-a	Dermatotoxina y citotoxina. También actúan sobre el tracto Gastrointestinal	Lyngbya, Schizothrix, Oscillatoria			

Saxitoxina	Neurotoxina (axones neuronales, inhibe la conducción del impulso nervioso)	Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis, Planktothrix	
Lipopolisacáridos(LPS)	Endotoxina. Con propiedades dermatotóxicas e inflamatorias	Todas	

Tabla 1: Compuestos presentes en distintos géneros de cianobacterias y sus efectos tóxicos. Modificado de Huisman y Hulot (2005).

Las consecuencias de los cambios climáticos globales tales como, temperatura elevada, aumento de las concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono, radiaciones UV elevadas, se han vinculado con la ecología de las cianobacterias y se considera que sustentan su crecimiento (Beardall y Raven, 2004).

La síntesis de toxinas no suele ser constitutiva, se trata de una respuesta generalmente inducible y parece que esta capacidad se ha ido perdiendo durante la evolución (Rantala y col., 2004). Solo algunas especies presentan cepas de cianobacterias que conservan la capacidad de producir toxinas.

2.1.2: Florecimientos: causas e impactos

Las cianobacterias y las algas eucariotas del fitoplancton pueden aumentar repentinamente su tasa de crecimiento, bajo determinadas condiciones ambientales. Este fenómeno de acumulación en la superficie de lagos y reservorios es conocido mundialmente como floración o su equivalente florecimiento (en inglés: bloom) (Smayda, 1997). Trae aparejado consecuencias inmediatas como es la disminución de la diversidad de los ensambles fitoplanctónicos y de otras comunidades del ecosistema acuático.

Sumado a las consecuencias inherentes de cualquier florecimiento en un embalse o río como lo es causar agotamiento de oxígeno, también producen mortandad de peces y ocasionalmente animales silvestres y domésticos; constituyendo una gran amenaza para el consumo y suministros de agua, pesca y uso recreativo de aguas superficiales en todo el mundo (Paerl y col., 2016).

Las floraciones pueden ser desarrolladas por diversas especies de fitoplancton pertenecientes a las Clases Bacillariophyceae (diatomeas), Chlorophyceae (algas verdes), Dinophyceae (dinoflagelados), Chrysophyceae, Cryptophyceae o Cyanophyceae (cianobacterias). Pueden alcanzar periodos de desarrollos masivos que van desde pocas horas a varios días; y desaparecer en un tiempo similar, u ocurrir en una etapa estacional, durante todo el año o incluso darse en forma permanente (Havens, 2008). Se definieron según Anagnostidis y Komárek, (1985) tres grupos principales de cianobacterias que forman florecimientos y se diferencian en sus estrategias ecológicas como: i) aquellas capaces de flotar y fijar N₂ molecular, ii) aquellos capaces de regular la flotabilidad, pero sin la capacidad de fijar N₂ y iii) aquellos que no son capaces ni de regulación de flotabilidad ni de fijación de N₂.

Las floraciones de algunos géneros, como *Microcystis, Anabaena* y *Aphanizomenon*, se caracterizan porque los organismos se agrupan formando grandes colonias. Sus especies desarrollan floraciones fácilmente visibles, que se acumulan en la superficie de la columna de agua formando una franja densa de varios centímetros de espesor de un color verde intenso. Esta característica se debe a la presencia de vesículas de gas (aerótopos) que hace que las células asciendan a la superficie en un lapso de minutos a horas cuando la columna de agua se estabiliza, situación correspondiente a poco o nada de viento (Bormans y col., 1999). En particular los florecimientos de *M. aeruginosa* ocurren generalmente en estos ambientes y en un amplio rango de temperatura (You y col., 2018) y favoreciéndose con altas intensidades de luz.

Se ha estimado que, de las floraciones de cianobacterias distribuidas mundialmente, entre el 25 al 75% son potencialmente tóxicas (Bláhová y col., 2007, 2008; Chorus, 2001).

2.1.3: Condiciones beneficiosas a su desarrollo

Cuando las condiciones ambientales no son favorables, algunos organismos sobreviven durante largos periodos de tiempo, incluso años, como agregados de células vegetativas depositadas en el sedimento, y pueden actuar como iniciadores de nuevos florecimientos cuando las condiciones se tornan favorables (Bartram y col., 1999; Reynolds, 1987). Entre los factores que influencian al desarrollo de estos organismos se mencionan la intensidad de la luz, la temperatura, las características hidrológicas del cuerpo de agua, los macro y micronutrientes; y por último las variables antropogénicas.

Para el desarrollo de una floración basta con que estén presentes algunas condiciones favorables, no siendo estrictamente necesaria la presencia de todas ellas de manera conjunta. Esas condiciones dependen en gran medida de las características naturales del ecosistema.

Investigaciones recientes sugieren que la eutrofización y el cambio climático son dos procesos que pueden promover la proliferación y expansión de las cianobacterias toxígenas (O'Neil y col., 2012; Paerl y Paul, 2012). Se atribuye importancia a la temperatura, la luz, la estabilidad de la columna de agua y el pH, sin descartar otros factores ambientales y biológicos (Shapiro, 1990).

2.1.4: Eventos de intoxicaciones producidas en la salud humana

El primer registro en la región de intoxicaciones y muerte de personas ocurrió en 1996, en una clínica de la ciudad de Caruaru (Brasil). En esa ocasión, 130 pacientes renales crónicos presentaron un cuadro clínico compatible con una grave hepatotoxicosis luego de ser sometidos a sesiones de hemodiálisis. Del total, aproximadamente 60 pacientes fallecieron antes de los 10 meses posteriores al inicio de los síntomas. Los análisis confirmaron la presencia de MCs en muestras de sangre e hígado de los pacientes intoxicados y el contenido de Microcystinas en el carbón activado utilizado en el sistema de purificación del agua de la clínica (Jochimsen y col., 1998).

En los últimos años se han detectado en el Estuario del Río de la Plata y afluentes, casos de intoxicación con MCs de importancia para la salud humana. Las condiciones ambientales en la cuenca del Plata favorecen el desarrollo de florecimientos de cianobacterias, principalmente en épocas estivales, con un importante impacto en la calidad del agua utilizada para recreación y bebida siendo las principales formas de exposición de la población a estas toxinas subcrónicas e intermitentes (Andrinolo y col.,

2007). La presencia de MCs en el agua red de las ciudades de Ensenada y La Plata ha sido informada (Echenique y col., 2005) coincidentemente con la aparición de florecimientos en el Río de La Plata (De Leon y Yunes, 2001; Echenique y col., 2005). Un suceso recientemente documentado es el de una niña de 20 meses y su familia cuando realizaban actividades recreativas en las playas de Carrasco y Malvín (Montevideo, Uruguay), donde se observó un gran desarrollo de floraciones de cianobacterias nocivas (Vidal y col., 2017). En particular, la menor ingresó en un hospital de Uruguay con diarrea, vómitos, fatiga e ictericia. Posteriormente en el plazo de 5 días evolucionó a una insuficiencia hepática aguda requiriendo trasplante hepático, debido a una hepatitis fulminante. Otro hecho de exposición recreacional fue publicado por Giannuzzi y colaboradores (2011). Se trata de un caso agudo de intoxicación por florecimientos de cianobacterias productoras de MCs en el lago de Salto Grande, Argentina. Allí un joven, accidentalmente estuvo inmerso en una floración intensa de Microcystis spp. cuatro horas después de la exposición, el paciente mostró náuseas, dolor abdominal y fiebre. El paciente presentó una importante afección respiratoria que fue diagnosticada como Neumonía atípica dada la ausencia de los agentes etiológicos habituales para esta patología; desarrollando una semana después una hepatotoxicosis con aumento significativo de biomarcadores de daño hepático (ALT, AST y yGT). La recuperación completa tuvo lugar dentro de los 20 días.

2.2: Microcystis: Generalidades

El género *Microcystis* pertenece al orden Chroococcales y familia Microcystaceae. Sus células esféricas crecen aglomeradas en colonias con mucílago incoloro, y la división celular ocurre por fisión binaria regularmente en tres planos perpendiculares entre sí en generaciones sucesivas. En consecuencia, las células hijas son hemisféricas y crecen alcanzando el tamaño esférico originales antes de la siguiente división. Las vesículas de gas intracelulares agrupadas en aerótopos durante la etapa vegetativa, son visibles con microscopía óptica como puntos oscuros (Komárek y Anagnostidis, 2005).

Se desarrollan floraciones de *Microcystis* superficiales en aguas dulces estancadas y también costeras en todo el mundo con excepción de las áreas cercanas a los polos (Komárek y Komárková, 2002). A nivel regional, se realizan monitoreos en ríos, como,

por ejemplo, el trabajo de Sathicq y colaboradores (2014) sobre el Río de la Plata y de Ferrari y colaboradores (2011) sobre el Río Uruguay. Reynolds y colaboradores (1981), sugirieron varias explicaciones para la aparición de floraciones de *Microcystis* en cuerpos de agua: i) altas cargas de nutrientes; ii) pH elevado y disminución de CO₂; iii) interacción entre la atenuación de la luz y la estabilidad de la columna de agua; iv) tolerancia a bajas concentraciones de O₂ y bajo potencial redox que afecta la disponibilidad de azufre, hierro y otros metales; v) resistencia de las colonias al pastoreo, ya sea por tamaño o por toxicidad. La distribución de las floraciones de *Microcystis* continúa extendiéndose, tanto en frecuencia como en intensidad, en respuesta al aumento de temperaturas ambientales, niveles de CO₂ y la eutrofización asociada con el cambio climático global (O'Neil y col., 2012; Paerl y Huisman, 2009; Visser y col., 2016).

Se han reconocido más de 50 morfoespecies de *Microcystis* según las variaciones en la forma de las colonias, la estructura de los mucílagos, el diámetro de las células, la disposición de las mismas en una colonia, la proporción de pigmentos de ficocianina y ficoeritrina, y los detalles del ciclo de vida estacional (Komárek y Komárková, 2002). Las especies más citadas son *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing, *M. flos-aquae* (Wittrock) Kirchner, *M. ichthyoblabe* Kützing, *M. novacekii* (Komarek) Compére, y *M. wesenbergii* (Komarek) Komárek (Liu y col., 2017; Xiao y col., 2018).

2.3: Microcystinas

2.3.1: Biosíntesis y estructuras químicas. Variantes

Las Microcystinas pertenecen al grupo de cianotoxinas; principalmente producidas por especies del género *Microcystis*, aunque también por *Oscillatoria, Aphanizomenon, Merismopedia, Nostoc, Anabaena, Phormidium, Planktothrix* y *Anabaenopsis* (Kaebernick y Neilan, 2001; Neilan y col., 2012; Pearson y col., 2010).

Se trata de un heptapéptido cíclico de estructura general: D-Ala-X-D MeAsp-Y-Adda-D-Glu-Mdha, donde X e Y son aminoácidos variables, Mdha es Metildehidroalanina, y Adda es un aminoácido característico de 20 carbonos (ácido 3 amino-9-metoxi-2,6,8trimetil-10- fenildeca-4,6-dienoico) (Botes y col., 1985). Han sido identificadas más de 70 variantes, las cuales difieren principalmente en el grado de metilación, la configuración de Adda o los aminoácidos que ocupan las posiciones X o Y (Rinehart y col., 1994). El residuo de aminoácido X es comúnmente leucina (L), arginina (R), o tirosina (Y), mientras que en la posición Y suele haber arginina (R) o alanina (A) (Tabla 2). Estas diferencias estructurales generan características particulares a cada molécula, haciendo que los distintos congéneres varíen entre sí en cuanto a condiciones de biosíntesis, cantidad y efectos biológicos.

Microcystina	Х	Y	m/z
MC-LA	Leu	Ala	910
MC-LL	Leu	Leu	952
MC-AR	Ala	Arg	953
MC-YA	Tyr	Ala	960
MC-LM	Leu	Met	970
MC-VF	Val	Phe	972
MC-YM	Tyr	Met	972
MC-LF	Leu	Phe	986
MC-LR	Leu	Arg	995
MC-LY	Leu	Tyr	1002
MC-LW	Leu	Trp	1025
MC-FR	Phe	Arg	1029
MC-RR	Arg	Arg	1038
MC-YR	Tyr	Arg	1045
MC-WR	Trp	Arg	1068

Tabla.2: Variantes de la estructura química de MC, indicándose los aminoácidos en las posiciones X e Y en la molécula. También se informa la relación m/z (masa/carga) del ion molecular de cada MC.

Las MCs, al igual que los péptidos que incluyen aminoácidos modificados, son sintetizadas mediante un mecanismo no-ribosomal llevado a cabo por enzimas multifuncionales denominadas peptido sintetasa no-ribosomal (NRPS) (Dittmann y col., 1997; Nishizawa y col., 1999), con un gran módulo de péptido sintetasa no ribosómico (PNR) y policétido sintasa (PKS). Cada módulo NRPS es responsable del reconocimiento

y la incorporación de un aminoácido durante la elongación del péptido intermedio. El módulo básico NRPS tiene los dominios: condensación (C), adenilación (A), y proteína portadora de peptidilo (PCP). El dominio de adenilación es responsable de la selección y la activación de los aminoácidos en la forma de adenilatos de aminoacilo. Seguidamente actúa la PCP y el dominio de condensación, donde la primera sostiene el aminoácido activado y la C forma un enlace peptídico entre dos aminoácidos adyacentes. Además, intervienen las enzimas auxiliares con actividades de epimerización, ciclación, N-metilación, formilación, y la reducción de los aminoácidos, que generan una gran variedad de aminoácidos no proteinogénicos y ácidos hidroxilo, que permiten la producción de péptidos de alta complejidad (Shishido y col., 2013).

El complejo de enzimas NRPS-PKS está codificado en el operón *mcy*, y en el caso de *Microcystis* (Fig. 2) abarca una región de 55 Kb (Kaebernick y col., 2002; Tillett y col., 2001), compuesto por 10 marcos de lectura abiertos (ORF) distribuidos en dos operones policistrónicos (*mcy*A-C y *mcy*D-J), y que se transcriben a partir de un promotor bidireccional. Los genes *mcy*A-C codifican para tres péptido sintetasas, *mcy*D es una policétido sintasa modular, *mcy*E y -G son enzimas híbridos que contienen módulos de péptido sintetasa y de policétido sintasa, y *mcy*J, -F y -I son enzimas implicadas en la modificación de cadenas laterales (O-metilación, epimerización y deshidratación respectivamente). El gen *mcy*H tiene similitud con transportadores de la familia de transportador ABC, y probablemente podría estar implicado en el transporte de MCs (Pearson y col., 2004).



Figura 2: Estructura del operon *mcy* con los genes implicados en la síntesis de las MCs. Se indica la dirección de transcripción y en blanco, gris y negro para qué enzima codifica cada gen.

Según Dittmann y colaboradores (2001) las proteínas Mcy G, D y E son las enzimas principales de sintetizar el precursor Adda-D-ácido glutámico; las Mcy A, B y C son responsables de la incorporación de otros cinco aminoácidos dentro de la estructura MC; y las demás completan la molécula con sus modificaciones. En la figura 3 puede observarse la estructura química.



Figura 3: Estructura química de la molécula de MC-LR.

El patrón de producción de toxinas y el momento de mayor síntesis están regulados por varios factores tanto intrínsecos (genéticos) como extrínsecos (derivados de las características ambientales). En algunos estudios se ha determinado que ocurre una gran producción de MCs cuando las células se enfrentan a condiciones de estrés o cuando se presentan limitaciones en fósforo, nitrógeno (Watanabe y Oishi, 1985), zinc o hierro (Lukač y Aegerter, 1993). En concordancia con estos estudios se ha determinado que los mayores niveles de MCs encontrados en cianobacterias en cultivo, se producen hacia el final de la fase exponencial de crecimiento (van der Westhuizen y Eloff, 1985). Por otro lado, la composición de las variantes de MC y el contenido pueden ser bastante variables entre las especies e incluso entre diferentes genotipos dentro de la misma especie (Rohrlack y col., 2001).

En un estudio realizado por Welker y colaboradores (2003), se observó que el contenido de toxinas no resultó ser directamente proporcional a la biomasa de cianobacterias presentes. En el mismo se presentaron datos de un monitoreo de cuatro años donde relevaron niveles de MC en el lago Müggelsee junto con valores sobre distribución espacial y diversidad de *Microcystis spp*. En el mismo encontraron que el contenido de MC se correlacionó negativamente con la abundancia de *Microcystis*, por lo que los florecimientos fueron relativamente menos tóxicos durante su mayor desarrollo. Una tipificación metabólica de las cepas aisladas de una sola muestra del florecimiento, reveló que la floración de *Microcystis* estaba compuesta por una multitud de cepas productoras y no productoras de toxinas, que diferían en su producción de MCs y otros péptidos no ribosómicos. En vistas de estos resultados los autores concluyeron que en el lago Müggelsee, las cepas toxigénicas tenían mayor probabilidad de dominar el ensamble de *Microcystis* en condiciones subóptimas y fueron sobrecrecidas por cepas no tóxicas durante condiciones que permiten una alta biomasa de *Microcystis*.

Por otra parte, el grupo de trabajo de Schatz y colaboraodres (2005), aisló cuatro cepas de la especie de *Microcystis spp.* del lago Kinneret (Mar de Galilea), siendo dos tóxicas y dos no tóxicas. Las dos cepas tóxicas se obtuvieron de colonias individuales cultivadas en placa de agar, y provenientes de un cultivo del extracto del lago. Las dos cepas no tóxicas surgieron espontáneamente de las mismas colonias tóxicos y no contenían la región genómica *mcy*. Los experimentos de laboratorio y de campo indicaron una ventaja de la cepa tóxica sobre la no tóxica. Quedando demostrado en ese trabajo que cuando las cepas crecieron separadas por una membrana, en donde no se permitió el paso de las células, pero sí de moléculas, y la cepa tóxica inhibió severamente el crecimiento de la no tóxica. Cuando las cepas se colocaron en bolsas de diálisis en el lago Kinneret durante la temporada de gran crecimiento *Microcystis*, las células no productoras de toxinas se lisaron, mientras que las productoras sobrevivieron. Si bien no se conoce completamente cuales factores favorecen la co-existencia de estos dos tipos de cepas, se han encontrado que bajo condiciones de laboratorio las cepas no tóxicas, y no en ambientes naturales.

En base a estos antecedentes contradictorios sobre como es el comportamiento de cepas productoras y no productoras de toxinas cuando coexisten en el ambiente y/o en estudios de laboratorio, es que este trabajo busca determinar cómo es la respuesta de cepas locales productoras de toxinas frente a distintos estresores físicos, químicos y MCs.

2.3.2: Toxicidad

Las afecciones informadas por MCs varían en gravedad y abarcan desde síndromes gastrointestinales, alteraciones respiratorias y cutáneas, promoción de tumores, hasta la muerte por fallo hepático. Una característica importante es la ausencia de cualquier otro agente etiológico que usualmente puede ser el causante de estas afecciones.

Las MCs deben en gran medida su acción tóxica a la inhibición de proteínas fosfatasas 1 y 2A (PP1 y PP2A). Se ha demostrado que la región Adda-glutamato presente en estas cianotoxinas es crucial para que se lleve a cabo la fuerte interacción entre éstas y las PP (Rudolph-Böhner y col., 1994), y cualquier factor que refuerce este contacto influirá fuertemente en determinar la toxicidad que presenten las distintas toxinas pertenecientes a este grupo. Tal es el caso de la MC-LR que puede generar uniones covalentes entre su aminoácido Mdha y ciertas regiones de la molécula de las proteínas fosfatasas.

La variante MC-LR es considerada una de las más tóxicas de las MCs, seguida por otros congéneres como ser MC-YR y MC-RR quienes presentan menor toxicidad (Gupta y col., 2003). El principal órgano blanco de MC-LR es el hígado, aunque también genera daños sobre otros órganos, como riñón, tracto gastrointestinal, cerebro, pulmón, timo y sistema inmune (Chen y col., 2004; Sedan y col., 2013; Soares y col., 2007; Zhao y col., 2009).

Los daños generados y los órganos afectados dependerán en gran medida de las características de la exposición a las cianotoxinas.

2.3.2.1: Estudios de toxicidad en animales

Con el objetivo de conocer las alteraciones producidas por las exposiciones a MCs en la salud se han realizado gran cantidad de estudios en animales in vivo. Las exposiciones crónicas se han relacionado con el cáncer de hígado y se han descrito alteraciones en las enzimas marcadoras de daño hepático en poblaciones expuestas. En cambio, para las exposiciones subcrónicas o prolongadas no hay parámetros definidos para el diagnóstico. Por ello en un estudio realizado por Andrinolo y colaboradores (2008) con la exposición subcrónica a MC-LR se analizó la arquitectura microscópica de los tejidos, la función

hepática y la peroxidación lipídica en el hígado y los riñones de los ratones. El tratamiento consistió en una primera etapa de un mes en donde los animales fueron tratados con una dosis subletal de MC-LR con el objetivo de producir un daño evidente en el tejido hepático, y seguidos de una etapa de recuperación. De acuerdo con esto, se encontró en la primera etapa un aumento significativo en el contenido de lípidos hepáticos y en los niveles de peroxidación de lípidos en el hígado y los riñones en animales tratados con MC-LR en comparación con los controles. Además, las actividades de la FAL y la AST mostraron una alteración significativa en los animales tratados con MC-LR. Luego de la segunda etapa, la recuperación del daño hepático fue evidente a nivel citológico y fisiológico. Solo la recuperación de la arquitectura lobular fue incompleta durante este período. En conclusión, el estudio demostró la capacidad del tejido hepático para recuperarse del daño producido por la administración subcrónica de MC-LR (Andrinolo y col., 2008).

Posteriormente el mismo grupo de trabajo, estudió los efectos de MC-LR sobre el sistema antioxidante en el hígado sus riñones y sus alteraciones sobre la composición lipídica hepática después de una exposición subcrónica en ratones. Así durante la primera etapa, el daño oxidativo inducido por MC-LR y los cambios significativos en los lípidos hepáticos de los ratones tratados demostraron una clara dependencia del sistema de defensa enzimática con una disponibilidad reducida de glutation y alfa-tocoferol y una elevación concomitante en la producción de nitritos y nitratos. La hepatotoxicosis derivada de la exposición a MC-LR de manera subcrónica produjo alteraciones en los componentes lipídicos que incluyeron una disminución de las relaciones EFA / no EFA, SFA / PUFA y n-3 / n-6, las cuales exhibieron un patrón de recuperación lenta durante el período de recuperación (Sedan y col., 2010). Bajo la misma modalidad de exposición subcrónica, luego se determinaron los niveles plasmáticos de Hb, MetHb, hidroperóxidos (ROOH), a-tocoferol, glutatión y perfil de lípidos, así como las actividades en eritrocitos de SOD y CAT. Además, se realizó la determinación de la concentración de MC-LR en hígado, riñón, plasma, orina y heces de ratones tratados. Se encontró que la alteración en MetHb, ROOHs, glutation, niveles de a-tocoferol, actividad de SOD y perfil de lípidos plasmáticos, se correlaciona con los esperados si la alteración se deriva de daño hepático. Los parámetros de plasma alterados junto con la determinación de MC-LR podrían usarse como biomarcadores, herramientas útiles en el diagnóstico y los estudios epidemiológicos (Sedan y col., 2013).

2.3.3: Posibles funciones biológicas de las MCs

Las funciones o roles de las MCs, ya sean estos fisiológicos y/o ecológicos, no están dilucidadas y son varias las propuestas, sin que ninguna de ellas haya sido satisfactoriamente demostrada, aún por la comunidad internacional.

Las MCs se han vinculado al:

1.- metabolismo fotosintético

2.- quelante, en la captación del Fe+2

3.- función defensiva contra depredadores del zooplancton

4.- inhibidores del crecimiento de otras cianobacterias que posibilite mayor éxito ecológico al organismo productor

5.- molécula de señalización extracelular, que controla la densidad de población, infoquímico.

1.- En relación con el metabolismo fotosintético, Hesse y colaboradores (2001) sugirieron que las MCs podrían tener un papel en los procesos de adaptación a la luz, puesto que se observaron que los mutantes que no producían MCs tenían un 20 % menos de pigmentos fotosintéticos. Más recientemente Phelan y Downing, (2011) observaron una fuerte correlación positiva entre la MC y la tasa de crecimiento de *M. aeruginosa*, y en que la molécula mejoró el crecimiento de la cepa PCC 7806 en condiciones de luz alta.

En experimentos fisiológicos con mutantes y de tipo salvaje de *M. aeruginosa*, se ha sugerido que la capacidad de producir MC es beneficiosa para sus células (Kaplan y col., 2012). Es así que Zilliges y colaboradores (2011) encontraron diferencias en comparaciones proteómicas de células mutantes y de tipo salvaje, mantenidas en diversas condiciones de intensidad de luz y oscuridad. La cepa deficiente en MC condujo a una alteración considerable en el patrón de proteínas (enzimas del ciclo de Calvin, ficobiliproteínas y dos reductasas dependientes de NADPH) y con menos isoformas que la de tipo salvaje. También se ha confirmado un efecto estabilizador de la unión de la MC

con la subunidad de la RuBisCO en que era claramente más resistente a la digestión con proteasas en la cepa de tipo salvaje (Zilliges y col., 2011). Por lo tanto, estudios de crecimiento realizados en condiciones de estrés oxidativo o luz muy alta revelaron una clara ventaja para la cepa productora de MC (Zilliges y col., 2011) y la microscopía electrónica mostró la localización de la MC en las áreas tilacoides y carboxisoma (Gerbersdorf, 2006).

2.-En cuanto a su posible acción como quelante se ha observado la presencia de agrupaciones de moléculas de MCs alrededor de los gránulos de polifosfato (Young y col., 2005), capaces de atrapar iones divalentes, por ejemplo, Zn+2 (Andrade y col., 2004). Igual característica se ha atribuido a MC in vitro (Humble y col., 1997); por lo que, si esto ocurriera in vivo, sería lógico pensar que estos complejos serían demasiado grandes como para atravesar los poros de los gránulos de polifosfato y permanecerían en la periferia. Esto sugeriría una implicancia de la MC en la detoxificación de metales del interior de la célula (Young y col., 2005). Por otra parte, Utkilen y Gjølme (1995) proponen que esta toxina está actuando como un quelante intracelular, que mantiene los niveles de Fe2+ libre bajos y aceptan que las enzimas implicadas en su síntesis están controladas por el contenido de Fe2+ libre. Lo que se ha comprobado es que la MC se une a hierro además de a zinc y a cobre (Humble y col., 1997). Se realizaron simulaciones de dinámica molecular por Pochodylo y colaboradores (2017) para obtener estructuras de complejos acuosos de MC-Leu-Arg y MC-Arg-Arg con Ca+2, Mg+2, Fe+2, Zn+2 y Cu+2. Los resultados muestran que los complejos con Cu+2 y Zn+2 fueron los más estables; y sugieren que la quelación del metal está controlada tanto por la especie de metal como por la población de variantes de MC. Sin embargo, a la fecha nadie ha demostrado que la relación presente una dinámica que sea compatible con esta función.

3.- Las Microcystinas se consideran metabolitos secundarios, y podrían servir de defensa o en un rol antidepredador (DeLisa y Bentley, 2002; Malik, 1980). Una de las principales hipótesis es que la producción de estas toxinas tiene el objetivo de disuadir al zooplancton de la ingesta de células de cianobacterias. El mecanismo aún no se ha descrito, pero se piensa que podría ser una estructura o sustancia sensible de atravesar la membrana extracelular (Rohrlack y col., 2001). Esta suposición se basa en el hecho de que la MC se encuentra principalmente en el interior de las células, de manera que los organismos que las ingieran estarían expuestos a la toxina. Se investigaron los efectos sobre *Daphnia galeata* cuando se alimentó con una cepa de *M. aeruginosa* de tipo salvaje productora de
MC y una cepa mutante que no pudo sintetizar ninguna variante de MC. Se descubrió que la cepa de tipo salvaje era venenosa para *D. galeata*, mientras que el mutante no tenía ningún efecto letal en los cladóceros Ambas variantes de la cepa de *M. aeruginosa* fueron capaces de reducir la tasa de ingestión de *Daphnia*. Y los resultados sugieren que las MCs son la causa más probable de la intoxicación observada cuando se alimenta a los animales con la cepa de tipo salvaje, pero sin embargo estas toxinas no son responsables de la inhibición del proceso de ingestión (Rohrlack y col., 1999).

Un análisis filogenético reciente de los genes que codifican la microcystina sintetasa sugiere que la capacidad de las MCs producidas son anteriores al linaje de metazoos (Rantala y col., 2004). Por lo tanto, es poco probable que las MCs evolucionaran como un medio de defensa contra el pastoreo, y se desconoce su papel biológico.

4.- Otra posible función es como sustancia alelopática, para aportar una ventaja sobre otras especies competidoras (Kaebernick y Neilan, 2001). En este caso sería imprescindible la exportación del péptido al exterior celular, lo cual es compatible con un transportador, codificado en el *mcy*H (Pearson y col., 2004), aunque aún no se ha encontrado como tal en la célula de cianobacteria. El mecanismo de acción que se propone para la MC es, la inhibición de las proteínas fosfatasas de otras cianobacterias. En este sentido hay reportes contradictorios ya que Shi y colaboradores (1999) determinaron que las proteínas fosfatasas PP1-ciano 1 y PP2-ciano 2 de cianobacterias, in vitro fueron resistentes a MC-LR y ácido okadaico. Esta última es otra ficotoxina conocida del ambiente y que posee convergencia evolutiva con las MCs, y actúan en el mismo sitio que la MC en PP, aunque ambas moléculas son químicamente diferentes. Así se sugiere que si estos metabolitos son producidos como arma de defensa, están dirigidos contra otras cianobacterias.

Sin embargo, la acción sobre las proteínas fosfatasas no es la única vía de acción de las MCs. Se ha encontrado que tratamientos con MC sobre *Synechocystis spp.* promueven el desarrollo de estrés oxidativo. Si a esto sumamos que los ROS (especies reactivas de oxigeno) se hallan involucrados en procesos de comunicación; la toxina cianobacteriana podría ser una herramienta de comunicación interespecífica (Vassilakaki y Pflugmacher, 2008).

Por otro lado, estudios con pirogalol sobre especies de *Microcystis*, también provocaron cambios en el estado oxidativo de la célula, la cual responde alterando la expresión de

determinados genes. Entre ellos se hallan algunos que codifican para enzimas del sistema antioxidante y el gen *mcy*B (involucrado en la síntesis de MC), que aparece aumentado (Shao y col., 2009). Por lo tanto, podría existir una conexión entre el sistema antioxidante y la biosíntesis de MC. Esto hace necesario determinar si la toxina produce estrés oxidativo en células productoras y que consecuencias trae aparejado ello.

5.- Se ha planteado también que la MC pudiera actuar como moléculas de señalización extracelular, controlando la densidad poblacional y la expresión genética específica en respuesta a esa densidad de población. Este fenómeno es conocido como quórum sensing y se ha observado anteriormente en numerosas especies bacterianas, como en *Vibrio fisheri* (Wolf-Watz y Miller, 2003), pero no en cianobacterias. Se han realizado experimentos que consisten en la adición de MC a cepas de *M. aeruginosa* no productoras de la toxina, observándose una tendencia a la agregación celular y formación de pseudocolonias (Sedmak y Eleršek, 2005). En el mismo sentido, se detectó acumulación de células cuando se añade la misma toxina al alga verde *Scenedesmus quadricauda*. Además, se observó un aumento del volumen celular, así como el de los cloroplastos y también de los pigmentos fotosintéticos, lo cual indica un aumento del metabolismo celular. Como durante la formación de floraciones de cianobacterias, parecerían importantes los contactos entre células, parece viable la posibilidad de un papel de la MC como una molécula de comunicación entre células que coordina el comportamiento entre células vecinas.

Se ha publicado un estudio en el que se adiciona MC-LR y extractos libres de células de *Microcystis* a cultivos de estas mismas células, observándose que se induce la acumulación de McyB, y se producen más MCs (Schatz y col., 2007). Esto está en concordancia con la función de molécula de señalización que se está proponiendo en los últimos tiempos como una función factible para MC.

2.4: Comportamiento y adaptabilidad a condiciones adversas

2.4.1: Sistema redox de las cianobacterias. Comunicaciones

Si bien las células de *Microcystis* se encuentras formando colonias protegidas y conectadas por mucilago, distintos estresores externos provocan estrés oxidativo a través de distintas vías como (1) un aumento en la generación de oxidantes como ROS, (2) una disminución en la protección antioxidante, o (3) una falla en la reparación de daños celulares (Vassilakaki y Pflugmacher, 2008).

La vida en comunidad de las cianobacterias, requiere de comunicación tanto intraespecífica, como interespecífica, para su desarrollo en el ambiente. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que los organismos unicelulares (bacterias, hongos o protistas) se comunican y cooperan entre sí (Wingreen y Levin, 2006). Como otros procariotas, las cianobacterias intercambian información a través de infoquímicos, que constituyen una clase especial de mediadores; con capacidad de generar una respuesta en el organismo receptor, que puede ser benéfica o perjudicial para cada uno de los organismos interactuantes (Dicke y Sabelis, 1988).

Un caso muy interesante son las moléculas de comunicación llamadas de *quorum sensing* (QS), es decir, involucradas en fenómenos a nivel poblacional que da a las células retroalimentación de regulación génica sobre el tamaño de la propia población y generan respuestas "sociales" coordinadas. Este fenómeno se observa en los factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*, controlados por un sistema de detección de QS (Venturi, 2006). Se trata de un esquema de comunicación intercelular en el que las bacterias son capaces de detectar la densidad de la población (a través de moléculas de señalización y receptores) y controlar la expresión de genes en consecuencia (Schuster y Greenberg, 2006).

La comunicación interespecífica está menos estudiada y es mucho más difícil de tipificar, pero sin duda, también se ha puesto de manifiesto que hay muchísimos ejemplos de consorcios de microorganismos que se comunican y cooperan, como por ejemplo los biofilms. En estos casos, hay fuertes sinergias en las potencialidades metabólicas de cada uno de los integrantes, para mutuo beneficio. Esta cooperación, implica una comunicación que permite adaptarse a las circunstancias ambientales y a las densidades de poblaciones.

A nivel individual, diversas variables ambientales tanto físicas como químicas, pueden generar cambios en el balance redox intracelular. La condición oxidativa celular de cianobacterias, es controlada mediante mecanismos de respuesta endógena para mantener

la homeostasis, mientras no se comprometa la integridad celular. Sin embargo, cuando se conlleva un daño celular, puede quedar afectada la comunidad y/o floración en forma reversible o irreversible.

En las plantas, las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas reactivas que tienen una elevada afinidad por las membranas, ADN o proteínas en las células, y por esta razón son considerados como especies tóxicas (disruptores del metabolismo celular). Se han encontrado evidencias de que también funcionan como señales moleculares que median respuestas a varios estímulos (Desikan y col., 2004). Entre los ROS, el H₂O₂ parece ser quien desempeña el papel más importante en la señalización de los cambios estresantes, debido a su elevada estabilidad y largo tiempo de vida media; y podrían reflejar cambios espaciales y temporales en el ambiente (Hung y col., 2005).

La clorosis o bleaching, es un fenómeno en cianobacterias en respuesta a carencia prolongada de nitrógeno y otros factores de estrés. En el mismo, se degradan los ficobilisomas, las células adquieren un color amarillento y se desarrollan mecanismos metabólicos de supervivencia y aclimatación. Una de las características distintivas es la convergencia de múltiples señales en el gen *nblA* (Salinas y col., 2007). Según Spät y colaboradores (2018) la clorosis representa un mecanismo de quiescencia que se asemeja a la estrategia de supervivencia procariota ampliamente utilizada en la formación de estados latentes.



III.- Objetivos e Hipótesis



Los impactos ambientales que genera la presencia de *Microcystis spp* en nuestra región y en el mundo constituyen un riesgo para la salud humana y animal, debido a la exposición directa a florecimiento y/o por su afectación a la calidad de agua de red.

Un acercamiento al estudio de las cianobacterias es su monitoreo ambiental, sin embargo, hasta el momento no se ha podido identificar claramente las causas que desencadenan los florecimientos, predecirlos y conocer el rol fisiológico o ecológico que cumplen las toxinas que producen.

Por ello, en función de contar con herramientas que nos permitan estudiar en condiciones controladas de laboratorio, es objetivo de este trabajo de tesis: aislar del ambiente células de *Microcystis aeruginosa* y mantenerlas en cultivo a fin de poder realizar distintos estudios fitoplanctónicos, limnóticos y toxicológicos. En particular estudiar las respuestas de las células de *Microcystis* ante situaciones de estrés con atención al desarrollo poblacional y la producción de toxinas.

En este sentido es objetivo avanzar en la hipótesis que afirma "la Microcystina actúa como moléculas de señalización extracelular, controlando la densidad poblacional"; y estudiar los factores que influyen para desencadenar esta señalización.

Por lo tanto, nos planteamos como Hipótesis:

1.- la producción de toxinas está relacionada con situaciones de estrés poblacional y que, se expresarán en mayor medida cuando las células se encuentren en situaciones prooxidantes.

2.- la molécula de Microcystina cumple un rol en la comunicación celular en el desarrollo del florecimiento, por tanto, las células de *Microcystis* son capaces de censar la presencia de toxina en su entorno y generar una respuesta intracelular.



4.1: Antecedentes: Florecimiento en el partido de Pila

4.1.1: Muestreo

A partir de un florecimiento de cianobacterias planctónicas en el canal de desagüe, cercano a la planta de tratamiento de residuos cloacales, la Municipalidad de Pila en junio del 2004 solicitó estudios del fenómeno y probables riesgos hacia la comunidad. Esta localidad se encuentra ubicada en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (35°59'49'' S – 58°08'11'' W) (Fig. 5.1A).

Previendo que dicha floración se debiera a consecuencia de alguna Cyanobacteria, se llevó a cabo la extracción de muestras a fin de determinar el taxón responsable y estimar su "peligrosidad". Los puntos de muestreo (1, 2 y 3) se consideraron teniendo en cuenta la distancia desde una canaleta precaria o drenaje, que comunica la planta de tratamientos con el zanjón lindero a campos de la zona (profundidad entre 1 y 1,5 m), como muestra el esquema en la figura 4.1.B.

El muestreo se realizó una única vez y de cada sitio, se determinaron por triplicado los parámetros fisicoquímicos, y se realizó la recolección de muestras para el posterior análisis microscópico cualitativo y cuantitativo del fitoplancton; y evaluación de toxicidad.



Figura 4.1: A: Mapa político de la Provincia de Bs As, en donde se señala la zona en estudio, partido de Pila. B: esquema del lugar de toma de muestras, indicándose los puntos de muestreo 1, 2 y 3.

4.1.2: Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos que se determinaron en los puntos de muestreo fueron: pH, conductividad y temperatura. Se utilizó una sonda Sper Scientific Water Quality Meter 850081 y se colocó inmediatamente por debajo de la superficie del agua en cada punto definido de muestreo en el canal de desagüe o zanjón.

4.1.3: Muestras cualitativa y cuantitativa del fitoplancton

A través de la observación microscópica se obtiene la identificación taxonómica y cuantificación de los organismos presentes en cada punto de muestreo del zanjón.

Las muestras extraídas del zanjón para el análisis cualitativo del fitoplancton, se obtuvieron por recolección con red de plancton por arrastre horizontal subsuperficial. El tamaño de poro de malla utilizado fue de 30 µm. El transporte y conservación de las

muestras se realizó colocando cada una en un recipiente descartable estéril de 50 ml, dejándoles un 10 % del volumen total con aire y mantenidos en refrigeradora hasta su remisión al laboratorio.

La identificación de los organismos, de las muestras cualitativas se realizó considerando la presencia, forma y tamaño de atributos morfológicos utilizando claves taxonómicas. El análisis microscópico del material incluyó la observación general de los organismos al microscopio óptico (Wild M20) y luego de las células vegetativas y diferenciadas.

La identificación de cianobacterias se realizó fundamentándose en la presencia, forma y tamaño de atributos morfológicos utilizando claves según Anagnostidis y Komárek (1985). La identificación taxonómica de la especie del genero *Microcystis* se consideró por el criterio de Komárek y Komárková (2002).

Para la obtención de muestras cuantitativas se requirió de una botella muestreadora de Van Dorn con capacidad de 2,2 L. La toma se llevó a cabo en forma manual y obteniéndose una colección de los organismos en la columna de agua por triplicado. Luego se transfirió el volumen total a recipientes de color ámbar, fijados con lugol al 1 % y enviadas inmediatamente al laboratorio para su análisis. Para la cuantificación se siguió la metodología de Utermöhl (1958), utilizándose un microscopio invertido Zeiss Axiovert. El conteo se realizó mediante campos al azar hasta llegar a un mínimo de 100 organismos de la especie más abundante o 400 organismos en total (10% de error) (Ferrario y col., 1995).

4.1.4: Evaluación de toxicidad

Para evaluar la toxicidad del material biológico proveniente del florecimiento de cianobacterias recolectado, se realizó un "ensayo ratón" consistente en la exposición de ratones a dicha muestra. En el lapso posterior a la exposición, se analizaron los comportamientos observados en los ratones, como así también el tiempo de muerte y variaciones macroscópicas en los tejidos y órganos, luego de la muerte (Falconer y Humpage, 1996).

En el ensayo en particular realizado se emplearon ratones N:NIH Swiss machos adultos provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Mantenidos

en cajas de acero inoxidable con camas de viruta de pino en ambiente climatizado a 25 ± 3 °C y humedad relativa del 60 % con ventilación forzada y bajo ciclos lumínicos automáticos de 12 horas.

El material biológico utilizado para la exposición fue un extracto de cianobacterias obtenido a partir de una submuestra del florecimiento en estudio tomada con la red de plancton para tal fin. Para ello, se tomaron 100 ml del florecimiento y se lisaron con sonicador (Omni-Ruptor 400), 15 min, pulsos 50 %, potencia 60 %. Luego se centrifugó para separar los restos celulares (centrifuga Rolco, 10 min, 2000 rpm) y el extracto acuoso sobrenadante se inyectó intraperitonealmente a cada animal. El volumen de cada aplicación fue de 1ml.

Las inyecciones se realizaron cuidando de no lesionar ninguna víscera de la cavidad abdominal del ratón. Los animales control, fueron inyectados con 1 ml de solución fisiológica estéril (NaCl 0,9 g/L).

Inmediatamente después de la muerte del animal se procedió a la necropsia, realizando las observaciones macroscópicas de los órganos, y extrayéndose el hígado libre de tejidos anexos, que se pesó y compara con un control.

Se consideró como resultado positivo de toxicidad específicamente como hepatotóxico (Hooser y col., 1989, 1990; Runnegar y col., 1995), un peso de hígado de animal expuesto del 7 % o más del peso corporal (Falconer y Humpage, 1996).

4.2: Aislamiento de *Microcystis aeruginosa* y estudio de crecimiento en condiciones de laboratorio

4.2.1: Aislamiento

Para el aislamiento de las colonias se siguió el método de aislación por capilaridad (Jacinavicius y col., 2012).

Las composiciones de los medios utilizados fueron:

Medio Z-8

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
NaNO ₃	0,467 g
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	59 mg
NH4Cl	31 mg
Na ₂ CO ₃	0,02 g
Solución FeEDTA	10 ml
Solución de elementos trazas	1,0 ml
H ₂ O destilada	1,0 L

Solución de FeEDTA: Solución A: 2,8 g FeCl₃ en HCl 100 ml 0,1 y Solución B: 3,9 g EDTA Na₂ en NaOH 100 ml 0,1 N. Añadir 10 ml de solución A y 9,5 ml de la solución B, llevar a 1 L con H₂O destilada.

Solución de elementos trazas:

H ₃ BO ₃	3,1 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,23 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$	0,088 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,146 g
VOSO ₄ ·6H ₂ O	0,054 g
$Al_2(SO_4)_3K_2SO_4 \cdot 2H_2O$	0,474 g
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	0,198 g
$Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0,154 g
Cr(NO ₃) ₃ ·7H ₂ O	0,037 g
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0,033 g
KBr	0,119 g
KI	0,083 g
H ₂ O destilada	1,0 L

Medio BG 11:

Stock 1	10 ml
Stock 2	10 ml
Stock 3	10 ml
Na ₂ CO ₃	0,02 g
Stock 5	1,0 ml
NaNO ₃	1,5 g

Llevar a 1,0 L con H₂O destilada y ajustar el pH a 7,5. Esterilizar.

Soluciones stock: llevar todas las soluciones a 1,0 L con H_2O destilada

- Stock 1:

2 0	., 6
Na ₂ Mg EDTA	0,1 g

Citrato amonio férrico	0,6 g
Ácido cítrico.1H2O	0,6 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6 g

- Stock 2: Mg₂SO₄.7H₂O 7,5 g

- Stock 3: $K_2HPO_4.3H_2O$ 4 g

- Stock 5: (microelementos)

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,050 g
NaMoO ₄ .H ₂ O*	3,91 g
*ó MoO4 (85%)	0,018 g

Las colonias aisladas se cultivaron en batch en Erlenmeyer de 25 ml previamente esterilizados, realizándose 5 réplicas con 8 a 10 ml de cada medio de cultivo. Las condiciones de mantenimiento en cámara de cultivo fueron: temperatura de 24 ± 1 °C, sin agitación, con ciclos de luz:oscuridad de 14:10 horas, intensidad de iluminación 15 µE m-2 s-1. Periódicamente se efectuó la observación al microscopio óptico (10x, 40x y 100x) de alícuotas extraídas de las réplicas en cultivo, y en caso de contaminación, se repitió el proceso de aislamiento; y repiques para seguir la evolución de los mismos.

En este sentido nuestro cultivo posee las características de derivar de una única colonia de células tomadas del ambiente y cultivadas en condiciones no axénicas.

4.2.2: Cultivo de la cepa aislada en distintas condiciones de laboratorio

Se probaron distintas condiciones de incubación con la finalidad de llegar a obtener la optimización de crecimiento en fase exponencial de la cepa aislada en estudio, obtenida en la sección anterior.

Para lo cual se siguió la cinética de crecimiento de las cianobacterias que requirió de un inóculo inicial acondicionado y de la determinación de parámetros, que indiquen la evolución en el tiempo del número de individuos.

A partir de la ecuación

$Ln(N/N^{\circ}) = kt$

En donde N es el número de individuos (número de células/ml) al tiempo t, N° es el número de individuos al tiempo cero (número de células/ml), t el tiempo (días) y k la velocidad especifica de crecimiento. La constante k es la pendiente que se obtiene de la representación del logaritmo natural del cociente de N/N°. El tiempo de duplicación td, es el tiempo necesario para duplicar el número de individuos, se puede calcular como td = (Ln 2) / k. Se buscó determinar con las condiciones de incubación experimentadas el mayor valor de k y menor td.

El acondicionamiento de los inóculos se realizó a partir de un volumen de una elevada concentración de células al que se le adicionó medio fresco estéril, y durante de tres días consecutivos se determinó la densidad óptica para realizar el seguimiento de la aclimatación de las células de la cianobacteria aislada.

Las condiciones probadas de cultivo incluyeron intensidad de luz de entre 15 - 30 μ E m-2 s- 1, los medios de cultivos fueron Z-8 y BG-11 modificado, con y sin aireación por burbujeo, la temperatura entre 24° y 26° C y el fotoperiodo en luz:oscuridad (14:10). Se siguió la evolución de crecimiento periódicamente a través del recuento celular, por triplicado en el tiempo, por el método de Utermöhl (1958) y utilizando un microscopio invertido Zeiss Axiovert.

4.3: Protocolos técnicos

4.3.1: Determinación de Densidad óptica

Es un método con el que se puede estimar el recuento celular a través de la densidad óptica (DO) a 740 nm. La DO es reproducible, si se encuentran las células en el mismo estado fisiológico, ya que los cambios en la ultraestructura celular alteran las propiedades de dispersión de la luz (Collier y Grossman, 1992) y afectan la medida.

A partir de una alícuota de 1ml de la muestra del cultivo previa homogeneización se midió la absorbancia a 740 nm en espectrofotómetro Metrolab 330.

4.3.2: Recuento celular

La determinación para recuento de fitoplancton con alto número de células y de tamaño pequeño que se empleó utiliza una cámara de hematocímetro (Bartram y col., 1999), previa disgregación de las colonias de *Microcystis* por hidrólisis alcalina.

La preparación de las muestras se realizó extrayendo alícuotas de cultivo homogeneizado, que se diluyeron en agua destilada en relación 1:10, se fijaron con solución de lugol acético al 1% y conservaron en oscuridad. Al momento del conteo se adicionó una gota de KOH 1 M y se mantuvo a baño maría a 90 °C durante 30 minutos para la disgregación de las colonias de cianobacterias.

Con la muestra preparada se llevó a cabo la carga de la cámara hematocimétrica de Neubauer empleando para ello micropipeta (P 20) y colocando cuidadosamente la muestra para obtener una distribución homogénea y que no queden burbujas de aire retenidas. El recuento se realizó sobre la cuadricula central empleando microscopio óptico (Wild M20) con una magnificación de 400X. Para la obtención del valor de recuento expresado como número de células/ml se empleó la siguiente ecuación:

N (células/ml) = (N°/V) *D

En donde N° es el número de células contadas en la cuadricula central de la cámara de Neubauer, que contiene 25 cuadrados (cada uno subdividido en 16 cuadrados menores) y en total ocupan un volumen de 0,1 ml V es el volumen del área de recuento (0,1 ml) D es la dilución realizada.

4.3.3: Determinación de clorofila a

La concentración de clorofila a es una estimación indirecta de la biomasa total del fitoplancton, ampliamente utilizado en estudios de ecología y calidad de agua. La metodología empleada para analizar la concentración de clorofila a fue la propuesta por Marker (1980).

El procesamiento de la muestra se realizó a partir de una alícuota obtenida del cultivo que se centrifugó con centrifuga de eppendorff a 3000g por 2 minutos, se descartó el sobrenadante con micropipeta y dejándose un volumen de pellet de 100 µl que contiene el paquete celular. Se adicionó 900 µl de metanol 100%; se homogeneizó y guardó envuelto en papel aluminio por 24 horas en heladera. Luego de este tiempo, se volvió a centrifugar la muestra y se determinó la concentración de clorofíla a por detección de espectrofotometría diferencial a dos longitudes de onda (665 y 750 nm), sin y con acidificación con una gota de HCl 0,1 M, para determinar la concentración por resta de los feopigmentos y posible turbidez de la muestra.

La concentración de clorofila a se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

Clorofila a (
$$\mu$$
g/L) = 11,92 * 2,9 [(Abs 665 - Abs 750) – (Abs_a 665 - Abs_a 750)] (Ve/Vm)

Donde sin subíndice se indican las medias previas a la acidificación y con subíndice "a" realizadas luego de la acidificación, Ve es el volumen del extracto obtenido en metanol y Vm el correspondiente a la muestra inicial.

4.3.4: Determinación de proteínas

Se siguió el método de Bradford (1976) que se basa en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre las proteínas de la muestra y el colorante Azul Coomasie.

El procesamiento de las muestras provenientes del cultivo se realizó sonicándose con Omni ruptor 400 a potencia de 10 % por 30 minutos, y se centrifugaron 2 minutos a 2000 rpm para separar el sobrenadante de los restos celulares. La determinación de proteínas totales se llevó a cabo en paralelo en el sobrenadante obtenido y la curva de calibración con BSA (Albúmina sérica bovina) con la determinación de absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro.

Rango de linealidad del método: 0 a 1 µg/µl

4.3.5: Detección de MCs

4.3.5.1: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Como técnica analítica, para la identificación y cuantificación de las MCs en muestras de cultivo de cianobacterias, se utilizó la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El procesamiento de las muestras de interés se inició por sonicación en baño de hielo durante 30 minutos a potencia de 10 % con un sonicador (Omni ruptor 400), posterior centrifugación y elución del sobrenadante en la columna Sep-Pack C18 previa activación. Se siguieron dos pasos sobre el Sep-Pack: una primera elución con 10 ml de metanol 20% (para eliminar pigmentos que hubieran quedado retenidos y otras posibles sustancias contaminantes), y una segunda elución con las toxinas retenidas en 5 ml de metanol. Finalmente se concentró la muestra por evaporación a 65 °C (Andrinolo y col., 2007).

La detección se llevó a cabo utilizando un equipo de HPLC (Shimadzu 20A), columna BDS Hypersil C18 Thermo (150 X 4,6 mm, 5 μ m) empleando una rampa de gradiente para la elución y detección UV-DAD (λ = 238nm). La columna se equilibró con una mezcla compuesta por 65 % de una solución A [agua con 0,05 % (v / v) de ácido trifluoroacético] y 35 % de solución B [acetonitrilo con 0,05 % (v / v) de ácido trifluoroacético]. La fase móvil consistió en un gradiente discontinuo de soluciones A y B, y el flujo fue de 1,0 ml / min.

Las MCs fueron identificadas sobre la base de sus espectros de absorción UV, tiempo de retención y con un estándar de MC-LR que se adquirió de Sigma (St Louis, MO, EE.UU.), que también se utilizó para la cuantificación. Dicho parámetro se relacionó con el volumen de muestra considerado.

4.3.5.2: Espectrometría de masa-Electrospray/Cromatografía líquida LC/ESI-MS

La espectrometría de masas es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, con mayor frecuencia positivamente, separados por su relación masa/carga (m/z) y posteriormente detectados y registrados. Su potencial analítico permite la determinación del peso molecular debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular, así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos de un analito.

La información obtenida por espectrometría de masas es esencialmente cualitativa, como es la determinación de masa molecular o la información sobre la estructura a partir de los fragmentos obtenidos, pero también se pueden realizar análisis cuantitativos utilizando patrones internos o externos con límites de detección desde picomoles a femtomoles.

En particular el equipo aquí utilizado es el de Espectrometría de Masa tipo Electrospray acoplado con Cromatografía Liquida (LC/ESI-MS), que cuenta con gran aceptación en estudios de proteínas y proteómica así como en métodos cuantitativos.

Para el análisis se utilizó un espectrómetro de masas Exactive / Orbitrap equipado con una ionización por electrospray (ESI) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) (LC / ESI- HRMS). La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa Phenomenex Luna C18 (2) (150 mm × 2,1 mm, 5 μ m). La fase móvil se compone de agua Milli Q como disolvente A y acetonitrilo como disolvente B, conteniendo ambos ácidos fórmicos al 0,08 % (v / v) a una velocidad de flujo de 200 μ l / min. El programa de elución en gradiente lineal para el análisis intracelular fue: 10 % - 30 % B 10 min, 30 % -35 % de B 20 min, 35 % - 55 % de B 15 min, 55 % B 5 min, 55 % - 90 % B 2 min, 90 % B 3 min y regresar a las condiciones iniciales para la re-equilibrio (10 % B 5 min). El volumen de inyección de muestra fue de 10μ l.

Los análisis se llevaron a cabo en ESI ion positivo con el voltaje de pulverización a 4,5 KV y el voltaje de la lente tubo a 120 V. La temperatura del tubo de transferencia de iones se fijó en 250 °C. Se utilizó Nitrógeno (pureza> 99,98%), como gas envolvente, gas de barrido de iones y gas auxiliar a velocidades de flujo de 30 psi, 0 y 5 AU (unidades arbitrarias), respectivamente. El análisis completo y los experimentos de fragmentación disociación de colisión de alta energía (alta tensión de energía de colisión de disociación 70 eV) se llevaron a cabo en un rango de masas de m / z de 60 a 1200 con el alto poder de resolución (50 000 FWHM, m / z 200).

La obtención y análisis de la [D-Leu¹] MC-LR se realizó con colaboración del grupo de Investigación del Dr. Caixach investigador del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA) de Barcelona. En el marco del Convenio Marco entre la Universidad Nacional de La Plata y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Laboratorio de espectrometría de masas del Departamento de Química Ambiental, IDAEA, Barcelona, España.

4.3.6: Modelo de Gompertz

El modelo matemático de Gompertz consiste en una función exponencial doble, basada en 4 parámetros que describen una curva sigmoidea asimétrica. El comienzo de la curva de crecimiento en estudio ocurre de manera lenta como también al final, con un intervalo en el medio de evolución rápida.

La aplicación del modelado se hizo sobre datos del crecimiento celular de la cepa de *M. aeruginosa* y la producción de MC, mediante regresión no lineal utilizando el programa Systat (1990). El algoritmo seleccionado calculó el conjunto de variables con la suma residual de cuadrados más baja y un intervalo de confianza del 95 %.

La ecuación que representa a ambas variables en función del tiempo es:

 $Log (N \circ MC) = a + c \exp \{-\exp [-b (t - m)]\}$

Donde el Log N es el logaritmo decimal del recuento de cianobacterias por ml de cultivo (cel*10⁶ / ml); MC es la concentración de la variante de toxina en μ g / ml; t es el tiempo en días.

El factor *a* es el logaritmo del recuento celular o concentración de MC cuando el tiempo disminuye indefinidamente; *c* es el logaritmo cuando el tiempo se incrementa infinitamente (equiparable al número de ciclos log de crecimiento o el aumento de la concentración de toxina) hacia el final de la fase exponencial; *m* es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad crecimiento; y *b* es la tasa de crecimiento relativa al tiempo *m*, en unidades de 1 / días.

De los parámetros definidos se deriva, la velocidad de crecimiento específico para *M*. *aeruginosa* como $\mu = b.c / e$, con e = 2,7182; y para el caso de MC, se trata de la velocidad de producción específica (μ g / ml día).

El tiempo de duración de la fase de latencia se determina como: LPD = m - (1/b); y el logaritmo total alcanzado de la densidad de población de *M. aeruginosa* como: MPD = a + c (Giannuzzi y col., 1998).

4.3.7: Filogenia

Para identificar filogenéticamente los organismos presentes en una muestra de origen ambiental, se comienza con la extracción del ADN que se utiliza como molde para la amplificación de la secuencia de interés por la metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los fragmentos de la amplificación fueron clonados en *E. coli* y generando una biblioteca de insertos. Posteriormente, se liberaron los insertos de los clones por digestión con la enzima de restricción *Hae*III, obteniéndose el mismo patrón de restricción para las secuencias correspondientes a la cepa aislada. Finalmente se realizó la secuenciación individual (Sambrook y Russell, 2001). Una vez obtenidas las secuencias, se comparan con las presentes en bases de datos públicas y se establece el género/especie/cepa mediante un análisis de asociación filogenética (Neilan y col., 1995, 1997).

4.3.7.1: Extracción de ADN

En la primera etapa del procesamiento se extrajo el ADN de una alícuota de 5 ml de un cultivo en bach de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 y se purificó utilizando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Se determinó la calidad del material genético obtenido, mediante una electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) (Sambrook y Russell, 2001) a 100 V y visualización con tinción de bromuro de etidio (0.5 mg /l) por luz UV de las bandas corridas. El marcador de peso molecular MM utilizado fue DNA del fago λ digerido con PstI.

4.3.7.2: Amplificación, clonación y determinación filogenética

Para la amplificación por PCR del ADN, se seleccionó una secuencia del fragmento intergénico ubicado entre las regiones codificantes de las subunidades β y α del operón de la síntesis de ficocianina, de 685 pb (*cpc*BA-IGS). Se utilizaron los cebadores PC β F y PC α R (Neilan y col., 1995) (Tabla 4.1) usando aproximadamente 1000 células por reacción. Nuevamente se corroboró la calidad del resultado con una nueva electroforesis en gel de agarosa (0,8 %), donde además de los fragmentos amplificados colocando en calles, también se sembró una cepa de *M. aeruginosa* PCC 7806 para control positivo; y para control negativo una mezcla de reacción de PCR sin el templado.

Gen	Primer par	Secuencia (5' a 3')	Región amplificada	Producto (pb)
cpcBA-IGS	ΡСβϜ	GGC TGC TTG TTT ACG CGA CA	IR	685
	PCαR	CCA GTA CCA CCA GCA ACT AA		

Tabla 4.1: Secuencia de los cebadores PCβF y PCαR

Los productos de la amplificación o amplicones fueron clonados en el vector pGEM-T Easy, generándose una biblioteca de insertos. Luego se continuó con el análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Para el análisis de restricción, se digirieron alícuotas de las mezclas de amplificación mediante digestión con la enzima *Hae*III a 37 ° C durante una noche. Los productos de restricción fueron entonces separados por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Los insertos de los clones seleccionados, se secuenciaron (Macrogen, Corea) para el análisis filogenético utilizándose como referencia la cepa tóxica, *M. aeruginosa* UTEX 2666, obtenida a partir de la colección de cultivos de la Universidad de Texas.

Las comparaciones de secuencias *cpc*BA-IGS se realizaron utilizando secuencias de nucleótidos disponibles en las bases de datos en el Centro Nacional de Información Biotecnológica. Los alineamientos de secuencias se generaron usando el software CLUSTALW y las representaciones gráficas de árboles filogenéticos se realizaron mediante el software MEGA4. Los árboles fueron estadísticamente evaluados con una estimación no paramétrica de error (número de repeticiones = 1 000). Con las secuencias obtenidas se realizaron alineamientos múltiples con otras secuencias depositadas en las bases de datos, los que se usaron para inferir relaciones filogenéticas basados en una matriz de distancia genética. El método utilizado fue "neighbor joining" especialmente adecuado para conjuntos de datos que comprenden linajes con tasas de evolución muy variables.

4.3.8: PCR Multiplex para la detección de genes mcy

La técnica de PCR múltiple permite en una sola reacción obtener la amplificación de varias secuencias dianas. En este caso particular se utilizó un conjunto de cebadores para la amplificación de regiones *mcy*C, *mcy*D y *mcy*G (Tabla 4.2), correspondientes a los genes que codifican para una tioesterasa (TE), una sintasa β -cetoacilo (KS) y un C-metiltransferasa (CM), genes involucrados en la biosíntesis de MC.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ l que contenía: 2,5 μ l de buffer de PCR 10X (Biotools, España); 0,75 μ l de 50 mmol / 1 de MgCl2; 0,5 μ l de 10 mmol / 1 de cada desoxinucleósido trifosfato (dNTPs), 2 μ l de 10 mg / ml de albúmina de suero bovino, 3 pmol de cada cebador (*mcy*C, *mcy*D y *mcy*G), 1 IU de ADN polimerasa

(Biotools, España), y 5 μl de ADN molde. El ciclado térmico se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 minuto, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 52 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto, y terminando con una etapa de extensión a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Invitrogen Life Technologies, Brasil) en tampón 0,5X TAE y se visualizaron con la tinción de bromuro de etidio (Promega Corp., EE.UU.).

Gan	Cabadaraa	S_{22}	Región	Producto
Gen	1 Cebadores Secuencia (5 a 5)		amplificadas	(pb)
тсуC	PSCF3 PSCR3	GGT GTT TAA TAA GGA GCA AG ATT GAT AAT CAG AGC GTT TT	TE	648
mcyD	PKDF2 PKDR2	AGT TAT TCT CCT CAA GCC CAT TCG TTC CAC TAA ATC C	KS	859
тсуG	PKGF1 PKGR1	ACT CTC AAG TTA TCC TCC CTC AAT CGC TAA AAC GCC ACC	СМ	425

Tabla 4.2: Secuencia de los cebadores de los genes mcyC, mcyD y mcyG

4.3.9: Marcadores de estrés oxidativo y sistema antioxidante

4.3.9.1: Determinación de MDA/TBA

Es un método espectrofotométrico por el que el ácido tiobarbitúrico (TBA) es utilizado para la cuantificación de malondialdehído (MDA); aunque también reacciona con otros productos secundarios de la peroxidación lipídica (Yagi, 1976). La reacción ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA, en donde un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura.

Se partió de un volumen de cultivo que es concentrado por centrifugación y el paquete celular sonicado con Omni ruptor 400 por 30 min a 10% de potencia (mantenido en baño de hielo mientras se rompen las células). Seguidamente se volvió a centrifugar por 2 min y el sobrenadante obtenido de entre 400-800 µL es la muestra a procesar siguiendo la técnica desarrollada por Yagi (1976).

A la muestra obtenida se le agregaron 200 µL de SDS al 8.10 %; 1,5 mL de buffer acético/acetato 100 mM (pH 3.50) y 1,5 mL de TBA al 0.8 %, y completo con agua bidestilada hasta 2,5 mL. Posteriormente las muestras fueron incubadas por 60 min a 95 °C, enfriadas y leídas la Abs a 532 nm, en paralelo con la curva de calibración realizada con solución comercial de MDA (bis-dimetilacetal o 1, 1,3',3'-tetrametoxipropano) en el rango de concentraciones 4,5 a 36,0 nmoles de MDA/tubo.

4.3.9.2: Determinación de ROS

La determinación de ROS intracelular se realizó a través del kit OxiSelect TM. Se trata de un ensayo basado para medir la producción de hidroxilo, peroxilo u otras especies de oxígeno reactivas en las células. Se empleó la sonda fluorogénica 2',7'-Diclorodihidrofluorescina diacetato permeable a las células (DCFH-DA), que difunde a ellas y se desacetila mediante esterasas celulares a 2',7'-Diclorodihidrofluorescina no fluorescente (DCFH), oxida rápido al altamente fluorescente que se 2',7'Dichlorodihydrofluorescein (DCF) en presencia de ROS. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a los niveles de ROS dentro del interior celular. El efecto de los compuestos antioxidantes o de radicales libres sobre DCFDA puede medirse frente a la fluorescencia del estándar de DCF proporcionado. El kit tiene un límite de sensibilidad de detección de DCF de 10 pM.

En la práctica las células acondicionadas según el kit, se incubaron en una placa de 96 pocillos con DCFH-DA. Posterior a una incubación de 30 min en oscuridad y 37 °C, la fluorescencia en la suspensión de células se controló en un lector de microplacas (Beckman coulter DTX 880, detectores multimodo) con longitud de onda de excitación

 (λex) a 498 nm y emisión (λem) a 525 nm. En todos los casos, se incluyeron controles en blanco paralelos. El contenido de ROS en muestras desconocidas se determinó por comparación con la curva estándar predeterminada de DCF.

4.3.9.3: Determinación de CAT

La actividad enzimática de Catalasa se basa en una técnica cinética que mide la velocidad de descomposición del H₂O₂ a 240 nm de longitud de onda en el tiempo (Aebi, 1984).

Para ello la determinación de la actividad de la enzima, se informa como unidad de CAT que cataliza 1mM de H₂O₂ por minuto.

Inicialmente alícuotas del cultivo se concentraron por centrifugación para recuperar las células de cianobacterias y luego se suspendieron en buffer fosfato (KH2PO4/Na2HPO4-12 H2O; 50 mM; pH: 7.0) para su sonicación en baño de hielo. Posteriormente se dispensaron 0,5 ml de solución sustrato de H_2O_2 (Sigma, 70 volúmenes) al 0,34 % en 2,5 ml de buffer fosfato que estaban en cubetas de cuarzo a la muestra procesada, se agito por inversión y se comenzó la lectura rápidamente en espectrofotómetro de doble haz contra un blanco de reacción sin muestra, midiendo en paralelo el tiempo. A partir de las curvas obtenidas se calculó el valor de k, como el valor de actividad de CAT, utilizando la siguiente ecuación:

 $k = (2.30/t) \log (DOf - DOi)$

DOi: densidad óptica al inicio de la reacción

DOf: densidad óptica al final de la reacción (al tiempo seleccionado)

t: tiempo para cambiar de DOi hasta DOf (usualmente menor a 3 minutos)

La actividad específica de la enzima fue calculada considerando la concentración de proteínas que le correspondía a cada muestra (obtenida como se describe en la sección 4.7.4).

4.4: Diseño experimental

4.4.1: Exposición a estrés térmico

Se trabajó con dos cepas de *M. aeruginosa*, CAAT 2005-3 (productora de toxinas) y 24 A (no productora de toxinas), pertenecientes al cepario del laboratorio de Toxicología.

En fase exponencial tardía de los cultivos de *M. aeruginosa* (mantenidos en las mismas condiciones de la sección 4.2.2), siguiendo las curvas de crecimiento por recuento celular (por triplicado). Se seleccionó para cada cepa un día de la cinética en fase exponencial tardía en que ambas CAAT 2005-3 y 24 A tuvieran igual número de células. A partir de 50 ml de cada cultivo de cepa se obtuvo (por triplicado) un paquete celular que contiene células enteras. El mismos proviene del pellet de una centrifugación de 15 min a 2000 rpm de la alícuota de cultivo seleccionada, posteriormente se lavó 3 veces y diluyó en medio BG-11 fresco y estéril, alcanzándose un volumen total de 25 veces menor que su volumen de cultivo inicial previo al ensayo. Cada experimento se realizó por triplicado con sus correspondientes controles.

El concentrado de células de cianobacterias preparado se expuso al tratamiento térmico de 35 °C y el control a 26 °C en cámaras de cultivo, bajo las mismas condiciones de luz previas al ensayo (30 μ E/m2seg) durante el plazo de una hora.

Finalizado el tiempo de experimentación se procedió a la obtención de muestras para determinar concentraciones de clorofila a, proteínas y perfiles toxicológicos intracelulares (obtenido de la ruptura celular por sonicación y siguiendo la metodología descripta en la sección 4.3.5.1).

4.4.2: Exposición a MC-LR

Se siguió el mismo protocolo que el detallado en el apartado anterior (4.4.1), y realizando una exposición del paquete celular de cianobacterias a MC-LR, con agitación horizontal suave, por triplicado. El control se obtuvo del agregado de medio fresco estéril.

Las concentraciones de toxina adicionadas (5; 8; 10 y 15 ppm) se obtuvieron a partir de un extracto purificado de un florecimiento del Rio de la plata con una concentración de 60 ppm. El mismo fue cedido por la Dra. Sedan del laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP).

Al cabo del tiempo de exposición se realizaron 3 lavados de los paquetes celulares con medio fresco estéril, obteniéndose dos alícuotas: una de material extracelular (que incluyó la recolección del sobrenadante posterior a la centrifugación durante 15 min a 2000 rpm de las células tratadas luego de los lavados realizados) y otra de material intracelular (obtenido de la ruptura celular por sonicación). De ambas fracciones se determinaron los perfiles toxicológicos correspondientes, siguiendo la metodología descripta en la sección 4.3.5.1.

4.5: Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los estudios descriptos en los subcapítulos 1, 2, 3 y 4 de Resultados, fueron analizados estadísticamente del análisis de la varianza (ANOVA) empleando el programa Origin 2016 SR0 (OriginLab Corporation).









1.- Caracterización taxonómica, filogenética y toxicológica de una cepa de *Microcystis aeruginosa*, aislada del ambiente

A DECK OF THE OWNER OF	Carl Section	the second second		
			No. of Concession, Name	10 100
				2 200

La evaluación de un fenómeno de florecimiento con posibles riesgos ambientales se comienza con un muestreo, previa observación del sistema acuático y definición de la zona de estudio. El muestreo abarca dos aspectos: el cualitativo, que refiere al tipo de organismos existentes (lista de especies, presencia o no de cianobacterias potencialmente tóxicas) y el cuantitativo, que indica la cantidad de estos organismos en el agua y potencial toxicidad.

Éste trabajo se comenzó a través de un muestreo para avanzar en el primer objetivo propuesto: de establecer a partir de células tomadas del ambiente un cultivo monoespecífico de *Microcystis aeruginosa* de nuestra región, que expresan un perfil característico de Microcystinas en condiciones controladas de laboratorio.

1.1: Antecedentes del florecimiento en el canal de desagüe, en el partido de Pila

1.1.1: Parámetros fisicoquímicos en el muestreo

Las variables abióticas determinadas in situ en el zanjón para los tres puntos de muestreo considerados (Fig. 4.1.B) se indican en la tabla *1*.1.

Las medidas registradas desde el punto 1 al 3, se corresponden con la distancia desde el drenaje que comunica con la planta de tratamiento de aguas. La temperatura aumentó levemente del punto 1 al 3, desde una zona de circulación de agua a una estancada. Para el pH se observó la disminución de una unidad desde el punto 3 al 1 y la conductividad eléctrica no mostró variaciones obteniéndose valores esperados en el agua de uso doméstico.

Puntos de muestreo	1	2	3
Temperatura (°C)	10,5	11,9	12,7
pH	10,7	9,9	9,7
Conductividad (µS/cm)	1210	1220	1215

Tabla 1.1. Valores promedios de las determinaciones realizadas con la sonda Sper Scientific Water Quality Meter 850081 en los puntos de toma de muestras.

Para los tres puntos de muestreo se observó una temperatura acorde a la estación del año donde se realizó el estudio; el pH responde al desarrollo de un florecimiento de cianobacterias; y en el caso de la alta conductividad se refleja los afluentes que recibía.

1.1.2: Fitoplancton: cualitativo y cuantitativo

De los tres puntos de muestreo considerados, se obtuvieron muestras como se describe en la sección 4.1.3 y a través del método de Utermöhl, se determinaron por claves taxonómicas género, especie y se realizó el recuento celular del fitoplancton presente. En la tabla *1*.2 se detalla los resultados obtenidos.

	Recuento celular (células/mL)			
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	
Cyanobacteria				
Microcystis aeruginosa	9.420.000	101.832.000	123.870.000	
Oscillatoria formosa	15.600	-	-	
Chlorophyta	-	-	-	
Crucigenia quadrata	4.800	-	-	
Kirchneriella obesa	1.200	-	-	
Lagerheimia quadriseta	4.800	-	-	
Monoraphidium aff. tortile	-	12.000	-	
Oocystis spp.	-	12.000	30.000	
Pediastrum boryanum	Presente	-	-	

Scenedesmus acuminatus	7.200	Presente	Presente
S. acutus	30.000	-	-
S. longispina	4.800	-	-
S. quadricauda	4.800	-	Presente
Schroederia setigera	1.200	-	-
Chrysophyta			
Navicula spp.	1.200	36.000	36.000
Nitzschia spp.	Presente	-	-
Synedra spp.	-	24.000	-

Tabla 1.2: Taxa de fitoplancton hallados en los puntos de muestreo y su recuento celular (valor medio para un n=3; se indica Presente para un recuento celular < 100 células/ml)

Se identificaron en total en los tres sitios de toma de muestra del zanjón dos géneros de Cyanobacteria, ocho de Chlorophyta y tres de géneros de Chrysophyta.

Del pasaje del punto 1 al 3 de muestreo se observa como dominó el fitoplancton la división Cyanobacteria, siendo la especie *Microcystis aeruginosa* de mayor abundancia con un recuento de entre 10^6 a 10^8 cel/ml. En particular en el punto 3 (sitio más alejado del drenaje) es donde se encontró una pérdida de diversidad de las otras especies presentes respecto de los demás puntos de muestreo, y por lo tanto como es la dominancia de la especie de *M. aeruginosa*.

1.1.3: Bioensayo para determinar la toxicidad de una muestra proveniente del florecimiento en estudio

La primera aproximación que se realizó a fin de conocer si el florecimiento presentaba toxinas y que clase de cianotoxinas, se realizó con un Ensayo Ratón. Este ensayo es ampliamente utilizado en el control de ficotoxinas marinas presentes en moluscos y otros organismos marinos. En primera instancia fue desarrollado para la determinación semicuantitativa de saxitoxinas por Sommer en la década de 1930 en EEUU, luego se fue adaptando a otras ficotoxinas y otras matrices. Se denomina ensayo ratón a la inyección

intraperitoneal de extractos muy crudos, con poco procesamiento, y que se utilizan con el fin de precisar rápidamente la existencia de toxinas y además orientar la búsqueda sobre los grandes grupos de toxinas, a saber, neurotoxinas y hepatotoxinas. En particular el análisis macroscópico del hígado de los animales testeados permite identificar a las hepatotoxinas, y la formación de un hígado hemorrágico y que su peso sea superior al 7 % del peso del animal es indicación de la presencia de MCs. La evaluación de toxicidad (descrito en la sección 4.1.4) se realizó con ratones expuestos por inyección intraperitoneal con el extracto obtenido del florecimiento natural.

Los animales post-inyección presentaron rápidamente alteraciones como disminución de movilidad, hiperventilación, espasmos; y finalmente, la muerte de los animales tratados se produjo en 68 ± 10 min (media \pm SD., n = 3).

La observación macroscópica reveló alteraciones en los hígados de los ratones tratados, observándose aumento en el tamaño y una coloración oscura pardo-rojiza. Los demás órganos no presentaron cambios en tamaño ni aspecto. El porcentaje de peso del hígado de los animales tratados fue de $9,9 \pm 5$ % con respecto a su peso corporal, lo que evidencia la afectación hepática, inflamación y hemorragias intrahepáticas características de las intoxicaciones con MCs. Con lo que se concluye la hepatotoxicidad del material biológico analizado.

La identificación taxonómica de *Microcystis aeruginosa* en el florecimiento desarrollado en el canal de desagüe (partido de Pila), desarrollo masivo de biomasa y el potencial tóxico del mismo (atribuido fundamentalmente a dicha cianobacteria); nos permitió emprender el aislamiento y puesta en cultivo de una cepa con el fin de caracterizarla toxicológica y filogenéticamente.

1.2: Caracterización taxonómica de una cepa de *Microcystis aeruginosa* CAAT 2005-3

La especie en estudio se identificó taxonómicamente bajo el nombre de *Microcystis* aeruginosa (Kützing) Kützing, 1846; y en particular se la denominó como CAAT 2005-

3. Las colonias se visualizan al microscopio óptico (Fig. *1*.1), de forma irregular, globosas, rodeadas de mucílago incoloro, no estratificadas; y las células se ven generalmente esféricas, con la presencia de aerótopos que le suelen dar un color amarronado.



Figura *1*.1. Aspecto de las células de *M. aeruginosa* (A) Microfotografía de las colonias de CAAT 2003-5, (B) células en cultivo donde se pueden observar los aerotopes (flechas) y (C) mucílago circundante producido por las células, el fondo negro esta dado por la tinción de tinta china. La barra corresponde a 10 μm.

1.3: Aislamiento y cultivo de una cepa de M. aeruginosa

Las colonias de *Microcystis aeruginosa*, de forma individual se extrajeron con pipeta Pasteur en portaobjetos de vidrio previamente flameado. Se lavaron en forma seriada repetidas veces en condiciones de esterilidad con diferentes medios de cultivo (fresco y estéril) de BG-11 (Rippka y col., 1979) modificado y Z-8 (Staub, 1961) para descartar la presencia de colonias secundarias u otro material contaminante.

De esta forma el cultivo obtenido es un cultivo unicolonial de células de *M. aeruginosa* provenientes de una sola colonia tomada del ambiente; el cual se ha mantenido estable en condiciones controladas de laboratorio.

1.3.1: Curvas de crecimiento de la cepa aislada bajo distintas condiciones de cultivo
Las curvas de crecimiento de la cepa aislada en las distintas condiciones probadas se representaron en la figura *1*.2 A. Cuando se emplearon los medios Z-8 y BG-11, iluminación 15 μ E m-2 s-1, temperatura 24 ±1°Cy ciclo luz:oscuridad (14:10 horas) (**curva 1** y **2**); los cultivos entraron al poco tiempo en fase de muerte, no pudiendo hacerse un seguimiento de los recuentos celulares. Posteriormente se analizó bajo una intensidad de luz de 30 μ E m-2 s-1, temperatura 26 ±1°C, en los medios de cultivo Z-8 y BG-11 y ciclo luz:oscuridad (14:10 horas) (**curva 3** y **4**). La curva obtenida con medio BG-11 se extendió por más de 60 días, observándose una fase exponencial muy extendida en el tiempo (**curva 4**) y después del día 20 se observaron en los recuentos celulares, que los desvíos estándar (SD) eran muy marcados. En cambio, con medio Z8 se extendió por 30 días sin distinción de las fases de crecimiento (**curva 3**).

Las **curvas 5** y **6**, con los medios Z8 y BG-11 respectivamente, temperatura $26 \pm 1^{\circ}$ C, ciclo luz:oscuridad (14:10 horas) y el agregado de agitación por aire humidificado permitió observar en ambas en la fase exponencial un aumento del número de individuos de un orden, en un plazo de entre 10 y 13 días. En la fase estacionaria de ambas curvas de crecimiento, se observa que los SD de los recuentos celulares también son marcados. Para la **curva 5** la extensión de la misma fue de 28 días y la **curva 6** de 20 días.

En la figura 1.2 B se observa el incremento logarítmico natural de las cinéticas de crecimiento para las **curvas 4**, **5** y **6**, en la fase exponencial.



Figura 1.2: Curvas de crecimiento de la cepa en estudio de M. aeruginosa. A: en las distintas condiciones de incubación descriptas en la tabla 1.3). M±SD, n=3. B: Cinética logarítmica de las curvas 4,5 y 6 (Tabla 1.3) de los valores medios de recuento celular en la fase exponencial.

Del análisis de las pendientes de la fase exponencial de las 6 cinéticas de desarrollo de la cepa en estudio, se obtuvieron parámetros cinéticos que son mostrados en la tabla *1*.3 en donde se observan los valores de k (velocidad específica de crecimiento), y el td (tiempo de duplicación).

Las **curvas 5** y **6** mostraron una fase exponencial de crecimiento rápido con un k de 0,156 y $0,206 \text{ días}^{-1}$, y un tiempo de duplicación de 4,4 y 3,4 días, respectivamente.

Curva de crecimiento	Condiciones de incubación	K (días ⁻¹)	T _d (días)	
1	Medio Z 8 Temperatura 24 ± 1°C Intensidad de luz 15 μE/m ² seg Fotoperiodo 14:10	-	-	
2	2 Medio BG-11 Temperatura $24 \pm 1^{\circ}C$ Intensidad de luz 15 $\mu E/m^2 seg$ Fotoperiodo 14:10			
3	Medio Z 8 Temperatura $26 \pm 1^{\circ}C$ Intensidad de luz 30 $\mu E/m^2 seg$ Fotoperiodo 14:10	-	-	
4 Medio BG-11 Temperatura $26 \pm 1^{\circ}C$ Intensidad de luz $30 \ \mu E/m^2 seg$ Fotoperiodo 14:10		0.052	13.3	
5	5 Fotoperiodo 14:10 Medio Z 8 Temperatura $26 \pm 1^{\circ}C$ Intensidad de luz 30 $\mu E/m^2 seg$ Fotoperiodo 14:10 Agitación por burbujeo con aire humidificado		4.4	
6	Medio BG-11 Temperatura $26 \pm 1^{\circ}$ C Intensidad de luz 30 μ E/m ² seg Fotoperiodo 14:10 Agitación por burbujeo con aire humidificado	0.204	3.4	

Tabla 1.3: Condiciones de crecimiento y parámetros de las curvas de crecimiento de la cepa en estudio, k: velocidad específica de crecimiento (días-1) y T: tiempo de duplicación (días). (-): indica el no crecimiento del cultivo en dichas condiciones de laboratorio.

En la figura *1*.3 se observan cultivos de la cepa *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 en batch sin agitación en medio BG 11 de cultivos provenientes de los aislados del florecimiento, en condiciones de laboratorio.



Figura 1.3: Cultivos en batch de la cepa de Microcystis aeruginosa de la CAAT 2005-3.

Se seleccionaron las condiciones de la curva 6 como las óptimas para el crecimiento de la cepa de *Microcystis aeruginosa* aislada en laboratorio, denominada CAAT 2005-3, debido que con esta cinética se alcanzó la mayor velocidad específica de crecimiento y el menor tiempo de duplicación.

1.3.2: Cinética de crecimiento de la cepa de Microcystis aeruginosa CAAT 2005-3

La cinética de crecimiento de la cepa aislada de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3, se realizó bajo las condiciones de laboratorio de medio BG-11, temperatura de $26 \pm 1^{\circ}$ C, intensidad de luz de30 µE m-2 s-1, ciclo de luz:oscuridad 14:10 y agitación por burbujeo con aire humidificado (curva 6).

A cada tiempo de evolución de crecimiento de la cepa en estudio, se determinó la densidad óptica a 740 nm, por triplicado (Fig. *1*.4 (A)) y el recuento celular.



Figura 1.4: A: Densidad óptica a 740 nm. B: Densidad óptica y recuento celular a cada tiempo medido de la cinética de crecimiento de la cepa CAAT 2005-3. Los valores se expresan en M \pm SD, n=3.

Los datos de densidad óptica y recuento celular obtenidos se muestran en la figura *1*.4 (B). Se observa una relación lineal entre ambos, como se muestra en la figura *1*.5.

La ecuación siguiente es obtenida de la regresión lineal de los datos en la fase exponencial, se representa como:

Y (células/ml) =
$$1,06 * 10^6 + 1,88 * 10^7$$
 X
77

En donde X es la densidad óptica (Abs a 740 nm) e Y es el número de células/ml; obteniendo un R2 = 0,98952 para la correlación lineal.



Figura 1.5: Relación lineal entre las medias del recuento celular y la DO de la cinética de crecimiento de la cepa CAAT 2005-3, en fase exponencial. En el recuadro se indican los valores obtenidos de la regresión lineal.

Además, se determinaron los parámetros de: clorofila a, proteínas totales y MCs; que se indican en conjunto con los de recuento celular en la figura *1.6.* Siguiendo el método desarrollado en 4.3.5.1 a cada tiempo se encontró una sola toxina, que se la denominó provisoriamente como MC-XR, dado que aún no se conocía su estructura química.

Como era de esperar el crecimiento poblacional presenta las fases de crecimiento: latencia o lag desde el inicio (día 0) hasta el día 1, seguido por exponencial hasta el día 8 y a partir de allí se continuó con la fase estacionaria.

La concentración de clorofila a al inició fue 352 μ g/l y mostró un leve incremento en los primeros días de la curva extendiéndose hasta el día 4. Se siguió con un aumento marcado hasta el día 7 alcanzando 4477 μ g/l y luego se mantuvo constante en el tiempo. En cuanto a proteínas totales también se observó el mismo comportamiento comenzando con 9,5 μ g/ml y llegando al final de la fase exponencial (día 8) a 43,1 μ g/ml.



Figura 1.6: Crecimiento de la cepa de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 en las condiciones de laboratorio seleccionadas como óptimas (BG-11, temperatura 26 \pm 1°C, intensidad de luz: 30 μ E/m2seg, ciclo luz:oscuridad 14:10 y con agitación por aire humidificado). Recuento celular (negro), clorofila a (rojo), proteínas (azul) y MC (verde) en función del tiempo. Los valores se expresan en M±SD, n=3.

De la cuantificación de MC en comparación con los demás parámetros, se indican que, con el aumento del número de células, en paralelo se da un incremento del contenido de MC (Fig. *1*.7), alcanzando al día 11 un valor de 1,91 µg/ml.

Analizando la evolución de la concentración de MC en la fase exponencial de crecimiento, y aunque se trata de un metabolito secundario, se lo relacionó al crecimiento celular. Encontrándose un q (quota: cantidad de metabolito producido por célula) como la pendiente de la relación lineal entre concentración de MC y recuento celular; de una ecuación de primer orden.



Figura 1.7: A: Gráfico de los valores medios de recuento celular y concentración de MC, en función del tiempo. En **B** se amplió la escala del contenido de la MC denominada hasta el momento como MC-XR, vs tiempo. M \pm SD, n=3

Es por ello que la asociación entre recuento celular y concentración de toxina (MC-XR) se pudo llegar a determinar en el gráfico de la figura 1.8, donde se obtiene una ecuación a través de la correlación lineal con un R² de 0,934.

Y (μ g/ml) = - 0,136 + 0,1126* X (cel*10⁶/ml)



Figura 1.8: Grafico de correlación entre los valores medios del recuento celular vs la concentración de MC-XR, de la cepa CAAT 2005-3, durante la fase exponencial. La recta roja es la regresión lineal, con R^2 de 0,934.

Por lo tanto, las condiciones de cultivo con las que se llevó a cabo la curva 6 de crecimiento, permiten la síntesis de la toxina de MC-XR a lo largo del tiempo de evolución de la cinética de la cepa CAAT 2005-3.

1.4: Caracterización toxicológica de la cepa CAAT 2005-3

1.4.1: Identificación y cuantificación de MCs mediante Cromatografía Liquida de Alta Resolución (HPLC)

Durante el avance de la curva de crecimiento de la cepa de *M. aeruginosa* en estudio, se determinó en paralelo la presencia y cuantificación de MCs por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector UV con arreglo de diodos, λ detección=238 nm (HPLC-DAD) (descripto en la sección 4.3.5.1).

Un perfil característico se presenta en la figura *1*.9, donde se aprecia un pico que no posee el tiempo de retención de Microcystina LR pero que presenta un espectro de absorción compatible con MCs.

La cianotoxina se encontró en todos los puntos de la curva de crecimiento considerados (12 días de crecimiento). Se trata de una molécula con espectro de absorción compatible con MC y que aparece a un tiempo de retención posterior a la MC-LR y que había sido detectada con anterioridad en los florecimientos del Río de La Plata. En su momento se denominó MC-XR, dado que no se conocía su identidad química (Fig. *1*.9.A).

Para la cuantificación, se utilizó un patrón secundario a partir de un extracto purificado proveniente del Río de la Plata que contenía MC-LR y otra variante que se la denominó MC-XR (Fig. *1*.9.B). El mismo se obtuvo de sucesivos procesos de recuperación de fracciones a la salida del detector de un HPLC UV-DAD y tipificado en base a un estándar analítico de MC-LR (SIGMA).



Figura 1.9: Cromatogramas de HPLC y espectros de absorción, obtenidos de los picos de MC-LR y MC-XR. (A): de un punto de la curva de crecimiento de la cepa CAAT 2005-3 y (**B**) de un estándar secundario proveniente del Rio de la Plata.

1.4.2: Determinación de MC por LC / ESI-HRMS

Posteriormente a través de la técnica de espectrometría de masa (LC/ESI-HRMS), se confirmó la variante de toxina [D-Leu¹] MC-LR. En la figura *1*.11 se observa la estructura química; determinada sobre la base de los iones formados con un peso molecular de 1037 (ion molecular) y detección del fragmento 135 correspondiente a la unidad conocida Adda así como otros fragmentos característicos.

En la figura *1*.10.A se muestran corridas cromatográficas de los fragmentos m/z 135; 213 y 375, típicos de la molécula de MC y corresponden a distintos aminoácidos presentes. De los patrones de fragmentación (Fig. *1*.10.B), el pico de m / z 135, es resultado de

escisión del grupo metoxi [MeO-] de la cadena lateral del Adda, quedando la estructura química [PhCH2CH(OMe)]; y los iones m / z 213 y 169 podrían ser asignados a [Glu-Mdha+H] y [Mdha-Leu-CO+H], respectivamente. Los iones de productos m / z 375, 595 y 728 corresponderían a [CH(Me)-CH=C(Me)-CH = CH-CH2-CH(Me)-CO-Glu-Mdha], [Mdha-Leu-Leu MeAsp-Arg+H] y [MeAsp-Arg-AddaGlu], respectivamente.



Figura 1.10: Análisis de LC / ESI-HRMS se lleva a cabo para confirmar la identidad de MC producida por CAAT 2005-3. (A): picos de iones productos utilizados para identificar varios metabolitos de MC, 135 m / z, 213 m / z 375 y m / z; (B): cromatograma de masas de la [D-Leu¹] MC-LR presente en muestras cultivadas de CAAT 2005-3 que mostró el ion molecular (1.037 m / z) y varios metabolitos.



Figura 1.11: Fragmentos de iones que componen la molécula de [D-leu¹] MC-LR. MASP: ácido D-eritro-b- metilaspártico. Adda: (2S, 3S, 8S, 9S) ácido deca-4,6-dienoico -3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenilo. Mdha: deshidroalanina N-metilo.

1.4.3: Siete nuevas variantes de MCs en células de CAAT 2005-3

Si bien la [D-Leu¹] MC-LR es la toxina mayoritaria quisimos investigar sobre la posible presencia de otras variantes que pudieran estar presentes en menor cantidad. Con este fin, a partir de un extracto celular obtenido de un cultivo denso de la cepa CAAT 2005-3, se separaron alícuotas conteniendo toxinas intracelulares, que con el uso de HPLC (sección 4.3.5.1) se detectaron por sus espectros de absorción similar al de las MCs. Se

consideraron a los tiempos de retención 9,65; 10,42 y 10,97 minutos, denominándose fracción 1, 2 y 3, respectivamente (Fig. *1*.12). Las áreas bajo los picos de las fracciones 1 y 3 resultaron poco abundantes; la fracción 1 fue correlativa con el tiempo de retención de MC-LR (estándar) y la 2 fue acorde a la variante (identificada en la sección *1*.4.2) que produce la cepa en estudio.



Figura 1.12: (A) Cromatograma de una muestra de contenido intracelular de CAAT 2005-3, por HPLC DAD. Se señalan las tres fracciones en análisis, tR: 9,65; 10,42 y 10,97 minutos. (B) Espectros de absorción de las fracciones 1, 2 y 3.

Posteriormente se analizaron las tres fracciones por separado en espectrometría de masa de alta resolución, electrospray (ESI) - FTICRMS (SOLARIX 7 Tesla (Bruker, Bremen, Alemania) con método de fragmentación CID (disociación inducida por colisión). Y se pudieron diferenciar diez variantes de MCs, entre ellas MC-LR en la fracción 1 y [D-Leu¹] MC-LR en la fracción 2; y siete nuevas MCs no reportadas previamente en la literatura (Tabla *1.4*). Estas últimas moléculas identificadas, aparecieron distribuidas entre las tres fracciones, y en baja concentración.

Variantes de MCs en CAAT 2005-3 Fórmula	Fórmula	[M+2H] ⁺²	Fracción en	Publicada
	m/z	HPLC	i ubiicada	

MC-LR	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$	498,28166		Si
[Glu(OCH ₃) ⁶]MC-LR	$C_{50}H_{76}N_{10}O_{12}$	505,28949		Si
[M(O) ¹]MC-LR	$C_{51}H_{78}N_{10}O_{13}S$	536,28080	1	No
[M(O) ¹ ,Glu(OCH ₃) ⁶]MC- LR	C ₅₂ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₃ S	543,28863		No
[D Leu ¹]MC-LR	$C_{52}H_{80}O_{12}N_{10}$	519,30514		Si
[Leu ¹ ,Glu(OCH ₃) ⁶]MC-LR	$C_{53}H_{82}O_{12}N_{10}$	526,31296		No
[Leu ¹ ,Ser ⁷]MC-LR	$C_{52}H_{82}N_{10}O_{13}$	528,31042	2	No
[Leu ¹ ,Glu(OCH ₃) ⁶ ,Ser ⁷]MC- LR	C ₅₃ H ₈₂ O ₁₃ N ₁₀	535,31824		No
[Leu ¹ ,Asp ⁷]MC-LR	$C_{51}H_{78}N_{10}O_{12}$	512,29731		No
[Leu ¹ ,Glu(OCH ₃) ⁶]MC- HilR	$C_{54}H_{84}N_{10}O_{12}$	533,32079	3	No

Tabla 1.4: Variantes de MCs encontradas en la cepa de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 y por espectrometría en tándem. Se indican de cada MC la formula molecular, ion molecular, fracción en el HPLC del extracto y su conocimiento en publicaciones científicas.

1.5: Modelado de la curva de crecimiento de CAAT 2005-3 y producción de [D-Leu¹] MC-LR

Dado los resultados previamente obtenidos, se procedió a la aplicación del modelado matemático de Gompertz, y así poder predecir el comportamiento del crecimiento celular N de la cepa de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 y a la concentración de [D-Leu¹] MC-LR (Fig. *1*.13). La ecuación, descripta en la sección 4.3.6, que representa a ambas variables en función del tiempo es:

$$Log (N o [D-Leu1] MC-LR) = a + c exp \{-exp [-b(t-m)]\}$$

Donde a es la ordenada al origen y representa el logaritmo cuando el tiempo disminuye infinitamente, b es la velocidad relativa al tiempo m, c es el log cuando el tiempo aumenta indefinidamente y es el número de ciclos log, y m el tiempo para alcanzar la tasa de crecimiento máximo.



Figura 1.13: Las líneas continuas corresponden al modelo de Gompertz, ajustado a los datos experimentales obtenidos de recuento celular y concentración de MC, en la cepa en estudio.

La ecuación se aplicó a los datos de crecimiento de cianobacterias y concentración de [D-Leu¹] MC-LR por regresión no lineal utilizando el programa Systat. En la tabla *1.5* se expresan los valores asignados a los parámetros de la ecuación como también a μ , LPD (tiempo de la fase latencia) y MPD (número de logaritmos alcanzados de densidad de población o concentración de MC). El algoritmo seleccionado calcula el conjunto de parámetros con la suma residual más baja de cuadrados y un intervalo de confianza del 95%.

	а	С	b	т	μ (1/día o μg/mLdía)	LPD (días)	MPD
Log(N)	6.39±0.04	0.76±0.05	0.69±0.12	2.34±0.35	0.19±0.05	0.89±0.10	7.15±0.09
Log([D- Leu ¹] MC-LR)	0.23±0.02	1.79±0.06	0.40±0.03	4.46±0.10	0.26±0.02	1.96±0.01	2.02±0.08

Tabla 1.5: Parámetros de la ecuación de Gompertz, tanto para el crecimiento de la cepa *M. aeruginosa* CAAT 2005-3, como para la producción de [D-Leu¹] MC-LR, en condiciones de laboratorio. M±SD, n=3

De la cinética modelada, se desprendió que las condiciones impuestas a la curva de crecimiento en cuanto al recuento celular (N), se obtuvo un μ (velocidad específica de crecimiento) de 0,19 1/día. Resultado que también se refleja en un tiempo de latencia de casi un día y un c (número de ciclos logarítmicos máximos de crecimiento) de un valor de 0,76. En cambio, para la concentración de MC con el modelado, se encontró que μ fue mayor que para el crecimiento del cultivo, alcanzando 0,26 μ g/ml día. Aunque se necesitó de casi dos días para superar la fase de latencia, y un valor de c de casi dos ciclos logarítmicos para llegar a la fase estacionaria.

Por lo tanto, el crecimiento en número de individuos se proyecta como más lento, con poco tiempo de latencia y sin un salto importante a la fase estacionaria. Para la toxina, aunque tarda más en superar el tiempo de latencia la velocidad específica es mayor y alcanzando valores altos cuando llegue a la fase estacionaria.

1.6: Caracterización filogenética de la cepa CAAT 2005-3

Una vez en cultivo la cepa CAAT 2005-3, procedimos a completar la identificación taxonómica en función de corroborar la primera identificación morfológica. Como se describió en la sección 4.3.7 se realizó la identificación molecular de la especie de *M. aeruginosa* en estudio, a través de amplicones de *cpc*BA-IGS obtenidos a partir del ADN total de células de CAAT 2005-3. Posteriormente se analizó a través de la enzima *Hae*III el Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Encontrándose para esta enzima de restricción, un patrón para todos los productos de amplificación desde el 1 al 8 (Fig. *1*.14).



Figura 1.14: Imágenes de electroforesis en geles de agarosa teñidas con bromuro de etidio, correspondientes a: (A) los productos de la amplificación *cpc*BA-IGS, donde la calle M es el marcador de peso molecular y la calle 1 de los amplicones con un PM de 663 bp; (B): resultado del análisis de restricción *Hae*III de los productos de amplificación *cpc*BA-IGS, a partir de diferentes clones positivos.

La secuenciación de los insertos *cpc*BA-IGS, fue realizada en un servicio externo, y permitió realizar un análisis de tipo BLASTn comparándose con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas. Se demostró que el inserto secuenciado de la cepa aislada de la localidad de Pila presentaba una identidad del 97% con secuencias de la especie *M. aeruginosa* (*M. aeruginosa* EAWAG127a, *M. aeruginosa* EAWAG110, provenientes de Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag)) (Tabla *1.6*).

	Max	Total	Query	E	Max
	score	score	coverage	value	ident
AJ003174.1 <i>Microcystis aeruginosa</i> partial pcB and pcA genes, strain EAWAG127a	1129	1129	100%	0.0	97%
AJ003172.1 <i>Microcystis aeruginosa</i> partial pcB and pcA genes, strain EAWAG110	1129	1129	100%	0.0	97%

Tabla 1.6: Principales cepas de *M. aeruginosa* con un alineamiento positivo significativo con la cepa en estudio (CAAT 2005-3).

El análisis filogenético mostró que la secuencia *cpc*BA-IGS se agrupa con secuencias identificadas pertenecientes al género *Microcystis*. En la figura *1*.15 se ubica en el árbol filogenético la cepa aislada del ambiente y mantenida en condiciones de laboratorio, *Microcystis aeruginosa* CAAT 2005-3.



Figura.*1*.15: Análisis filogenético correspondiente a secuencias *cpc*BA-IGS de la cepa aislada de *M. aeruginosa*. Árbol filogenético construido con el modelo de matriz de distancia ("neighbor joining") del programa MEGA5. Los números en los nodos representan el porcentaje correspondiente a los valores de 1000 ciclos de remuestreo ("bootstrap"). La cepa CAAT 2005-3 se indica con letra negra.

1.7: Detección de genes mcy

La información sobre el potencial toxigénico de la cepa, se obtuvo a través de una PCR múltiple, dada que la presencia de genes de la biosíntesis de MC (*mcy*C, *mcy*D y *mcy*G) se amplificaron con éxito a partir de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 y, los tres productos de amplificación tenían los tamaños esperados (Fig. *1*.16).



Figura 1.16. Electroforesis de la amplificación de secuencias de *mcy* por PCR multiplex. Carril 1, *M. aeruginosa* UTEX 2666, se utilizó como control positivo; carril 2, control negativo; carril 3, *M. aeruginosa* CAAT 2005-3. M: marcador de ADN (escalera de 100 pb). Las puntas de flecha indican la posición de los amplicones de *mcy*G (425 pb), *mcy*C (648 pb) y *mcy*D (859 pb).

1.8: Discusión

A partir de un evento local de un florecimiento de cianobacterias en la localidad de Pila, provincia de Bs As, Argentina; se ha logrado aislar y caracterizar filogénica y toxicológicamente una cepa de *Microcystis aeruginosa*. La cepa argentina puesta en condiciones de cultivo en nuestro país, aporta al conocimiento aún insuficiente y fragmentado, de las cianobacterias y cianotoxinas presentes en América del Sur. De esta manera se aporta a la construcción del mapa de la distribución y dinámica del desarrollo

de estos fenómenos ambientales, y a poder comprender posibles consecuencias en el ecosistema y medio ambiente en cuanto a la biodiversidad y calidad del agua.

Las floraciones de cianobacterias reportadas en todo el mundo afectan la integridad ecológica y la calidad de los recursos hídricos (Paerl y Huisman, 2009). Este fenómeno ha sido descrito en Brasil (Dörr y col., 2010), en donde además se registró el primer caso de muerte asociada a la presencia de MCs (Jochimsen y col., 1998). En la Argentina, en 13 de sus 24 provincias, se ha informado la existencia de cianobacterias (Echenique y Aguilera, 2009), y varios son los reportes referidos a la identificación de las mismas y su impacto ecológico (Amé y col., 2010; Andrinolo y col., 2007; Giannuzzi y col., 2011; Mancini y col., 2010).

En este trabajo de tesis se ha identificado y caracterizado taxonómica, filogenética y toxicológicamente una cepa nativa de *M. aeruginosa*, denominada CAAT 2005-3, aislada a partir de un cuerpo de agua dulce eutrófico situado en la ciudad de Pila, provincia de Buenos Aires, Argentina. Del análisis cualitativo y cuantitativo del fitoplancton, se llegó a la identificación morfológica de una especie con estructura típica de colonias de *M. aeruginosa*. Esta cianobacteria, potencialmente tóxica, es la que resultó de interés como responsable de intoxicaciones en animales rurales en campos aledaños al lugar de estudio, y reportada varios años anteriores a este nuevo fenómeno, en el arroyo San Miguel en el mismo partido Pila (Buenos Aires) (Colautti y col., 1998).

Es especialmente importante en esta tesis, el cambio de condiciones desde donde se encontró el florecimiento hasta donde finalmente se lo pudo poner en cultivo y estudiar su cinética de crecimiento. Los modelos matemáticos se basan en tasas de crecimientos y condiciones ideales de cultivo; y lo que los resultados indican es que, el desarrollo de un florecimiento y su duración en el tiempo depende no solo de la capacidad de duplicación de las células sino de mantenerse viables en condiciones adversas.

Como parte de esta caracterización, una vez aislada se logró tener la cepa autóctona CAAT 2005-3 en cultivo en condiciones de laboratorio, pudiendo determinarse su cinética de crecimiento y producción de MCs. El comportamiento de la concentración de MC fue correlativo al del recuento celular en las fases de crecimiento, al igual que los parámetros de clorofila a y proteínas. En estudios previos como el de Orr y Jones (1998) y Lyck (2004); se observó una correlación lineal entre la producción de MC y el crecimiento celular. Esta situación, en la que la producción de toxinas es una función

directa de la proliferación celular (Neilan y col., 2012). parece darse para la mayoría de las cianobacterias investigadas en el laboratorio. Por otro lado, para Bortoli y colaboradores (2014), no se encontró linealidad entre el crecimiento y la producción de MC para cultivos de Brazilian Microcystis aeruginosa LTPNA 02 con diferentes composiciones de medios; y fue posible detectar altas concentraciones de MC intracelular en experimentos con tasas de crecimiento altas y bajas. La concentración de MC obtenida fue en el punto más alto de la curva de crecimiento de la cepa CAAT 2005-3 de 1,91 ppm. Dicho valor resultó ser alto cuando se lo comparó con otros publicados en Huisman y Hulot (2005). Existen cuatro fuentes de variación responsables de la variabilidad en las concentraciones de MCs: variabilidad en la biomasa de cianobacterias, metodológicas, fisiológicas y de especies de cianobacteria y composición del genotipo (Huisman y Hulot., 2005). Además, la cantidad de proteína y de clorofila a dependen de los procesos celulares y se espera que cambien bajo diferentes condiciones de crecimiento. Queda por aclarar, de si es posible que cepas de Microcystis aisladas en diferentes partes del mundo puedan compararse con respecto a las diferencias de los factores ambientales y la producción de MC.

Para completar la identificación de la cepa en estudio, se siguieron técnicas moleculares desarrolladas sobre la secuencia *cpc*BA-IGS y posterior análisis filogenético, confirmándose mediante la agrupación con secuencias de cepas de *M. aeruginosa* y nombrándola como CAAT 2005-3. La valoración de esta metodología nos ha permitido ubicarla dentro de un árbol filogenético, pudiendo ver las similitudes de la cepa con otras ya identificadas, como las denominadas EAWAG. Estas últimas provienen de extractos de *Microcystis aeruginosa* seleccionados y mantenidos en bancos de ceparios en el Instituto Federal de Ciencia y Tecnología Acuática (Suiza); donde son muy utilizadas para comparar en estudios de diversidad genética y de toxigenicidad a nivel mundial (Neilan y col., 2008; Pearson y col., 2010; Tillett y col., 2001).

En cuanto a las características toxígenas de la cepa CAAT 2005-3, se determinó la presencia de genes mcy (-C, -D y –G) involucrados en la síntesis y modificaciones de las moléculas de MC, a través de la técnica de multiplex PCR. Frente a este resultado, se postuló la capacidad potencial de toxicidad, aun cuando se encuentre en periodos de no producción de MCs, tal como quedó demostrado por Oteiza y colaboradores (2007).

De los avances en el conocimiento de la toxicidad de la cepa CAAT 2005-3, luego de determinar por HPLC que se encontraba una nueva variante de MC; por LC/ESI-HRMS se la pudo identificar químicamente y denominarla [D-Leu¹] MC-LR, basándose en el ion molecular (C52H80N10O12, [M + H] +: 1 037,603 5) y los espectros de fragmentación por LC Orbitrap -SM. La toxina mostró patrones de fragmentación característicos descritos por Park y colaboradores (2001), en los que se observó el pico del ion fragmento particular de MC a m / z 135 derivado del residuo Adda y la séptima unidad de aminoácidos se dedujo era Mdha a partir de los picos de iones fragmento en m / z 213 y 375 (Rinehart y col., 1994). Los picos de iones fragmento en m / z 595 se correlacionaron con la secuencia de Mdha-Leu-Leu-Arg-MeAsp. Los componentes de aminoácidos de [D-Leu¹] MC-LR se parecían a los de MC-LR, excepto por la presencia de dos Leu en lugar de Ala y Leu en la posición 1 y 2 de la molécula, respectivamente. La variación en la unidad de aminoácido entre [D-Leu¹] MC-LR y MC-LR reveló la diferencia en el peso molecular (42 unidades de masa) y la fórmula (C36) entre [D-Leu¹] MC-LR y MC-LR (PM: 994; C49H74N10O12). Estos datos sugirieron que [D-Leu¹] MC-LR es la variante Leu de MC- LR vinculado a la unidad [D-Ala¹].

La molécula [D-Leu¹] MC-LR fue reportada por primera vez por Park a partir de una floración de agua recogida en Pakowki Lake, Alberta, Canadá y asociada con la mortalidad de aves que se había producido desde 1995. Del mismo modo, en cromatogramas obtenidos a partir de muestras recogidas en el Río de la Plata, Argentina-Uruguay, se mostró que contenían dos variantes de MCs: una es MC-LR y otra no identificada con el ion molecular [m + H] + m / z 1037.8; la cual se propuso denominarla [D-Leu¹] MC-LR (Andrinolo y col., 2007). Más tarde Ouahid y colaboradores (2011), encontraron que la toxina [D-Leu¹] MC-LR fue también identificado como única variante producida de forma natural en un florecimiento de otra cepa de M. aeruginosa en el estuario del Río de la Plata en 2003. Asimismo, [D-Leu¹] MC-LR fue identificada como la MC más abundante producida por una cepa de laboratorio de Microcystis spp. aislada de las aguas salobres de la Laguna de los Patos, sur de Brasil; y la toxicidad de [D-Leu¹] MC-LR y MC-LR, se describió de forma similar según bioensayos y pruebas de inhibición de la proteína fosfatasa (Matthiensen y col., 2000). Otra cepa brasileña M. aeruginosa NPLJ-4 aislada de un estanque durante la temporada de lluvias en Paulista (Paraíba, Brasil) también fue citada como productora de [D-Leu¹] MC-LR (Silva-Stenico y col., 2009). En un trabajo en donde se consideraron géneros alejados de Microcystis

spp. (NPLJ-4 y RST 9501), *Phormidium* (CENA 270, aislado de un estanque de Paraíba, Brasil) y *Nostoc* (UK89II, aislado del liquen *Peltigera neopolydactyla* muestreada en Laukaa, Finlandia); se encontró que todas las cepas resultaron ser productoras de [D-Leu¹] MC-LR. Y en este sentido, Shishido y colaboradores (2013), concluyeron que diferentes eventos evolutivos están involucrados en la convergencia para la biosíntesis de la molécula de [D-Leu¹] MC-LR.

Aunque algunos análisis filogenéticos indican que el grupo de genes *mcy*, tienen un origen antiguo entre las cianobacterias; otros trabajos sugieren que la transferencia horizontal, perdida de genes, y eventos de recombinación en el grupo de genes de MC, pueden explicar la distribución y la variación de los genes entre *Microcystis spp*. estrechamente relacionados. Es por todo esto, que no se podría hablar de dispersión de especies de cianobacterias en el medio ambiente, si se tomara como indicador las moléculas de MCs. Eventos genéticos distintos y de selección positivos, influyen en la formación de la variante [D-Leu¹] MC-LR de las diversas cepas (Shishido y col., 2013).

Las cianobacterias son un grupo de organismos fotosintéticos de lento crecimiento y una fuente prolífica de moléculas con estructuras químicas complicadas y potentes actividades biológicas. La identificación de siete nuevas variantes de MCs determinadas en la cepa CAAT 2005-3 a través de espectrometría en tándem, indica la existencia de una gran biodiversidad de metabolitos secundarios. Por lo tanto, de una gran variedad en la organización genética y enzimas asociadas e indican que la pluralidad química actualmente establecida, es una subestimación de lo que se puede lograr mediante las vías de biosíntesis. En trabajos anteriores se han indicado que las MCs pueden afectar a algunos depredadores, en la quelación de metales, en la regulación génica, o en la señalización inter e intraespecífica; aunque aún su rol en el metabolismo de las cianobacterias sigue siendo desconocido. De acuerdo con la opinión más aceptada, estos compuestos son producidos por sus valores ecológicos o función fisiológica y beneficiarios para los organismos productores. Sin embargo, sigue habiendo escasez de información sobre las ventajas en la presencia de estos metabolitos secundarios y su papel biológico, por lo que es de interés estudiar los diferentes compuestos bioactivos producidos por la misma cepa. Sobre este tema se vuelve en el capítulo 3 de resultados.

2.- Evaluación del comportamiento de *Microcystis aeruginosa* CAAT 2005-3 en diversas condiciones de estrés



Una vez caracterizada la cepa de *Microcystis aeruginosa* CAAT 2005-3 taxonómica, toxicológica y filogénicamente, se buscó evaluar la respuesta del cultivo ante situaciones de estrés.

En el caso particular sobre el rol de las MCs, se busca determinar si la producción de toxinas responde en forma generalizada o si tiene respuesta específica para cada tipo de estresor. También se busca estimar si la presencia de toxinas le otorga a la población de cianobacterias una resistencia adicional a los efectos nocivos del estresor.

Para esto se expuso al cultivo a peróxido de hidrógeno, radiación UV y agregados de fracciones (extracelular, intracelular y células enteras) de otro cultivo de la misma cepa, pero en otra fase de crecimiento siguiendo la respuesta en la clorosis, lipoperoxidación (MDA) y concentración de MCs.

2.1: Estudio del efecto del H₂O₂ sobre la cepa CAAT 2005-3 en distintas fases de crecimiento

Sobre una curva de crecimiento de la cepa de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 (como la obtenida en el capítulo *1* de resultados, sección 1.3.2), se analizó el comportamiento adaptativo frente al H_2O_2 .

Para ello se realizó un seguimiento de la curva de crecimiento en cultivo batch a través del recuento celular, y se estableció el lapso medio de cada fase de desarrollo poblacional: para la fase **lag** se tomó el **día 1, exponencial** el **día 4**, y **estacionaria** el **día 13** (Fig. 2.1). A cada día estipulado se separaron alícuotas de cultivo que se sometieron a 5, 15 y 30 mM de H₂O₂ además del control; y a 3, 24 y 48 horas de exposición se determinó en cada caso la concentración de clorofíla a y se expresó cómo % de clorosis.

La clorosis se definió como la cantidad relativa de pigmento fotosintético respecto del control, que se recupera después del tratamiento. Se empleó la siguiente ecuación:

Clorosis (%) = ((Cl a (control) - Cl a (X)) / Cl a (control)) *100

en donde Cl a (control) es clorofila a del control y Cl a (X) es la clorofila a determinada a cada tratamiento de exposición de concentración de H_2O_2 , tiempos y fase de crecimiento.



Figura 2.1: Cinética de crecimiento de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3, expresada como Ln (N/N°) en el tiempo, bajo condiciones controladas de laboratorio de temperatura: $26 \pm 1^{\circ}$ C; 30μ E/m²seg; ciclo luz:oscuridad 14:10 horas y con agitación por aire humidificado. Los días de toma de muestra del ensayo con varias dosis de H₂O₂, se indicaron con recuadros.

En la figura 2.2 se indican los datos de clorosis obtenidos del comportamiento de la cepa CAAT 2005-3 para cada fase de crecimiento, concentraciones de H_2O_2 utilizadas y tiempo de exposición. De la misma se desprende que el **día 1** de la curva, en la fase lag de crecimiento, se muestra que para 5 mM de H_2O_2 se generó a las 3 horas un mínimo de daño, que avanzó al 51 % de clorosis a las 24 horas y luego de 48 horas llega al 100 %. Para el caso de 15 mM se ve acelerada la clorosis, dado que para las 24 horas se obtuvo un 90 % y un 100 % a las 48 horas post-tratamiento. En el caso de la dosis más alta de 30mM, se llegó al 100 % de clorosis desde el comienzo de la exposición.

Para el **día 4**, correspondiente a mitad de la fase exponencial, la cepa expuesta a 5 mM de H₂O₂ mostró un cambio paulatino de la clorosis y llegando a las 48 horas con un valor de 31 %. Una respuesta similar se observó a 15 mM que en el día 1 a igual dosis, difiriendo solo a 3 horas; lo mismo fue para 30 mM de oxidante.

Al día 13, correlativo a la fase estacionaria en progreso, se encontró que para 5 mM de H_2O_2 la cepa en estudio respondió afectándose menos que para el día 4, a igual

concentración. Para la dosis de 15 mM, fue más gradual el aumento de la clorosis que para el día 4, siendo más notorio a las 24 y 48 horas. En cambio, para 30 mM, la diferencia más marcada que con el día 4, se observó a las 24 horas.



Los resultados de la figura 2.2, permiten indicar que la respuesta al estrés ocasionado por

un elemento oxidante, como el peróxido de hidrogeno, depende del momento en que se encuentra el desarrollo poblacional de cianobacterias. Siendo en las fases primeras del desarrollo más susceptible que en la fase estacionaria.

Por lo tanto, este comportamiento es importante en función de establecer mecanismos de control de las floraciones; ya que para mitigar un florecimiento maduro se necesitaría niveles de agua oxigenada (como plantea Matthijs y colaboradores, 2012) incompatibles con la biota presente en el cuerpo de agua.

El uso de agentes oxidantes debería ser circunscripto a los primeros instantes del desarrollo del florecimiento para lo cual es necesario implementar sistemas de detección temprana.

2.1.1: Concentración de MC y estado oxidativo en los tratamientos con agua oxigenada

Posteriormente se buscó observar sí la exposición de la cepa CAAT 2005-3 al H₂O₂ produce además un cambio en la concentración intracelular de MCs de la población celular, lo que estaría mostrando, regulaciones a nivel génico, y una respuesta adaptativa específica.

Para esto se realizó de la exposición a peróxido de hidrogeno a las concentraciones de 5, 15 y 30 mM y los tiempos 3, 24 y 48 horas, sobre los días 1, 4 y 13 de la curva de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* CAAT 20005-3, toma de muestras para determinar el contenido de toxinas intracelulares, con sus correspondientes controles.

Los resultados obtenidos de los perfiles toxicológicos intracelulares para el día 1 y 4 no mostraron modificaciones significativas, respecto del control.

El día 13 de la curva de crecimiento, fase estacionaria, se encontraron resultados que se exponen en la tabla 2.1 de la MC mayoritariamente obtenida en los perfiles de toxinas intracelular para cada tratamiento y tiempo de exposición, además del control.

Tiempo de exposición	Control	mM H ₂ O ₂			
		5	15	30	
(horas)	fg [D- Leu ¹] MC-LR / cel				
3	7,60±0,38	6,80±0,40	9,01±0,36 *	16,17±0,81 *	
24	6,91±0,7	6,06±0,38	8,30±0,5 *	7,60±0,50	
48	7,20±0,55	15,49±0,97 *	6,28±0,25	1,50±0,38 *	

Tabla 2.1: Concentración de [D- Leu¹] MC-LR por célula del día 13 de la curva de crecimiento de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3, versus mM de H_2O_2 y tiempos de exposición. M±SD, n=3. El * indica resultados significativamente diferentes respecto del control correspondiente (p < 0,05). Nótese que a tiempo limitado de 3 horas la producción de toxinas aumenta con la concentración de H_2O_2 , mientras que a mayores tiempos de exposición con las dosis de la afectación celular se limita la respuesta o incluso la elimina como se observa claramente a las 48 horas con 30mM de H202.

De los valores de tabla 2.1 y el comportamiento de la clorosis (Fig. 2.1.C) para el día 13, se desprende que la exposición a **5 mM de H₂O₂** sobre las células de CAAT 2005-3, se pudo observar un aumento de más del doble de fg de [D-Leu¹] MC-LR por célula a las 48 horas respecto del control. Acompañado por una clorosis del 18% a igual tiempo de experimentación. En cambio, para los tiempos anteriores (3 y 24 horas) no se produjeron variaciones de MC en relación a los controles, y con una clorosis baja, que varió del 3 al 8%.

La situación fue diferente con **15 mM** de oxidante, en donde la variante mayoritaria intracelular de [D-Leu¹] MC-LR resultó ser de 9,01 fg/célula a las 3 horas, e ir disminuyendo a las 24 horas. Los valores de MC a estos tiempos fueron significativos respecto de los controles. Sin embargo, a las 48 horas no se observó diferencia marcada con el control, mostrando a este tiempo que ya no hay efectos del oxidante sobre el metabolismo de las toxinas. En contraste, el comportamiento de la clorosis fue en ascenso continuo, desde 6 al 63%, entre las 3 a las 48 horas de exposición, respectivamente (Fig. 2.2.C).

Por último, con el tratamiento de **30 mM** de agua oxigenada, a las 3 horas la [D-Leu¹] MC-LR alcanzó un valor de más del doble que para el control al mismo tiempo, y con una clorosis del 16%. A través del paso de las horas del estrés oxidativo, la MC

intracelular disminuyó hasta llegar a un mínimo de 1,50 fg/célula a las 48 horas y acompañado de una clorosis que llegó al 100%.

Estos resultados indican que hay una relación proporcional entre la concentración de H_2O_2 y el tiempo de exposición sobre las cianobacterias, que recuerda a la clásica formula de toxicología que dice que la toxicidad es una función de la concentración y el tiempo. Sin embargo, el aumento de la concentración intracelular de MC en determinadas situaciones pro-oxidantes, indicarían una respuesta marcada de las cianobacterias en consecuencia a esa exposición.

Ante este resultado quisimos entender como respondía el sistema enzimático antioxidante en este ensayo el día 13 de la curva de crecimiento. Así, se estimó la extensión de la peroxidación lipídica a través de la determinación de TBARS expresado como MDA/proteínas como se muestra en la figura 2.3.



Figura 2.3 Contenido de MDA/proteínas de las células de CAAT 2005-3 expuestas a agua oxigenada (5, 15 y 30mM) y tiempos de 3, 24 y 48 horas (M±SD, n=3), el día 13 de la curva de crecimiento. El * indica resultados significativamente diferentes respecto del control correspondiente (p < 0,05) y * * para cifras significativas respecto de lo obtenido a las 3 y 24 horas de exposición respectivamente (p < 0,05).

Tomando en cuenta la tabla 2.1 y la figura 2.3, se observa que a 5 mM de H_2O_2 de exposición, se reafirma que sin cambios en el estado oxidativo de las células y con baja

clorosis, la molécula de MC muestra un cambio importante en su concentración intracelular. Este comportamiento también se manifiesta con **15 mM** de oxidante, en donde a las 3 horas no hay variación de TBARS, y la toxina muestra una cantidad alta por célula, y va disminuyendo en la medida que el estado oxidativo se hace más marcado en el tiempo. Por último, en la exposición con **30 mM** de oxidante se observa que la peroxidación lipídica actúa en forma similar que con la concentración anterior de H₂O₂. Nuevamente se indica a las 3 horas, un valor alto de la concentración de la MC, que va descendiendo en relación a como aumenta la clorosis y TBARS.

Se aprecia que la primera respuesta a la exposición con H_2O_2 , independientemente de la concentración, es el aumento de la concentración intracelular de MCs, y posteriormente se continua con el aumento en TBARS. Este resultado abona la hipótesis que después fue estudiada por Hernando y colaboradores (2018) en que a partir de la cepa CAAT 2005-3 expuesta a situaciones de estrés, se encontró que la molécula de MC respondió actuando como en un rol de antioxidante.

Por último, analizando desde el punto de vista de cómo se comporta la concentración de [D-Leu¹] MC-LR intracelular de la cepa de CAAT 2005-3 (día 13 en fase estacionaria) a través del % de clorosis e independientemente del tiempo de experimentación, se obtiene el gráfico de la figura 2.4:



Figura 2.4: Comportamiento de los fg de la variante de MC-LR / cel vs % de clorosis, con independización de tiempos de exposición y dosis de agua oxigenada. En línea azul se representa el promedio de contenido de MC por célula, en el control. M \pm SD, n=3.

Analizando las concentraciones de [D-Leu¹] MC-LR por célula en función de los % de clorosis obtenidos, se observa que considerando el estado fisiológico de la célula y también con MDA; a bajos % de clorosis de entre 3 y 8, lo que resulta equivalente a muy poco estrés oxidativo celular, se observó que la concentración de toxina estuvo cercana al control.

En donde la clorosis estuvo entre **16 y 18 %**, se determinó un aumento importante, del doble del contenido intracelular de la toxina respecto del control y alcanzándose valores de entre 15,49 y 16,17 fg/cel.

Por último, a clorosis **mayores del 18 %** se encontró que los valores de concentración de MC por célula van disminuyendo a medida que aumenta la clorosis y se afectan las células por el peróxido de hidrogeno.

2.1.2: Electroforesis de ADN de la cepa expuesta a 5mM de H₂O₂, en la fase estacionaria de crecimiento

Para profundizar si ocurrió algún efecto negativo sobre la integridad de las células de la cepa CAAT 2005-3, se evaluó la posibilidad de "muerte celular programada" (PCD), basándose en la respuesta encontrada en varios trabajos de especies de fitoplancton de agua dulce y marina al estrés ambiental (Bidle y Falkowski, 2004).

Se consideró la dosis de 5 mM de oxidante dada su importancia tecnológica para mitigar florecimientos de cianobacterias, y en que para esa concentración la clorosis alcanzó un máximo de 8 % a las 24 horas, y por lo tanto hubo muy escaso estrés oxidativo y pérdida de células. No se consideraron los otros tiempos porque para 3 horas no hay cambios oxidativos (en valores de TBARS) respecto del control, y para las 48 horas se observó un aumento marcado del contenido de MC y una clorosis del 18 %.

En la electroforesis realizada con las muestras de ADN de las células de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 tratadas con 5 mM de agua oxigenada a las 24 horas de exposición corrieron en gel de agarosa al 1 % (Fig. 2.5), no se encontraron fragmentaciones del material genético. Como así tampoco cambios perceptibles respecto de lo que ocurrió con los controles.

Estos resultados indican que la respuesta de las células a 5 mM de H₂O₂ son respuestas fisiológicas de células viables.



Figura 2.5: Imagen de la revelación de corrida de electroforesis en gel de agarosa. Las primeras tres calles corresponden a muestras de ADN control de células de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3, la siguiente en la corrida PM, y las últimas tres provienen de las células de "tratadas" con 5 mM de H_2O_2 por 24 horas.

Por lo tanto, de la exposición a peróxido de hidrogeno, la cepa CAAT 2005-3, respondió mostrándose más resistente en la fase estacionaria. Además, la respuesta de la toxina fue específica a determinadas concentraciones de peróxido de hidrogeno y tiempos de exposición; y encontrándose vinculación con un rango de porcentaje de clorosis, correspondiente a poca afectación del estado oxidativo celular y sin mostrar signos de muerte similar a apoptosis.

2.2: Evaluación de la cepa CAAT 2005-3 frente a radiación UV

Un estresor ambiental conocido que produce una elevación de radicales libres, es la radiación UV. Los efectos adversos de la UVR pueden afectar severamente la fotosíntesis

y procesos metabólicos relacionados, así como la biomasa y el crecimiento en cianobacterias, como se analiza en el trabajo de Hernando y colaboradores (2018).

La cepa CAAT 2005-3 al comienzo de la fase estacionaria en donde presentó mejor adaptabilidad al estrés ambiental (como en la sección 2.1) y diluida 1 en 10; se expuso a la radiación solar, y se analizó su influencia sobre estado oxidativo, pigmentos fotosintéticos y MC a las 8 horas de tratamiento. Los niveles de longitud de onda experimentadas fueron las siguientes, de acuerdo al Erlenmeyer utilizado de: Cuarzo para la zona de 280-700nm (UVA+UVB+PAR); Mylar para 320-700 nm (UVA+PAR); y Plexiglas (UF3) para 400-700 nm (PAR). La dosis de radiación medida fue para UVB de 38 y para UVA+UVB+PAR 9800 KJ/m2.

Al final del tiempo de exposición de 8 horas se obtuvieron resultados de aumento significativos de ROS (como UA de DCF, unidades arbitrarias de 2',7'-diclorofluoresceína) en las células expuestas a la radiación UVB+UVA+PAR y a UVA+PAR respecto de lo que ocurre en el rango de luz blanca (PAR), pero sin diferencias marcadas entre las aplicaciones a UV (Fig. 2.6 A).

Los valores de clorofila a para los tres tratamientos se muestran en la figura 2.6 B no se observaron variaciones para con los tres filtros y solo fue mayor la concentración media de pigmento para cuando se estuvo en PAR; intervalo de longitud de onda donde se produce la fotosíntesis.

Por último, sabiendo que la cepa es productora de la toxina [D-Leu¹] MC-LR, se analizó este parámetro (realizándose a través de HPLC) y se determinaron concentraciones del orden de ppb (Fig. 2.6 C). Se observó una disminución significativa para cuando se da la exposición a radiaciones UV+PAR en relación a lo que ocurre con PAR, como también para entre UVB+UBA+PAR y UVA+PAR.





Se evaluaron estos resultados con respecto del trabajo publicado en colaboración: Physiological responses and toxin production of *Microcystis aeruginosa* in short term exposure to solar UV radiation (Hernando y col., 2018); en donde se empleó la misma cepa CAAT 2005-3.

En dicho estudio se observó que las enzimas antioxidantes fueron más activas a altas dosis de radiación UVR (UVB+UBA) y diferentes respuestas dependiendo de la exposición a UVA o UVB y el nivel de dosis de radiación. Además, no se encontraron efectos sobre la biomasa ni la producción de ROS cuando las dosis de UVR+PAR fueron inferiores a 9875 KJ/m2. Situación que para nosotros fue diferente dado que trabajamos con una dosis
de radiación solar para UVB de 38 y para UVR+PAR fue de 9800 KJ/m2, y en que si se observaron cambios en el contenido de ROS respecto del PAR.

2.3: Comportamiento de un cultivo de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 en fase exponencial avanzada, por agregados de la misma cepa, pero en fase estacionaria

En base a lo ocurrido en el apartado 2.1 en donde se observó que a ciertos valores de clorosis se generaron aumentos significativos de MC intracelular, se buscó vincular esta variación de la concentración de MC intracelular con el número de individuos de la población celular o la presencia de componentes extracelulares o intracelulares.

Para ello, se estudió la respuesta en el contenido de clorofila a, recuento celular, estimación de la peroxidación lipídica y concentración de [D-Leu¹] MC-LR intracelular; de un cultivo de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 en **fase exponencial avanzada**, llamado **I** (tomando el día 10 de la cinética de crecimiento de la figura 2.1) con el agregado de un 10 % de volumen de componentes de otro cultivo de la misma cepa pero en **fase estacionaria**, denominado **II** (día 20 de la curva), y haciendo las determinaciones a las 3, 24 y 48 horas de evolución de la exposición del cultivo **I**.

Ambos cultivos I y II se encontraban en condiciones de crecimiento como se describieron en la sección 1.3.2. Las fracciones del cultivo II fueron definidas como:

medio extracelular II al sobrenadante, obtenido a partir de una alícuota de 10 ml que se centrifugó durante 15 min a 2500 rpm;

células II al pellet, posterior a la centrifugación y que contiene las células enteras lavadas 3 veces, y llevado al volumen inicial de 10 ml con medio fresco estéril;

y el **extracto celular II**, obtenido a partir de una alícuota del batch **II** de 40 ml. La misma se concentró, sonicó (alcanzando una lisis celular del 83 %) y fue llevado a un volumen final de 10 ml.

Finalizado el experimento, se observó que con las tres fracciones II expuestas sobre el cultivo I, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de clorofila a respecto del control a los tres tiempos. Lo mismo ocurrió con los recuentos celulares, para

los tres ensayos estudiados. En tanto que para el contenido de MDA por BSA, tampoco se mostrando modificaciones respecto del control con el agregado de **medio extracelular** II ni con las células II, a las 3, 24 y 48 horas sobre el cultivo I de la cepa CAAT 2005-3. Como única excepción en cuanto a diferencias significativas se observó a las 24 horas con el tratamiento de adición de **extracto celular II**, y sin cambios ni a las 3 y ni a las 48 horas de evaluación.

Los perfiles toxicológicos por HPLC UV del espacio intracelular de los cultivos I y II, previo al ensayo indicaron que para: I tenía 7,10±0,34 y para II de 5,14±0,19 fg [D-Leu¹] MC-LR por célula.

A continuación, en la tabla 2.2 se muestran los resultados a las distintas condiciones y tiempos de evolución de la exposición, de los valores obtenidos de la MC mayoritaria intracelular:

Tiempo de exposición	fg [D-Leu ¹]MC-LR /cel					
	Control	Medio extracelular II	Células II	Extracto celular II		
3 horas	7,10±0,26	6,40±0,30 *	6,53±0,40	6,29±0,25 *		
24 horas	6,90±0,22	6,73±0,27	6,14±0,40 *	5,66±0,20 *		
48 horas	7,30±0,41	6,18±0,23 *	9,15±0,43 *	3,98±0,34 *		

Tabla 2.2: Resultados de la concentración de MC intracelulares por célula, para las distintas opciones probados y sus respectivos tiempos de exposición. N=3±DS. El * indica resultados significativamente diferentes al control correspondiente (p < 0,05).

Analizando la tabla 2.2, se observan cambios significativos de disminución de la concentración intracelular de la MC cuando se hizo el tratamiento con un volumen del 10 % de **medio extracelular II** sobre el cultivo I, a las 3 y 48 horas de exposición. Sin embargo, con la adición de **células II**, a las 48 horas se determinó un aumento importante de la toxina. Por último, frente al agregado de **extracto celular II** a los tres tiempos de evaluación, se encontraron que las concentraciones de [D-Leu¹] MC-LR fueron en descenso continuo, y con diferencias significativas respecto de sus controles.

Tomando en cuenta las determinaciones medidas, en particular cuando se agregó la fracción de **células II** el efecto logrado de incremento de la concentración de toxina, indicaría que la molécula de MC actúa como un marcador intracelular especifico de lo que ocurre en el entorno celular. En cambio, cuando se trataron las células de cultivo I con el **extracto celular II**, la concentración de toxina se observó muy afectada, lo que también se encontró con TBARS a las 24 horas. Por lo tanto, en este último caso se produjo un estado oxidativo marcado.

2.4: Discusión

Bajo condiciones desfavorables, las cianobacterias generan respuestas que van desde cambios imperceptibles a significativos, que incluyen en un extremo la muerte celular. El tiempo de adaptación de las mismas y las señales intracelulares (que indican si hay un desbalance en el estado oxidativo), juegan un rol clave en esta situación. En este sentido la exposición a varios agentes estresores sobre la cepa de *Microcystis aeruginosa* CAAT 2005-3, mostró variedad de comportamientos.

En particular la cepa en estudio respondió a la exposición de peróxido de hidrógeno con diferentes grados de clorosis, variaciones en la concentración de TBARS y alteraciones en la concentración intracelular de [D-Leu¹] MC-LR.

El fenómeno de clorosis es un mecanismo de adaptación a condiciones de estrés ambiental, con una disminución gradual del metabolismo y en donde las cianobacterias entran en un estado latente caracterizado por fotosíntesis y pigmentación residuales mínimas, lo que permite la supervivencia en períodos de tiempo prolongados. Los datos obtenidos muestran el efecto oxidante con el desbalance redox y la consecuente clorosis variable dependiendo el caso. Teniendo en cuenta esta manifestación, se encontró que la cepa CAAT 2005-3 mostró en la fase estacionaria su mayor adaptación frente a la exposición de peróxido de hidrógeno, respecto de lo que ocurre en la fase lag y la exponencial del cultivo de la cianobacteria en condiciones de laboratorio.

De la comparación con otras publicaciones surgen distintas consideraciones a la hora de interpretar algunos de los resultados encontrados.

La cepa CAAT 2005-3 en **fase lag** responde con un efecto similar en porcentaje de clorosis cuando se la expone a 15 mM de H_2O_2 a las 24 horas de tratamiento, que el observado en el trabajo de Liu y colaboradores (2017). Aunque este último se realizó con una dosis de 0.59 mM, 48 horas de exposición y sobre muestras de campo de *Microcystis spp*. (proveniente del lago Taihu) con una concentración de clorofila mucho menor. Las diferencias en las concentraciones de peróxido de hidrogeno empleadas podrían deberse, por un lado, al efecto del oxidante atenuado sobre el entorno inmediato de las células de CAAT 2005-3 respecto de un ensamble de especies de *Microcystis*. Por otro lado, una dosis muy alta de peróxido de hidrógeno utilizada en nuestro trabajo lleva a alcanzar una clorosis del 90 % en la mitad de tiempo respecto del otro trabajo. También se debe tomar en cuenta que el comportamiento observado de la cepa CAAT 2005-3 obedece a un cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio y en periodo de adaptación de su fase de crecimiento.

En la **fase exponencial** de CAAT 2005-3 con 5 mM de peróxido de hidrógeno y, 24 y 48 horas de tratamiento, los resultados de clorosis fueron equivalentes al trabajo de Lürling y colaboradores (2014). En ambos casos, se utilizaron cepas en condiciones controladas de laboratorio, aunque con concentraciones muy diferentes de oxidante. Lürling y colaboradores (2014) trabajaron con un cultivo de PCC 7820 y con menor concentración de clorofila a. Se pone de manifiesto que, con la cepa comercial la respuesta a la concentración de peróxido de hidrogeno se condicionó al recuento poblacional, tal como ocurrió con nuestra cepa.

El comportamiento en la **fase estacionaria** de la cepa CAAT 2005-3 sobre la exposición a 15 mM de H_2O_2 en 48 horas, resultó semejante que con los trabajos previamente comparados (Liu y col., 2017; y Lürling y col., 2014), aunque con dosis muy bajas de oxidante y con empleo de 24 horas de tratamiento. Se vuelven a evidenciar las diferencias en el número de células expuestas, condiciones de cultivo, como también el comportamiento de una cepa en condiciones de laboratorio respecto de lo que ocurriría en estudios con un ensamble de varias especies de *Microcystis*. Además, se observa que nuestra cepa requirió del doble de tiempo para llegar a la misma clorosis que los otros estudios. Por lo tanto, la cepa CAAT 2005-3 en la fase estacionaria, encontraría un estado de mayor supervivencia a condiciones desfavorables en su desarrollo. Esto es concordante con la situación original donde se encontraba la especie de cianobacteria en el ambiente con capacidad de aumentar su abundancia relativa y mantenerse aun en condiciones no optimas como la baja temperatura y menor fotoperiodo que había en el momento de la recolección en el mes de mayo del 2005.

En el caso de la exposición a 3 horas con de peróxido de hidrógeno sobre la cepa CAAT 2005-3, las respuestas en clorosis variaron ampliamente en la fase lag. Sin embargo, en fases exponencial y estacionaria la clorosis llegó a un máximo de 17 %; indicando que aun a dosis muy altas del oxidante la cepa respondió sin afectarse demasiado en un tiempo corto de exposición. En cambio, para Huo y colaboradores (2015), encontraron que a un máximo de aproximadamente 1,76 mM de H_2O_2 de exposición, las células de *M. aeruginosa* PCC 7820 se rompieron o dañaron luego de 3 horas de tratamiento. Sin que se observara disminuida la concentración del oxidante en dicho estudio y trabajándose en fase exponencial del cultivo.

El efecto selectivo del H_2O_2 sobre las cianobacterias se ha demostrado tanto en estudios de laboratorio como en aplicaciones de campo, exhibiéndose un mayor efecto adverso sobre el rendimiento fotosintético de *M. aeruginosa* que en un alga verde y una diatomea sobre una exposición de 3 horas (M. Drábková y col., 2007). También, en otro trabajo realizado en lagos holandeses colonizados por *Planktothrix agardhii* se observó que posterior al tratamiento con peróxido de hidrógeno, no se encontró afectado el fitoplancton eucariótico, el zooplancton y la macrofauna (Matthijs y col., 2012).

La mayor sensibilidad a la exposición a peróxido de hidrógeno de las cianobacterias en comparación con el fitoplancton eucariótico se basa en una marcada diferencia en su estrategia de afrontamiento para reducir el alto estrés lumínico. La luz de alta intensidad causa un exceso de flujo de electrones fotosintético, que estimula a los cloroplastos de las plantas y las algas eucariotas, para usar oxígeno como sustituto de aceptor de electrones y da como resultado la formación de superóxido. Esta especie reactiva de oxígeno (ROS) se convierte enzimáticamente en H₂O₂ por la superóxido dismutasa, y luego la catalasa en agua y oxígeno o, alternativamente, la enzima antioxidante como la ascorbato peroxidasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua. Sin embargo, en las cianobacterias la presencia de flavoproteínas flv1p y flv3p excluye la formación de O2-: el exceso de electrones todavía se dona al oxígeno, pero el H₂O se produce directamente sin producción intermediaria de O2- y H₂O₂ (Allahverdiyeva y col., 2013; Helman y col., 2005).

En consecuencia, los niveles de estrés oxidativo son más bajos en las células cianobacterianas que en las algas eucarióticas y disminuyen la demanda de una presencia elevada de enzimas que eliminan las ROS; especialmente el ascorbato peroxidasa carente en cianobacterias (Passardi y col., 2007), lo que hace que las cianobacterias sean más vulnerables al peróxido de hidrógeno.

En particular las concentraciones de exposición de peróxido de hidrógeno utilizadas en este capítulo obedecen a la necesidad de un tratamiento efectivo de mitigación sobre florecimientos densos de *M. aeruginosa*. Las implicancias del mismo sobre un cuerpo de agua, requieren del estudio previo de variables tanto de las especies de cianobacterias presentes, características del florecimiento, del ambiente y del agente tratante. Por lo que nuestros datos indicarían, que las condiciones más eficientes de tratamiento se dan cuando el florecimiento de *M. aeruginosa* está en el comienzo de su desarrollo.

Se hacen necesarias varias consideraciones a la hora de evaluar la evolución del efecto del peróxido de hidrógeno sobre las cianobacterias; dada la dependencia con la especie, el estado fisiológico, la intensidad de luz (Drábková y col., 2007; Gao y col., 2015) y condiciones de cultivo. Queda pendiente evaluar el tiempo de estabilidad del peróxido de hidrógeno en las condiciones de trabajo, como también el efecto sobre la cepa a largo plazo por la exposición al oxidante en las concentraciones estudiadas.

En la condición de menor sensibilidad de las células de la cepa CAAT 2005-3 al H_2O_2 en fase de crecimiento estacionaria, se obtuvieron aumentos en la concentración de [D-Leu¹] MC-LR intracelular cuando se expuso a algunas dosis de oxidante y tiempos.

Se observan dos tipos de comportamientos de cómo cambia el contenido intracelular de MC para las distintas concentraciones de H_2O_2 y tiempos. Por un lado, para 5 mM de peróxido de hidrógeno y 48 horas de tratamiento una concentración de toxina muy alta, con una clorosis de 18 % y sin signos de estrés sobre las células de cianobacteria. Por lo que podría estar ocurriendo es que las células aun en un estado estable de desarrollo y sin percibir un ambiente estresante generan a las 48 horas un efecto acumulativo en la concentración de MC intracelular.

En cambio, para 15 y 30 mM de oxidante, se observa una respuesta a las 3 horas con valores altos de MC, respecto del control y con tendencia a disminuir a lo largo del tiempo. En ambos casos hay una dependencia entre la concentración del oxidante y la cantidad de toxina por célula. Esto indicaría a las 3 horas, que las células perciben

cambios en su entorno, aunque sin alteraciones marcadas en el estado oxidativo celular. Pero que, con la evolución del tiempo de exposición, el efecto oxidante del agente estresor es el que prima y se observa la disminución del contenido intracelular de MC a las 24 y 48 horas de tratamiento.

La respuesta de aumento de toxina intracelular, resulta contraria respecto de lo descripto en otros trabajos (Liu y col., 2017 y Lürling y col., 2014), en donde la cantidad de MC intracelular disminuye y la extracelular aumenta proporcionalmente. Lürling y colaboradores (2014) hace mención a la posibilidad de diferencias en términos de cruce de membranas o a diferentes características de adsorción por parte de las MCs, y también como parte de su explicación considera la variación en la expresión de toxinas causadas por condiciones particulares en el crecimiento.

Por ultimo dentro del análisis de exposición al peróxido de hidrógeno de 5 mM sobre la cepa CAAT 2005-3 se obtuvieron datos que indican que su molécula de ADN no se fragmentó por el tratamiento de estrés, y por lo tanto no hay indicios de PCD como ocurre en las células eucariotas. Sin embargo, en un estudio realizado por Ding y colaboradores (2012) sugirieron que *M. aeruginosa* expuesta a H₂O₂ experimenta un evento de muerte celular similar a apoptosis En el mismo, sus células presentaron un aumento en la vacuolación citoplasmática, condensación de cromatina y una electroforesis de ADN con un patrón de fragmentación, aunque sin el escalonamiento clásico de PCD. En otro trabajo se indicó la fragmentación del ADN de *Microcystis aeruginosa* unicelular (Kützing) Kützing cuando se colocó en oscuridad o se expuso a temperaturas elevadas (Bouchard y Purdie, 2011).

Queda planteado con estos resultados de exposición de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 que cuando se pretende mitigar florecimientos de cianobacterias, se deben realizar estrategias que tengan en cuenta variables particulares de la especie a controlar, estado fisiológico y número de individuos, como también concentración y tiempo de exposición de peróxido de hidrógeno y por ultimo considerar las implicancias en las variaciones de la concentración de MCs por efecto del tratamiento y posibles consecuencias de intoxicación.

Del análisis de la exposición de la cepa CAAT 2005-3 frente a radiaciones UV se encontró un efecto negativo sobre las células de cianobacterias en fase estacionaria. Según Zhang y colaboradores (2013), la exposición a rayos UVB puede dañar el lado aceptor de PSII e inducir la producción de oxidantes reactivos en células de *Microcystis*. Además, el aumento de la síntesis de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) y carotenos para absorber la radiación UV, o ficocianina y aloficocianina para evitar mayores daños a los centros de reacción de ADN, podría contribuir a las estrategias de afrontamiento del estrés de la radiación UVB. Sin embargo, la exposición prolongada a la alta intensidad de la radiación UVB condujo a la muerte celular de *Microcystis*.

En nuestros resultados se puede observar como la radiación UVB fue más nociva que la UVA, correspondiente también a lo publicado hasta el momento. En cuanto al decrecimiento de toxina total, se debe considerar también la posibilidad de efectos directos de la radiación sobre la molécula, dado que se necesitaría de análisis complementarios para ver la influencia directa sobre [D-Leu¹] MC-LR. Por otro lado, Hernando y colaboradores (2018), propusieron que la activación diferencial de enzimas antioxidantes dependía de la formación de diferentes ROS como consecuencia de la exposición a UVB o UVA, así como de las dosis de radicación recibidas por las células.

En cuanto al ensayo de los agregados de fracciones de un cultivo (II) en fase estacionaria sobre un cultivo (I) en fase exponencial avanzada, ambos de la cepa en estudio CAAT 2005-3, se observaron algunas variaciones en la concentración de MC intracelular.

La exposición de las distintas fracciones del cultivo II sobre el I, muestra que para el caso del agregado de células II al cultivo I, se observó un incremento de la concentración de [D-Leu¹] MC-LR al cabo de 48 horas. Por el contrario, se encontró una respuesta de disminución en el contenido intracelular de MC por el agregado de extracto celular II en el tiempo; lo que indicaría la existencia de estimulación de toxina restricta a la presencia de células enteras en una fase de crecimiento más envejecida.

En este sentido la MC podría actuar en un mecanismo de señalización, hipótesis que fue respaldada por el hecho de que la molécula se libera de la célula, aunque en pequeñas cantidades (Pearson y col., 2004; Wiedner y col., 2003). En otras publicaciones, se indica que la adición de MC ha conducido a cambios fenotípicos en la formación de colonias y a una reacción cruzada de otros metabolitos secundarios (Gan y col., 2012; Schatz y col., 2007). En un estudio reciente de *M. aeruginosa* PCC7806, se mostró que el efecto de señalización no permitió dar lugar a una reprogramación transcripcional global, sino que afectó a un pequeño conjunto de genes (Makower y col., 2015). Esto sugeriría que la molécula de MC responde en forma intracelular con aumento de su contenido cuando la

célula de *Microcystis aeruginosa* se encuentra en un ambiente no estresante, y en cambio frente a un entorno que genera estrés oxidativo marcado, la concentración de toxina tendería a disminuir. Por lo tanto, el rol de la toxina, aunque sigue sin poder definirse muestra comportamientos definidos frente a distintos escenarios en el entorno inmediato en que se expone la célula de cianobacteria.

Aun sin poder definir el rol de la toxina para la célula de *Microcystis*, se logró avanzar en determinar cambios de su concentración intracelular. Queda por evaluar como el metabolismo de las MCs actúa concretamente, bajo qué condiciones se afecta y cuál es la relación con el estado oxidativo de la célula.

3.- Comparación de *Microcystis aeruginosa* CAAT 2005-3 con otras cepas frente al peróxido de hidrogeno, temperatura y MC-LR



Conocido el comportamiento de la cepa de *Microcystis aeruginosa* CAAT 2005-3 frente al peróxido de hidrógeno, se buscó comparar sus respuestas con las de otra cepa comerciales, una de la misma especie que no es productora de toxina y una especie diferente de cianobacteria.

Además, se busca determinar si las MCs le otorgan características distintivas particulares a la cepa CAAT 2005-3 en comparación con la cepa no productora 24 A de *Microcystis spp*., frente al estrés por temperatura y a la exposición a altas dosis de MC-LR.

3.1: Paralelismo de dos cepas de *M. aeruginosa* (CAAT 2005-3 y ATCC) y una de *Arthrospira máxima*, sobre distintas concentraciones de H₂O₂

Una vez conocido el comportamiento de la cepa de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 en varias fases de su crecimiento frente al H_2O_2 (Sección 2.1), se tomó el periodo exponencial y se aplicó el mismo protocolo a otras dos cepas; una de la misma especie (obtenida comercialmente, ATCC) y otra de *Arthrospira máxima* (obtenida comercialmente UTEX 2342). Las tres cianobacterias se cultivaron bajo las medidas de desarrollo acordes a cada una y mantenidas en la cámara de cultivo, a igual temperatura, luz y ciclo de luz:oscuridad (14:10 horas). Se observaron los comportamientos de las tres cepas expuestas a 0,3; 5; 15 y 30 mM de H_2O_2 y analizado su % clorosis a tres tiempos (3, 24 y 48 horas).

Los resultados de clorosis de las cepas a cada tiempo se muestran en la figura 3.1. En la misma se observa que, a las **3 horas de exposición**, se encontró que la pérdida de clorofila a para las tres cepas de cianobacterias es similar y con leve tendencia a aumentar a lo largo del rango de concentraciones de H_2O_2 ; siempre por debajo del 25 %.

En cambio, a las **24 horas de exposición**, el comportamiento para la cepa CAAT 2005-3 fue marcadamente diferente de las demás, observándose un aumento gradual de la clorosis hasta 15 mM de 77 %, y luego manteniéndose alto a concentraciones mayores de oxidante. Para ATCC la respuesta fue proporcional y en incremento constante, y la relación se mostró lineal para *A. máxima*.

Finalmente, a las **48 horas de exposición**, la tolerancia al agente oxidante fue distinta para las tres cepas, aunque observándose el efecto más marcado que para las 24 horas.



De los datos obtenidos se observa que cada especie de cianobacteria se comporta frente al peróxido de hidrogeno de manera particular (Fig. 3.3). La clasificación de grupos funcionales de Reynolds, que se basa en adaptaciones y requisitos a condiciones

ambientales locales, indica que estas cianobacterias pertenecen a distintos grupos. Por lo tanto, es de esperarse que sus comportamientos sean distintos. Cabe aclarar que aquí se trabajó con cepas mantenidas en condiciones controladas de laboratorio y que no siempre refleja lo que ocurre en el hábitat natural, situación que en particular se observa entre las cepas de *M. aeruginosa*.

Además, si las observamos al microscopio óptico se encuentran características propias de sus morfologías, en las que las células de la cepa CAAT 2005-3 aparecen rodeadas de mucilago, no así la ATCC; como se muestran en las imágenes de la figura *3*.2.



Figura 3.2: Imágenes de microscopio de células de cultivos de las especies, A: *M. aeruginosa* ATCC (aumento 20X), B: *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 (40X) y C: *Arthrospira máxima* (10X)

Evidenciada las diferentes características particulares de cada especie y dentro de la misma especie de *Microcystis*, se volvió a graficar la evolución de la clorosis a cada dosis de oxidante y tiempo, pero para cada una de las cepas de cianobacteria por separado (Fig. *3.3*).



Figura 3.3: Curvas de la evolución del % de Clorosis vs mM de H_2O_2 , a cada tiempo de exposición y para las tres cepas en estudio. En azul se indica a 3 horas de tratamiento con oxidante, en rosa a las 24 horas y en negro a las 48 horas. Siendo A: *A. máxima*, B: *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 y C: *M. aeruginosa* ATCC. M±DS, n=3.

El comportamiento de *A. máxima* en la figura 3.3 A que se observa, es que hay un cambio de lo que ocurre a las 3 horas con las 24 y 48 horas de tratamiento. A estos dos últimos tiempos se observa una aceleración en el incremento de clorosis a partir de 15 mM de

agua oxigenada. Para *M. aeruginosa* cepa CAAT 2005-3, como se observó con la cepa anterior, pero es muy marcada la diferencia del comportamiento de la clorosis encontrada entre las 3 horas de exposición, y las 24 y 48 horas. Siendo para las 3 horas muy poco cambio, y sin embargo para las 24 y 48 horas resultó que llegan a un máximo a 15 mM de peróxido de hidrogeno. También para *M. aeruginosa* cepa ATCC obtenida comercialmente, se encontraron las variaciones entre las 3 horas, y las 24 y 48 horas de tratamiento. Aunque para los tiempos mayores la respuesta resulta ser más gradual.

En particular se observa como a la concentración más baja estudiada de 0,3 mM de H₂O₂ se produjeron cambios perceptibles y de distinta magnitud entre las cepas. A tiempos cortos de 3 horas, todas las especies respondieron similarmente. En cambio, a igual dosis se separan de sus comportamientos para las 24 horas de exposición, en que *A. máxima* aumentó 6 veces su valor de clorosis, ATCC alcanzó una pérdida de pigmentos de 7 veces y la cepa CAAT 2005-3 no sufrió ninguna modificación y se mantiene al 1 % de clorosis. Finalmente, a las 48 horas se indicó que la clorosis de CAAT 2005-3 y *A. máxima* alcanzan valores entre 16 y 18 %, mostrando un salto mayor para la primera cepa, y para ATCC se frenó el incremento que llegó al 26 %.

Del análisis de los gráficos de las figuras 3.1 y 3.3, se desprende que el efecto oxidativo del H₂O₂ puede tener dependencia con el tiempo de exposición y la concentración considerada, y por ende de la capacidad fisiológica de tolerancia de cada cianobacteria al agua oxigenada. Además, se podría decir que el fenómeno observado fue con posible dependencia de las características morfológicas propias de cada especie; y entre las cepas CAAT 2005-3 y ATCC se dan diferencias de producción de mucílago y que la primera es productora de MC y la segunda no.

3.2: Comparación de la cepa CAAT 2005-3 con otra cepa 24 A, ambas de *M. aeruginosa*, frente al estrés térmico y la exposición de MC-LR

En el cepario del laboratorio de Toxicología contamos, además de la cepa de *M. aeruginosa*, CAAT 2005-3 productora de MCs, con cepas no productoras de toxinas cianobacterianas como la cepa de *M. aeruginosa* 24 A. Ambas se mantienen en cámara de cultivo en condiciones controladas y por repiques periódicos.

Las cepas CAAT 2005-3 y 24 A fueron sometidas a estrés físico y químico para evaluar las respuestas de las mismas frente a esas condiciones. Empleamos temperaturas elevadas como estresor físico y agregado de MC-LR purificada como estresor químico. Sobre las cepas evaluamos los perfiles toxicológicos intracelulares luego de la una hora de exposición.

3.2.1: Cepa 24 A. Características generales

La cepa 24 A de *Microcystis aeruginosa* fue aislada del Rio de la Plata en el año 2004 a través de las metodologías descriptas para CAAT 2005-3 en la sección *1*.3; y puesta en condiciones de cultivo en cámara a $26 \pm 1^{\circ}$ C, 30μ E m⁻² s⁻¹, con ciclo luz:oscuridad 14:10 horas, en batch en medio BG 11.

La evaluación de la toxicidad se llevó a cabo mediante bioensayos y determinaciones analíticas (referida en las secciones 4.1.4 y 4.3.5.1). Inicialmente se realizó un ensayo con ratones, los cuales fueron inyectados intraperitoealmente con extractos obtenidos de muestras de cultivo de 24 A. Se encontró que los animales no presentaron alteraciones en su comportamiento ni muerte durante 24 horas post-inyección. La necropsia correspondiente tampoco mostró ninguna alteración o daño en hígado u otros órganos.

Se completó el análisis de toxicidad a través de la determinación de presencia de MCs por HPLC/UV-DAD. No observándose en corridas cromatográficas la presencia de picos correspondientes a MCs en extracto purificado obtenido de un cultivo denso de *M. aeruginosa* 24 A (Fig. 3.4).



Figura 3.4 Cromatograma de un extracto purificado de la cepa 24 A

Como parte de su caracterización también se realizó una curva de crecimiento (Fig. 3.5) comenzando con un inóculo denso y aclimatado, y en las condiciones de mantenimiento se siguió la cinética de recuento celular en el tiempo de la cepa de *M. aeruginosa* 24 A. En la misma se observa la fase lag de 2 días de desarrollo y a continuación una exponencial de 18 días de evolución alcanzando un logaritmo de aumento en el recuento celular.



Figura 3.5: Cinética de crecimiento de la cepa de *Microcystis aeruginosa* 24 A en condiciones de laboratorio. Gráfico A: Recuento celular vs. Tiempo, los resultados están expresados como $M\pm$ SD, n=3. B: Curva logarítmica vs. Tiempo.

3.2.2: Exposición térmica

Se utilizó un modelo basado en trabajar con paquetes celulares densos de cianobacterias (Fig. *3.*6) para observar cómo se comportan las células cuando se encuentran como cúmulos y en su entorno cercano.

Para ello se seleccionaron cultivos de *M. aeruginosa* de las cepas CAAT-2005-3 y 24 A en fase exponencial tardía (mantenidos en las mismas condiciones de la sección 1.3.2), siendo elegido para CAAT 2005-3 el día 10 de su curva de crecimiento con $1,35\pm0,12*10^7$ cel/ml y para 24 A el día 18 con un recuento celular de $1,48\pm0,09*10^7$ cel/ml.

Se siguió el diseño experimental detallado en la sección 4.4.1, tratándose los paquetes celulares con las temperaturas de 35 °C (estrés térmico) y 26 °C (control), en agitación suave en forma horizontal y en cámara de cultivo con luz a 30 μ E m-2 s-1 por el plazo de una hora (Fig. 3.6). Al finalizar la exposición se determinaron la concentración de clorofila a, proteínas y MCs intracelulares.



Figura 3.6: Esquema del modelo experimental. A: paquete celular de *M. aeruginosa* a 26 °C (control) y B: exposición a 35 °C.

En la figura 3.7 se muestran los resultados obtenidos luego de 1 hora de tratamiento térmico del contenido celular de clorofila a y proteínas totales. Para ambos parámetros no se encontraron variaciones significativas para CAAT 2005-3 y 24 A, respecto del control. Entre las cepas de *M. aeruginosa* 24 A y CAAT 2005-3 se encontraron diferencias de concentración de clorofila a y proteínas; aunque ambas cianobacterias estaban en la

misma fase de crecimiento, pero presentan variaciones propias de su desarrollo y velocidad de crecimiento. Se evidencia en la cepa 24 A una mayor concentración de pigmento fotosintético que para CAAT 2005-3; y en cambio esta última resultó con mayor valor de proteínas dado que sus células, aunque fueron lavadas les puede haber quedó parte de la capa de mucílago que producen.



Figura 3.7: Tratamiento térmico a 35 ° C a concentrados de las cepas CAAT 2005-3 y 24 A, y sus controles a 26 ° C por 1 hora. A: Clorofila a. B: Proteínas totales. M \pm SD, n=3.

Del análisis del perfil toxicológico de las muestras intracelulares de la cepa CAAT 2005-3 por el tratamiento térmico se encontraron además de la [D-Leu¹] MC-LR, aumento de otras variantes de MC. Las mismas se muestran en las corridas cromatográficas saliendo antes y posterior a [D-Leu¹] MC-LR (Fig. 3.8), como picos con espectros de absorción que eran equivalentes a las de MCs. Aunque sin que se pudieran identificar químicamente, tanto en el control como a 35 °C.



Figura 3.8: Cromatograma de una muestra de la cepa de CAAT 2005-3 expuesta a 35 °C. Se indican entre flechas rojas los picos correspondientes a las variantes de MCs encontradas, el pico más alto es de [D-Leu¹] MC-LR.

Se analizó el contenido total de MCs (todas las variantes detectadas por HPLC DAD) y la variante [D-Leu¹] MC-LR por separado; como se observa en la figura 3.9. Con la exposición a 35 °C sobre el paquete celular se pudo observar un aumento significativo de μ g de MC totales respecto de lo que ocurrió a 26 °C (control). En cambio, para la fracción de [D-Leu¹] MC-LR intracelular por estrés térmico no se encontraron variaciones significativas, y por lo tanto resultó no ser la responsable del incremento de la fracción total de MCs.



Figura 3.9: Contenido en μ g de MCt (totales) y [D-Leu¹] MC-LR; para la exposición del paquete celular de CAAT 2005-3 a 35 ° y 26 °C (control). M±SD, n=3. El * indica resultados significativamente diferentes al control correspondiente (p < 0,05).

La cepa CAAT 2005-3 respondió de la misma manera cuando se la trató a varias temperaturas como fue a 23 °, 26 ° (utilizado como control) y 29 °C, en un estudio que involucró cultivos en batch y con análisis por varios días en fase exponencial. El mismo fue publicado: "Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress" (Giannuzzi y col., 2016). En dicho trabajo la tasa de crecimiento exponencial fue significativamente mayor a la temperatura de 29 °C en comparación con 23 °C y el control. Del análisis por LC MS / MS se determinaron cinco MCs (Fig. 3.10, obtenida de la publicación), y se encontró que las variantes menos abundantes fueron las que más aportaron a las MCs totales a medida que era mayor la temperatura de experimentación.



Figura 3.10: Imagen cinco fracciones iónicas determinadas por LC-MS/MS (4000 Q Trap, AB-SCIEX, Darmstadt, Germany en muestras a 29 °C, del trabajo "Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress" (Giannuzzi y col., 2016).

Como dato interesante, se adjunta que algunas de las variantes de MCs publicadas en Giannuzzi y colaboradores (2016), como ser $[Leu^1, Asp^7]MC-LR$, $[Leu^1, Glu(OCH_3)^6]MC-LR$ y $[M(O)^1]MC-LR$ también fueron encontradas dentro de las obtenidas en el capítulo *1* de resultados sección *1*.4.3 (publicación realizada en colaboración con Qi (2015)), cuando se trabajó con un extracto denso de la cepa CAAT 2005-3).

Por otro lado, como se indicó en la sección 3.2.1, la cepa 24 A no mostró presencia de picos de MCs en las corridas cromatográficas tanto del control como en la exposición térmica.

3.2.3: Exposición a MC-LR

Se siguió el protocolo 4.4.2 sobre CAAT 2005-3 y 24 A, y se agregó una dosis de MC-LR a una concentración final de 8 ppm ($32 \mu g$). Los controles se obtuvieron de adicionar igual volumen con medio fresco estéril. Tanto los paquetes celulares expuestos como los controles pertenecían a las fases exponenciales tardías de ambas cepas.

El tratamiento fue una hora con agitación horizontal suave y bajo las condiciones de laboratorio descriptas en la 3.2.2. Luego de este tiempo se separó por centrifugación el pellet (paquete celular) del sobrenadante. Del pellet de cada cepa se obtuvo el perfil toxicológico intracelular y del sobrenadante, la correspondiente caracterización toxicológica extracelular.

En el caso de la cepa 24 A inmediatamente al agregado de la toxina se centrifugó debido a cambios en la coloración de las muestras correspondientes a ficocianinas presentes y por lo que la mayoría de las células de *Microcystis aeruginosa* se habían lisado (Fig. *3*.11).



Figura 3.11: Foto de una muestra de la cepa 24 A, inmediatamente después de adicionada la toxina MC-LR, en la que se observa lisis masiva del cultivo. La muestra fue previamente centrifugada.

El efecto de lisis producido sobre el paquete celular de la cepa 24 A impidió el análisis de las muestras extracelulares e intracelulares en la determinación de perfiles toxicológicos al tiempo del experimento propuesto.

En cambio, para CAAT 2005-3 se obtuvieron resultados de las MCs a la hora de exposición y se indican en la tabla 3.1. En los compartimientos extracelulares e intracelulares, las fracciones de MC-LR y [D-Leu¹] MC-LR fueron las variantes de mayor concentración detectadas por HPLC DAD.

Para el compartimiento **extracelular** luego de la exposición se encontraron las variantes de MC-LR y [D-Leu¹] MC-LR. Esta última toxina en valores bajos y no significativos. En cambio, para el control no se observó ninguna de las dos variantes de MCs. En tanto en el espacio **intracelular** de las células tratadas aparecieron ambas variantes de MC. Solo la [D-Leu¹] MC-LR en el control. Además, el contenido de esta molécula de MC resultó en el paquete celular tratado en cantidad significativamente mayor respecto del control.

Compartimientos	Variante de MC	Control	Tratada con 8 ppm de MC-LR (32 μg)
Fytracelular	μg MC-LR	0	21,0±1,4
BAUACCIUIAI	μg [D-Leu ¹] MC-LR	0	1,3±0,8
Intracelular	μg MC-LR	0	2,0±0,4
	μg [D-Leu ¹] MC-LR	23,6±1,9	29,1±1,1*

Tabla 3.1 Resultados de los perfiles toxicológicos de CAAT 2005-3, obtenidos de las muestras control y tratadas con 8 ppm de MC-LR; tanto de los compartimientos intracelulares como los extracelulares. $M\pm$ SD, n=3. El * indica resultados significativamente diferentes al control correspondiente (p < 0,05).

Para analizar la distribución y dinámica de las variantes de MCs entre los compartimientos se realizó un esquema (Fig. 3.12) con los valores medios que aparecen en la tabla 3.1.



Figura 3.12: Esquema explicativo propuesto de una célula de *M. aeruginosa* y su entorno luego de una hora de exposición a MC-LR. Se indican los valores medios de las MCs extracelulares (Extra) e intracelulares (Intra) de las muestras control y tratadas con 8 ppm de MC-LR, en el cuadro gris la cantidad de toxina adicionada a tiempo cero. La figura en naranja representa la posibilidad de transporte de las moléculas de MCs a través de la membrana.

De esta representación de la célula de cianobacteria, se encuentra que para la exposición de 32 μ g de **MC-LR** sobre CAAT 2005-3 a tiempo cero; luego de una hora de exposición, se observaron 21,0 μ g de MC-LR en el espacio extracelular. Lo que equivale a un 65 % de lo agregado en el espacio extracelular al inicio del tratamiento. En tanto que se encontró dentro de las células tratadas alrededor de un 6% (lo que en cantidad es 2 μ g de MC-LR). Con lo cual la recuperación total de la variante de MC-LR en ambos compartimientos intracelulares y extracelulares fue de un 71 % y con una disminución neta del 29 % respecto inicial adicionado.

En cambio, para cuando se analizó el contenido de **[D-Leu¹] MC-LR** en los espacios dentro y fuera de las células, se encontró en relación a los 23,6 μ g de esta variante intracelular del control, un aumento a 29,1 μ g lo que equivale a un incremento del 23 % en el compartimiento intracelular del paquete celular expuesto. En el espacio extracelular no se observaron cambios significativos. Por lo que, para esta molécula de MC, se llegó a obtener alrededor de 28 % por encima del control, en las células tratadas con MC-LR.

Los cambios en la repartición de MCs para la cepa CAAT 2005-3 entre el espacio extracelular e intracelular posterior a la exposición de MC-LR, indican movimiento de las moléculas de MC a través de las membranas celulares como también posibles modificaciones químicas. Sin embargo, para la cepa 24 A el fenómeno observado fue muy diferente e involucró la lisis celular inmediata, que da indicios de las variaciones en el comportamiento de una cepa productora de toxina en comparación a una no productora y/o como se enfrentan cada una al ambiente circundante. Este fenómeno de lisis celular ya había sido expuesto en el trabajo de Schatz y colaboradores (2007).

3.3: Discusión

Las cianobacterias presentan una gran diversidad de células de distinto tamaño y morfología; pudiendo encontrarse especies unicelulares, filamentosas, y/o ramificadas, o formando colonias con diferente grado de complejidad. Algunas de las cianobacterias filamentosas tienen características particulares de diferenciación celular, y señales internas, externas y de comunicación entre las células de un filamento. Las que adoptan un desarrollo colonial, poseen estrategias inherentes para reducir el daño provocado por factores adversos, dada su constitución poblacional.

La toxicidad del H₂O₂ para el fitoplancton se atribuye principalmente a la producción de radical hidroxilo que destruyen la integridad de la membrana celular (Mikula y col., 2012) y pueden dañar el aparato fotosintético inhibiendo así la transferencia de electrones fotosintéticos (Barrington y Ghadouani, 2008).

El comportamiento de la cepa CAAT 2005-3 en comparación con otra cepa de M. *aeruginosa* ATCC (no productora de toxina) y una de *Arthrospira máxima*, mostró algunas diferencias en la exposición a peróxido de hidrógeno. Las tres cianobacterias respondieron en su fase exponencial mostrando tolerancia al oxidante a las 3 horas de exposición. En cambio, a los demás tiempos se observaron comportamientos de aumentos marcados de clorosis con el incremento de la dosis de H₂O₂; y variaciones en el modo de evolución dependiendo de la cianobacteria y sus características morfológicas. En un estudio realizado por Yang y colaboradores (2018) en donde se evaluó la efectividad del H₂O₂ en el fitoplancton toxigénico, en varios cultivos de cianobacterias filamentosas (*Anabaena*, *Cylindrospermopsis* y *Planktothrix*) y una unicelular (*Microcystis*) en un experimento de laboratorio y de campo, dominado por *Planktothrix* y *Microcystis*, encontraron que en el estudio de laboratorio las cianobacterias disminuyeron la eficiencia cuántica de los cultivos inmediatamente después de la adición del oxidante. También observaron que *Microcystis* generó una resistencia notablemente mayor a H₂O₂ que las otras cianobacterias filamentosas probados tanto en laboratorio como en campo. Este mismo comportamiento se observó para 0,3 mM de oxidante y a las 24 horas; como también ocurre para 15 mM a las 3 horas de tratamiento. Por el contrario, en general la cepa CAAT 2005-3 se mostró con mayor sensibilidad a la exposición al peróxido de hidrogeno que la cianobacteria filamentosa *A. máxima*, cuando se trabajó a las 24 y 48 horas.

Cuando analizamos los comportamientos entre las dos cepas de M. aeruginosa, la ATCC se mostró a lo largo del tiempo menos afectada que la CAAT 2005-3, que es productora de toxina. Esta misma respuesta la obtuvieron Schuurmans y colaboradores (2018) que trabajaron sobre tres cepas de Microcystis (una productora de toxina, una mutada para no producir toxina y una no productora natural). Encontraron que la cepa productora de MC resultó menos preparada para altos niveles de estrés oxidativo y más afectadas por la adición de H₂O₂ que las cepas no tóxicas. Al inicio las tres cepas dejaron de crecer tras la adición de H₂O₂, pero la cepa no tóxica y el mutante no tóxico degradaron rápidamente el H₂O₂ añadido y luego se recuperaron, mientras que la cepa tóxica no degradó el H₂O₂ y no se recuperó. También observaron que antes de la adición de H₂O₂, la expresión génica de una tiorredoxina y una peroxirredoxina era mucho menor en la cepa tóxica que en su mutante no tóxico. Por lo que sugieren que tanto la tiorredoxina como la peroxiredoxina están implicadas en la degradación del H2O2 y la MC puede potencialmente suprimir su actividad. Sin embargo, Dziallas y Grossart (2011) encontraron que la toxicidad del H2O2 a las cepas tóxicas de Microcystis es significativamente más baja que una cepa mutada no tóxicas y las MCs pueden jugar un papel en la estabilización del aparato fotosintético y mejoran la aptitud de las cepas productoras de toxinas bajo estrés oxidativo (Phelan y Downing, 2011; Zilliges y col., 2011).

Las controversias encontradas en cuanto a si la producción de MCs es favorable o no en las cianobacterias, implican la necesidad de seguir estudiando si las diferencias en la capacidad de producir metabolitos secundarios tóxicos, como la MC, son responsables de la variación en la resistencia observada al H₂O₂. En particular, se requiere de más estudios para entender como la MC podría participar de diferentes fenómenos frente al estrés oxidativo. En donde por un lado cuando la célula no es afectada en su integridad, la MC actúa intracelularmente; y, por otro lado, cuando el estrés oxidativo supera determinado umbral se desencadenan fenómenos que afectan a la célula toxica con la consiguiente disminución de MC; tal como se describió en el capítulo anterior.

Aunque no pudimos encontrar una dependencia de *M. aeruginosa* con la producción de MC cuando se exponen las células a peróxido de hidrogeno; se buscó avanzar determinando como fue la respuesta de CAAT 2005-3 frente al estrés térmico respecto de otra cepa no productora de toxinas (24 A).

En nuestro estudio al tratar dos cepas de *Microcystis aeruginosa* una productora de toxinas, (CAAT 2005-3) y otra no productora (24 A), no se encontraron diferencias cuando se analizaron los resultados del tratamiento térmico, en la concentración de clorofila a y proteínas totales, respecto de sus controles. Sin embargo, en varias publicaciones de cepas productoras de toxinas y no productoras se indican diferencias a favor de las primeras, en cuanto a la cantidad de pigmentos fotosintéticos como también en el metabolismo de proteínas intracelulares (Dittmann y col., 1997; Hesse y col., 2001; Zilliges y col., 2011). Asimismo, a medida que cambia el clima global, se espera que las floraciones de cianobacterias tóxicas aumenten (Michalak y col., 2013; Paerl y Huisman, 2009). Sin embargo, para Neilan y colaboradores (2012) ni las cepas tóxicas ni las no tóxicas poseen una aptitud generalmente superior; más bien, representan diferentes ecotipos, en donde cada una tiene una ventaja de aptitud física en diferentes condiciones.

Respecto del perfil toxicológico intracelular de la cepa CAAT 2005-3 encontrado en el tratamiento térmico, se observó un aumento significativo en la cantidad de MCs totales en la cepa CAAT 2005-3, aunque sin incrementos de la variante [D-Leu¹] MC-LR. Estos mismos resultados de incrementos de variantes de MCs en condiciones de alta temperatura de exposición, fueron también reportados por Giannuzzi y colaboradores en 2016. Además, en un estudio realizado por Brutemark y colaboradores (2015) sobre *Dolichospermum spp.*, se encontró que la tasa de crecimiento y la concentración de toxina

intracelular aumentaron significativamente como respuesta a la temperatura, aun cuando había incremento del estrés oxidativo. En concordancia con lo expuesto previamente en el capítulo anterior, es que se vuelve a observar que las células de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 en condiciones de estrés oxidativo, en particular aquí por un tratamiento térmico, responden aumentando la concentración de MCs totales.

Aunque no se pudo identificar las otras variantes de MC incluidas dentro las de MCs totales, su incremento indicaría un cambio en la percepción de las células de cianobacterias al estrés térmico recibido. Este resultado se puede contrastar con el trabajo de Briand y colaboradores (2016), en el que se consideró que la producción de una variedad de péptidos (metabolitos secundarios) con funciones intercambiables o complementarias puede proporcionar a las cianobacterias una ventaja competitiva en un entorno variable a través de interacciones inter e intraespecíficas. En su trabajo se encontraron cambios en la concentración relativa intracelular de varios cianopéptidos en condiciones de mono y co-cultivo entre cepas productoras de toxinas y no productoras. Por lo tanto, aunque no se conoce la vía que lleva a que la célula de cianobacteria pueda percibir los cambios en su entorno, las variaciones cualitativas y cuantitativas de MCs podrían indicar su participación en interacciones intraespecíficas.

Posteriormente cuando se analizó el comportamiento por el agregado de MC-LR (8 ppm) a las cepas 24 A y CAAT 2005-3, se observaron diferencias muy importantes entre las mismas. En la cepa 24 A no productora de toxinas, se observó una lisis masiva del paquete celular y; en la CAAT 2005-3, cepa productora de toxinas, se observó un perfil toxicológico intracelular con aumento de la cantidad de [D-Leu¹] MC-LR respecto del control. Se puede sugerir que la MC podría actuar como un aleloquímico, dado que la alelopatía juega un papel importante en la comunicación intraespecífica, aptitud invasiva, competencia de recursos e interferencia, sucesión ecológica y formación de florecimientos (Chia y col., 2018). Además, se conocen diversos trabajos de interacciones alelopáticas entre diferentes especies de cianobacterias (Chia y col., 2018; Legrand y col., 2003) en donde cepas tóxicas y no tóxicas revelan respuestas específicas en situaciones condicionadas por recursos de nutrientes. Por todo esto, es que el efecto generado por la presencia de la molécula de MC-LR sobre la cepa 24 A, no productora, es contrario al obtenido en CAAT 2005-3; en que la primera cepa es afectada negativamente y por lo tanto se daría un efecto de competencia. En cambio, en la cepa CAAT 2005-3 se muestra un fenómeno de retroalimentación al aumentar el contenido intracelular de [D-Leu¹] MC-LR, y por lo tanto tendría un efecto beneficioso.

Estos resultados también se encontraron en las publicaciones de Schatz y colaboradores (2005, 2007), tanto en el fenómeno de lisis de células de *Microcystis* (pertenecientes a cepas no productoras de toxinas); como en el aumento de la producción de MCs, cuando se adiciono MC-LR y otros péptidos liberados de extractos (obtenidos de lisis de células de *Microcystis*, libres de células enteras) sobre cepas productoras de toxinas) et extracta la lisis de una fracción de la población de *Microcystis* debido a la liberación de péptidos no ribosómicos. Las células restantes responden elevando su capacidad para producir MCs, mejorando así su aptitud en su nicho ecológico, debido a su toxicidad. Una respuesta diferente, sin embargo, se obtuvo en el capítulo 2 (Resultados) cuando se observó disminución de MC frente a la exposición de una adición de extractos celulares (II) de otro cultivo, aunque correspondiente a un estadio más avanzado de la curva de crecimiento. Por lo tanto, nuevamente no se puede llegar a determinar cuál o cuáles son las condiciones específicas de aumento de toxina intracelular.

Existen numerosos estudios con la finalidad de determinar las condiciones ambientales favorecen el metabolismo de las MCs. Entre ellos, Wiedner y colaboradores (2003) postularon que las MC se liberan de las células de *Microcystis*, en particular por encima de un umbral crítico luz. Además, el transporte de las MCs a través de la membrana interna de cianobacterias puede ser mediado por la actividad de McyH, que muestra homología con el transportador ABC. Sin embargo, la falta de expresión del gen correspondiente a *mcy* H, conduce a una pérdida completa de la producción de toxinas (Pearson y col., 2004) y por lo tanto estos mutantes no se podrían utilizar para estudiar el impacto de McyH en el nivel de MC intracelular o evaluar un papel específico en la detección de MC extracelular. Razón por la cual, no se podría explicar las distribuciones de toxinas en los espacios intracelular y extracelular a la hora de tratamiento.

En busca de encontrarle una función a la MC, es que Vassilakaki y Pflugmacher (2008) evaluaron si las MCs podrían usarse como mediadores para la comunicación entre cianobacterias, a través de la promoción del estrés oxidativo. Para ello expusieron *Synechocystis spp.* a MC-LR y a extractos crudos provenientes de *M. aeruginosa* productora de toxina. La promoción de estrés oxidativo en las células de la cianobacteria

en estudio, se observó con la exposición a MCs. En plantas superiores, las especies reactivas de oxígeno (ROS) forman parte de una vía de señalización interna celular (Fluhr y col., 2005; Gechev y col., 2006) pero están bajo el control de un sistema antioxidante elucidado (Ryals, 1996), que consiste en pequeñas moléculas como tocoferoles, ascorbato o glutatión, y enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, peroxidasa, glutatión transferasa y glutation reductasa. Además, muchas bacterias producen moléculas de señalización y se liberan al medio ambiente para comunicarse con otras bacterias (Cámara y col., 2002). Se podría sugerir la posibilidad de que las moléculas de MCs actuaran como mensajeros extracelulares sobre las células de cianobacterias productoras de toxinas, en la transmisión de información del entorno; en desencadenar cambios en el estado oxidativo intracelular como también el aumento neto en la producción de MCs intracelulares.

La función aleloquímica de las MCs se propone frente a cepas no productoras de toxinas, en las que el efecto oxidativo podría ser responsable de su lisis. Para esta última sugerencia se requieren de más estudios que permitan explicar la lisis celular ocurrida en la cepa no productora de toxinas, como también analizar modificaciones del metabolismo intracelular de las MCs, y el transporte de las mismas a través de las membranas citoplasmáticas, en las cepas productoras de toxinas.



4.- Análisis de perfiles toxicológicos de *Microcystis* aeruginosa CAAT 2005-3 por el agregado de MC-LR Encontradas situaciones de estrés térmico y de exposición a MC-LR sobre las células de CAAT 2005-3, en donde como resultado se obtuvieron alteraciones de los perfiles toxicológicos intracelular, se plantea la necesidad de estudiar:

-cómo es la distribución de las variantes de toxinas a ambos lados de la envoltura de la célula de *M. aeruginosa* cuando se exponen a diferentes concentraciones de MC-LR;

-y si existe alguna dependencia con el tiempo de exposición.

*4.*1: Evaluación de la respuesta toxicológica de la cepa CAAT 2005-3 por tratamientos con varias concentraciones de MC-LR

Habiendo encontrado una respuesta en los perfiles toxicológicos intracelulares y extracelulares en las células de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 en la exposición de 8 ppm de MC-LR (sección 3.2.3), se buscó determinar si había algún mecanismo o cinética de transporte a través de la membrana celular. Como también conocer el comportamiento de los perfiles de MCs cuando se da la exposición a otras dosis de MC-LR.

4.1.1: Exposición de 15 ppm de MC-LR sobre CAAT 2005-3

Siguiendo el mismo modelo de ensayo que en la sección 3.2.2 se adicionó una concentración alta de toxina de 15 ppm finales de MC-LR a paquetes celulares de CAAT 2005-3 (tratadas) y los controles correspondientes. Se analizaron las MCs extracelulares e intracelulares a 30, 60 y 120 min para las tratadas y a 0 y 120 min para los controles.

Los resultados obtenidos de los perfiles toxicológicos de las muestras provenientes de ambos compartimientos (intracelular y extracelular) y detectadas por HPLC, se muestran en la tabla 4.1. Cabe aclarar que MC-LR y [D-Leu¹] MC-LR son las variantes mayoritarias encontradas en esta exposición.

Compartimientos		Control		Tratada con15ppm MC-LR (60 μg)		
	Tiempo	0	120 min	30 min	60 min	120 min
Extracelular	μg MC-LR	0	0	28,4±2,3	33,5±2,6	36,2±2,3
	μg [D-Leu ¹] MC-LR	0	0	6,6±1,0*	10,2±1,5*	8,1±2,0*
Intracelular	μg MC-LR	0	0,2±0,1	2,6±0,5*	2,3±0,2*	4,0±1,0*
	μg [D-Leu ¹] MC-LR	20,2±1,1	21,4±1,7	31,6±3,0*	30,7±0,8*	31,4±1,0*

Tabla 4.1: Perfiles toxicológicos obtenidos de la exposición a 15 ppm de MC-LR a los 30, 60 y 120 minutos. Además, se señalizan en diferentes grises las dos variantes de MCs más importantes encontradas. M \pm SD, n=3. El * indica resultados significativamente diferentes al control correspondiente (p < 0,05).

Se observa con respecto al control, la presencia de las moléculas de MC-LR (agregada) y $[D-Leu^1]$ MC-LR en el espacio **extracelular** en las células tratadas. La primera variante se encontró con tendencia levemente creciente desde 28,4 a 36,2 µg, a los 30 y 120 minutos respectivamente. Para la toxina $[D-Leu^1]$ MC-LR en el espacio extracelular se mostraron cambios en el tiempo de exposición, respecto de lo que ocurrió con el control. Encontrándose valores de entre 6,6 a 10,2 µg.

En cuanto a lo que se encontró en el compartimiento **intracelular** en las muestras con tratamiento, se observó un incremento significativo de la fracción [D-Leu¹] MC-LR para cada uno de los tiempos de 30, 60 y 120 minutos respecto de los controles a 0 y 120 minutos. Los valores alcanzados en los paquetes celulares tratados, sin embargo, no mostraron cambios marcados entre sí siendo de entre 30,7 a 31,6 μ g. Para la variante de MC-LR a nivel intracelular y los tres tiempos, se mostraron cantidades de entre 2,6 a 4,0 μ g en las células tratadas. Resultando estos valores marcadamente diferentes a lo que se observó con los controles.

En la figura 4.1 se muestran todos los resultados promedios de las variantes de MCs, integrados dentro de un esquema propuesto de distribución.

A partir del mismo se analizaron en el tiempo las distribuciones entre los espacios extracelulares e intracelulares para **MC-LR**, habiendo agregado 60 μ g a tiempo cero al paquete celular. Se encontró que para entre los 30 y 120 minutos se recuperó alrededor del 47 al 60 % de la cantidad adicionada de MC-LR respecto de la inicial, en el compartimiento extracelular. En el intracelular de entre el 4 y 7 % respectivamente en relación a lo agregado. Por lo tanto, en suma, nos brindó la recuperación de un valor de entre el 51 al 67 % de la MC-LR de la agregada, en el lapso de los 120 minutos de exposición.

Para **[D-Leu¹] MC-LR** la situación fue diferente en el espacio extracelular respecto del control. En donde apareció en las muestras extracelulares tratadas entre un 32 a 49 % del contenido en el lapso de los 120 minutos de tratamiento, en relación al contenido encontrado de esta MC dentro de las células control. En el interior de las células expuestas se encontró alrededor de un 50 % más del control intracelular en todos los tiempos. Por ello se observa que se recupera de un 72 a 99 % más de esta variante por encima del control en el espacio extracelular e intracelular, y por ende se obtiene un aumento neto de la cantidad de esta variante de MC.

Con ambas MCs estudiadas en el tiempo de 120 minutos y en los compartimientos extracelular e intracelular, se vuelve a encontrar la posibilidad de difusión tanto de la MC-LR hacia dentro de la célula como de [D-Leu¹] MC-LR hacia el exterior celular. Aunque este intercambio de toxinas no respondió al tiempo de exposición estudiado.



Figura 4.1: Esquema propuesto de una célula de *M. aeruginosa* y su entorno a la exposición a MC-LR. Se indican los valores medios de las MCs extracelulares (Extra) e intracelulares (Intra) de las muestras control y tratadas con 15 ppm de MC-LR, a los tiempos de 30, 60 y 120 minutos. En el cuadro gris se señala la cantidad de toxina adicionada a tiempo cero. El círculo naranja representa la posibilidad de transporte de las moléculas de MCs a través de la membrana.

Si se compara lo que ocurre en la sección 3.2.2 (capítulo 3, de resultados) a la hora de exposición a 32 μ g de MC-LR (tratamiento de 8 ppm), con lo observado en este apartado al mismo tiempo, pero con el agregado de 60 μ g de toxina (15ppm); se observan variaciones en las cantidades de las variantes de toxinas en el espacio intracelular y extracelular.

Las células de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 respondieron a ambos tratamientos con un perfil toxicológico intracelular similar, aunque la variante [D-Leu¹] MC-LR se
incrementa de un 23 % a 43 % por encima del control, para 8 y 15 ppm de exposición respectivamente. Además, se encontró alrededor de un 4 % de MC-LR intracelular en la exposición a 15 ppm, y de 6 % para 8ppm. Por otro lado, en el espacio extracelular, también se encontraron las dos variantes, siendo para MC-LR un 58 % con el tratamiento de 15 ppm y de 65 % para 8 ppm. Una diferencia marcada se observó en la [D-Leu¹] MC-LR extracelular en la exposición a 15 ppm, siendo de un 48 % respecto del control; en cambio para la dosis de 8 ppm no se detectó una cantidad significativa de la misma MC.

Por lo señalado en los resultados obtenidos, se evidencia que hay sobre [D-Leu¹] MC-LR intracelular un efecto de acumulación, que podría tener cierta dependencia con la concentración de toxina expuesta de MC-LR. Es por ello que en el apartado siguiente se consideraron las exposiciones a las dosis de 5 y 10 ppm de MC-LR.

4.1.2: Exposición de concentraciones de 5 y 10 ppm MC-LR sobre CAAT 2005-3

Sobre el mismo modelo de la sección anterior se consideró la adición de MC-LR alcanzando las dosis finales de 5 y 10 ppm a los concentrados celulares de la cepa CAAT 2005-3. A la hora de exposición se estudiaron las variantes de MCs provenientes del exterior e interior de la célula.

Los resultados de los perfiles toxicológicos para las distintas situaciones se muestran en la tabla *4*.2.

Compartimientos	Variante de MC	Control	Tratada con 5 ppm MC-LR (20 μg)	Tratada con 10 ppm MC-LR (40 μg)
Extracelular	μg MC-LR	0	15,4±1,2	30,0±2,8
	μg [D-Leu ¹] MC-LR	0	0	0,5±0,3
Intracelular	μg MC-LR	0	0	1,1±0,3

μg [D-Leu ¹] MC-LR	22,8±1,8	23,3±2,3	31,6±2,5*
-----------------------------------	----------	----------	-----------

Tabla 4.2: Resultados de los perfiles toxicológicos obtenidos de las exposiciones a 5 y 10 ppm de MC-LR a paquetes celulares de CAAT 2005-3, luego de una hora de tratamiento. M \pm SD, n=3. El * indica resultados significativamente diferentes al control correspondiente (p < 0,05).

En el compartimiento **extracelular** se encontraron para la exposición a 5 ppm de MC solo la presencia de la MC-LR en 15,4 μ g. En cambio, para cuando se trató con 10 ppm de MC se observaron las variantes de MC-LR con el doble de cantidad que para la dosis más baja de tratamiento y la [D-Leu¹] MC-LR, aunque esta última en valor muy bajo.

Para el espacio **intracelular** de las células de CAAT 2005-3 tratadas se observó con 5 ppm de MC- LR solo la presencia de [D-Leu¹] MC-LR con 23,3 μ g; resultando sin cambios respecto del control. En tanto para 10 ppm de exposición de MC, a la hora de exposición se encontraron las fracciones de 1,1 μ g de MC-LR y se diferencia en que no es observada en el control intracelular; y de 31,6 μ g de [D-Leu¹] MC-LR con incremento significativo en relación al control.

En la siguiente figura 4.2 se integran los datos de los perfiles toxicológicos obtenidos para las concentraciones de 5 y 10 ppm de MC-LR expuestas.

En la misma se observa que la distribución de la variante **MC- LR** fue en la exposición a 5 ppm o 20 μ g de MC-LR, luego de una hora de un 77 % en el ambiente extracelular y sin que se encuentre en el espacio intracelular. Para el caso del tratamiento con 10 ppm o 40 μ g de MC-LR, se obtuvo una recuperación del 75 % en el compartimiento extracelular y algo en el intracelular de alrededor un 3 %. Por tanto, con ambas dosis de MC-LR de 5 y 10 ppm adicionada, lo que se recuperó a la hora fue sin variaciones entre sí a pesar ser el doble de cantidad de MC expuesta.



Figura 4.2: Esquema de una célula de *M. aeruginosa* y su entorno luego de una hora de exposición a MC-LR. Se indican los valores medios de las MCs extracelulares (Extra) e intracelulares (Intra) de las muestras control y tratadas con 5 y 10 ppm de MC-LR, en el cuadro gris las cantidades de toxina adicionada a tiempo cero. El círculo naranja representa la posibilidad de transporte de las moléculas de MCs a través de la membrana.

La **[D-Leu¹] MC-LR** mostró cambios a nivel intracelular y con aumentos marcados del 38 % por encima del control solo para la exposición de 10 ppm; y en el entorno extracelular se encontró un 2 %.

En el caso del tratamiento de exposición a 10 ppm de MC-LR, se observa la misma respuesta de distribución de las dos variantes de MCs que cuando se estudió con 8 ppm, tal como se describió en el apartado *3.2.2*. Es por ello que frente a este comportamiento se buscó saber si hay un fenómeno de variación del estado oxidativo de la célula entre las

concentraciones de 5 y 10 ppm de MC-LR adicionadas, y que sea indicativo del cambio de distribución de las moléculas de MCs.

Por ello en la figura 4.3 se exponen los resultados de los tratamientos a 5 y 10 ppm de MC-LR, de la actividad específica de CAT y la extensión de la peroxidación lipídica en las células de CAAT 2005-3 a la hora de exposición, además del control.



Figura 4.3: Gráficos de barras de la actividad específica de CAT (A) y el contenido de MDA (B) luego de una hora de exposición a las 5 y 10 ppm de MC-LR, sobre paquetes celulares de CAAT 2005-3. $M\pm$ SD, n=3. El * indica diferencias significativas respecto del control.

La actividad específica de CAT observada no mostró cambios para la exposición a 5 ppm de MC-LR sobre las células de CAAT 2005-3 ni tampoco en los valores TBARS respecto del control. Por lo tanto, a esta dosis de exposición no se indican cambios en el estado oxidativo de la célula.

En tanto para 10 ppm de tratamiento luego de una hora, se observó un aumento significativo de CAT, aunque sin variaciones en el contenido de TBARS. En el que además a nivel intracelular se observaron cambios con aumentos significativos tanto de [D-Leu¹] MC-LR. Esto vuelve a indicar tal como en capítulos anteriores, que frente a un entorno que genera un desbalance del estado oxidativo celular, la molécula de MC responde aumentando su concentración.

4.2: Comparación de los distintos agregados de MC-LR

En este apartado se busca comprender en su conjunto, cómo es la dinámica de distribución de las toxinas de MC-LR y [D-Leu¹] MC-LR en los espacios intracelular y extracelular. Para ello, se procedió a la integración de los perfiles toxicológicos en la tabla *4*.3.

		MC-LR (ppm)				
		5 (20 µg)	8 (32 µg)	10 (40 µg)	15 (60 µg)	
Extracelular	μg MC-LR	15,4±1,2	21,0±1,4	30,0±2,8	33,5±2,6	
	μg [D-Leu ¹] MC-LR	0	1,3±0,8	0,5±0,3	10,2±1,5	
Intracelular	μg MC-LR	0	2,0±0,4	1,1±0,3	2,3±0,2*	
	μg [D-Leu ¹] MC-LR	23,3±2,3	29,1±1,1*	31,6±2,5*	30,7±0,8*	
Control intracelular	μg [D-Leu ¹] MC-LR	22,8±1,8	23,6±1,9	22,8±1,8	21,4±1,7 ⁽¹⁾	

Tabla 4.3: Cantidades de MCs obtenidas en los distintos estudios con agregados de MC-LR a la hora de exposición sobre paquete celulares concentrados de CAAT 2005-3. A partir de los perfiles toxicológicos extra e intracelulares se determinaron las cantidades de toxinas, expresadas en ug. M \pm SD, n=3. El * indica diferencias significativas respecto del control. En el control intracelular de 15 ppm se referencia (1), al valor de toxina a los 120 minutos.

En la misma se observa como es la evolución de las variantes de toxinas encontradas mayoritariamente en función del aumento de MC-LR adicionada, a ambos lados de la envoltura de la célula de cianobacteria. En la última fila se indican los valores de toxina intracelular de los controles para cada uno de los ensayos realizados.

Se encuentra que para 5 ppm de MC-LR agregada no hay cambios en los perfiles toxicológicos. Sin embargo, por encima de esta dosis, sí es notorio como la toxina [D-Leu¹] MC-LR se mantiene alta y con tendencia salir al exterior de la célula, como se evidencia en 15 ppm. Por el contrario, la molécula de MC-LR muestra un movimiento de ingreso a la célula de cianobacteria, aunque sin poder llegar a observar una dependencia con la dosis de MC-LR adicionada.

4.3: Discusión

En el capítulo de resultados (capítulos 1 y 2) se realizó la caracterización toxicológica de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3 y se observaron respuestas de aumento o disminución de la concentración de [D-Leu¹] MC-LR en la cepa en estudio, obtenidas en la exposición a agentes estresores y fracciones de otro cultivo de la misma cepa.

Las poblaciones naturales de cianobacterias están vinculadas por múltiples interacciones entre sí y con su entorno. La producción de sustancias extracelulares y cianotoxinas ilustra la naturaleza diversa de sus interacciones con otros organismos, entre ellas la alelopática (Rizvi y col., 1992). Para Legrand y colaboradores (2003), la alelopatía es una parte importante de competencia del fitoplancton, en donde los efectos inhibidores de los metabolitos secundarios producidos por una especie, actúan sobre el crecimiento o la función fisiológica de otra especie. Además, según Neilan y colaboradores (2012) hay una creciente evidencia de que metabolitos secundarios desempeñan un papel importante en la conformación de la composición de la comunidad fitoplanctónica a través de interacciones inter e intraespecies, aunque en su mayor parte, su papel biológico, modo de acción, y la regulación de su producción, son poco conocidos.

En el ensayo realizado de exposición una concentración de 15 ppm de MC-LR sobre las células de la cepa CAAT 2005-3, se confirma lo que previamente se había establecido en el capítulo *3*, cuando se realizó el tratamiento a 8 ppm de MC-LR. Así se observó para las dos variantes en el espacio intracelular.

Aunque no se encontró un fenómeno de cambio gradual en el tiempo de las dos variantes de MC (MC-LR y [D-Leu¹] MC-LR) en los espacios extra e intracelular, sí se observó la presencia de ambas toxinas en los dos compartimientos. El incremento de la fracción de [D-Leu¹] MC-LR (intracelular y extracelular) en un rango entre 72 y 99 % más que lo que se determinó en los controles correspondientes, podría deberse a un aumento de la fracción de MC libre intracelular. Tal como lo consideran Pearson y colaboradores (2016), que interpretan que la discrepancia observada con frecuencia entre el nivel de producción de toxina determinada y el nivel de transcripción de los genes de biosíntesis subyacentes

puede atribuirse al hecho de que el exceso de MC se une inmediatamente a las proteínas. Por ello, cuando se tiene en cuenta la porción unida a proteínas, como en el trabajo de (Meissner y col., 2013), se pudo mostrar un aumento neto en la producción de MC bajo mucha luz y que no se observó cuando solo se estaba evaluando la porción extraíble de MC. Por lo tanto, el aumento importante intracelular de la variante que produce la cepa en estudio, se podría deber a la liberación de la molécula de MC y que explicaría la cantidad encontrada en el espacio extracelular; la cual saldría por algún mecanismo de transporte aún desconocido. En el caso de MC-LR, que también está en alta concentración, pero en el espacio extracelular, también ingresaría a las células de *Microcystis*.

Este comportamiento de aumento intracelular en cantidad de [D-Leu¹] MC-LR y difusión de las moléculas de MCs, también podrían explicar la comunicación intraespecie entre cepas toxicas en un florecimiento. Welker y colaboradores (2006) consideran que el número de péptidos individuales que se pueden identificar en una población de *Microcystis* es el resultado de dos fuentes de diversidad estructural: en primer lugar, la producción de múltiples congéneres o variantes de clases de péptidos individuales por clones individuales y, en segundo lugar, la coexistencia de muchos quimiotipos, cada uno de los cuales produce un conjunto distinto de péptidos individuales. Por lo tanto, la producción de oligopéptidos aparentemente es ventajosa para *Microcystis* independientemente del hábitat real; de lo contrario, el potencial costo energético de la síntesis probablemente se habría perdido en la línea evolutiva muy antigua de las cianobacterias.

Nuevamente se vuelve a postular la posibilidad de múltiples roles funcionales de la MC; en donde una mayor producción de MC puede promover la aptitud de las células de *Microcystis* y su competitividad con otras especies de fitoplancton (Babica y col., 2006; Pflugmacher, 2002). Además, un estudio de Zilliges y colaboradores (2008) apoyan el papel de la MC en la formación y especificidad de colonias de *Microcystis*. En el mismo se encontraron diferencias en la agregación celular de la cepa de *M. aeruginosa* PCC 7806 y una cepa mutante deficiente en MC; que guiaron el descubrimiento de una proteína (MrpC) expuesta en la superficie que muestra una mayor abundancia en la cepa mutante en comparación con la cepa salvaje. Esta proteína extracelular MrpC está directamente implicadas en el contacto célula-célula entre células, y actúa como un factor potencial específico del tipo de colonia, pudiendo ser muy importante para la ventaja competitiva de ecotipos específicos de *Microcystis*. Sin embargo, para Kaplan y colaboradores (2012) no se puede definir sí la molécula de MC está directamente vinculada en la formación de morfotipo y cuál es el mecanismo mediante el cual influye en la superficie de las proteínas celulares.

Los roles funcionales postulados para la MC no necesariamente se excluyen entre sí, dado que el principio de la línea de ensamblaje de la biosíntesis de MC más bien proporciona una vía para una evolución y diversificación escalonadas de las toxinas y permite la adopción de diferentes funciones que podrían ser útiles en el contexto natural (Pearson y col., 2016).

Por último, se analizó la respuesta a la exposición a 5 y 10 ppm de MC-LR sobre las células de CAAT 2005-3 durante una hora. Los datos indican que con la exposición a 5 ppm no se detectaron cambios en los perfiles toxicológicos extra e intracelular. Sin embargo, para 10 ppm de MC-LR de tratamiento, la cepa en estudio se comportó de forma muy similar a cuando se realizó la exposición a 8 ppm.

Integrando todos los datos obtenidos con las exposiciones a 5, 8 ,10 y 15 ppm sobre la cepa de *M. aeruginosa* CAAT 2005-3; se observa que, la variante MC-LR se mantiene en su mayoría en el exterior de las células independientemente de la dosis expuesta. La variante [D-Leu¹] MC-LR aumenta su cantidad intracelular con dependencia de la concentración de MC-LR tratada. Además, a 15 ppm, alcanza la toxina producida por la cepa CAAT 2005-3, alrededor de un 50 % por encima del control y también se observa significativamente en el espacio extracelular. Por lo tanto, la molécula de MC-LR actuaría como molécula de señalización desde el exterior, induciendo un aumento de [D-Leu¹] MC-LR intracelular y cuando la cantidad de esta última variante dentro de la célula supera un determinado valor conlleva a su liberación fuera de la célula.

Neilan y colaboradores (2012) proponen un papel global de la MC en el metabolismo del carbono y nitrógeno y en el control redox, con percepción de cambios redox. En la cepa en estudio, con la exposición a 10 ppm de MC-LR se encontró un aumento marcado de CAT, una de las enzimas antioxidantes de las células; sin embargo, para 5 ppm no se observaron cambios. De la comparación entre estas dos dosis de MC-LR tratadas, se podría proponer un umbral a partir del cual se da una vinculación entre el aumento de la [D-Leu¹] MC-LR intracelular y el estado oxidativo de la célula de cianobacteria.

Las dosis de MC-LR consideradas se seleccionaron para entender que ocurre en el entorno cercano a las células de cianobacterias, cuando se da un estímulo importante de MC sobre las mismas. Además, permiten poner de manifiesto lo que ocurre cuando se dan fenómenos de incrementos importantes de MCs en cuerpos de agua, dentro del mismo florecimiento de cianobacterias; y en el que no necesariamente agentes abióticos pudieran ser causantes del incremento de toxinas.

Comprender el o los roles de la cianotoxina, lleva a considerar varios escenarios con interacciones intraespecies y/o interespecies, y en que además no necesariamente la función de la molécula de MC extracelular e intracelular sea la misma. Según Dittmann y colaboradores (2015) la producción de múltiples variantes de un producto natural puede permitir una bioactividad sinérgica y conferir una ventaja adaptativa al organismo productor. Por otro lado, la producción de MCs para Neilan y colaboradores (2012) es uno de los rasgos que reflejan la segregación de diferentes ecotipos en una comunidad de cianobacterias.

En base a todo lo expuesto queda seguir avanzando en estudios que permitan determinar si existe un transporte activo para las MCs, vinculaciones con la síntesis, modificaciones post-traduccionales dentro de las células de cianobacterias y asociaciones con otras moléculas o metabolismos dentro de la célula. Poder encontrar cual o cuales son los factores ambientales que influirían directamente en el metabolismo de las toxinas. Debería realizarse estudios posteriores para explorar si la expresión y la producción de MCs se modifican en condiciones de estrés y como también la regulación en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico. En definitiva, darle a la MC el rol que le corresponde, pudiendo discernir si es un infoquímico extracelular y/o intracelular y cuál es su acción en la interacción intraespecie e interespecie. Finalmente encontrar su vinculación con el estado oxidativo de la célula de cianobacteria.

VI. Consideraciones finales



El trabajo desarrollado en esta tesis ha permitido alcanzar los objetivos propuestos.

1.- Se aisló del ambiente y puso en cultivo una cepa de *Microcystis aeruginosa*. La misma se denominó CAAT 2005-3, siendo una cepa autóctona argentina identificada, cultivada, caracterizada y mantenida en condiciones de laboratorio a disposición de investigadores para su uso

2.- En esta tesis se han identificado las condiciones óptimas de crecimiento y descripto su curva de crecimiento

- Su caracterización filogenética de acuerdo a la secuencia *cpc*BA-IGS, permitió establecer que pertenece al género de *Microcystis* y su grado de semejanza con otras cepas y especies de cianobacterias
- Se estableció el perfil de toxinas que produce la cepa, en particular se identificó químicamente la molécula de cianotoxina [D-Leu¹] MC-LR; resultando ser la variante que mayoritariamente CAAT 2005-3 produce. Además, se identificaron otras variantes de MCs, y se describieron siete de ellas nuevas Microcystinas.
- Se determinó que la producción de [D-Leu¹] MC-LR se vincula directamente al crecimiento poblacional y que sin embargo también responde a señales externas evidenciado cuando la cepa se enfrenta a estresores, como ser peróxido de hidrogeno, u agregados de células enteras en otra fase de la cinética de crecimiento.
- En la comparación de CAAT 2005-3 con otras cepas comerciales de *M. aeruginosa* y de *Arthrospira máxima* (ambas no productoras de toxinas), no hubo diferencias de resistencia al peróxido de hidrogeno.
- El tratamiento de MC-LR sobre una cepa no productora de toxinas, 24 A, generó lisis celular; en cambio sobre la cepa CAAT 2005-3 produjo aumentos de su toxina mayoritaria [D-Leu¹] MC-LR.

Se ha evidenciado en esta tesis que ante la presencia de MC-LR en el entorno extracelular, se ha generado el aumento intracelular de la toxina [D-Leu¹] MC-LR y su consiguiente liberación desde las células de CAAT 2005-3 al medio extracelular.

Los resultados de este trabajo apoyan la idea de un transporte de MCs hacia el interior de las células y hacia el exterior, por lo que se puede plantear la hipótesis de la existencia de un sistema de transporte y/o cotransporte de las mismas. Otra posibilidad es la existencia de receptores de membrana que permitan la traducción de la señal sin ingreso de las moléculas de MCs al interior de las células y su liberación por ruptura celular.

Por lo tanto, tomando en conjunto estas apreciaciones se podrían indicar que no solo el aumento de la producción de toxinas se vincula al desarrollo poblacional de las cianobacterias en la cinética de crecimiento, sino también a situaciones provocadas por estresores. Estas afirmaciones suman la posibilidad de que la expresión de la toxina se relaciona con el desarrollo poblacional, así como con actividad alelopática.

Quedan así validada la primera hipótesis de dice que "la producción de toxinas está relacionada con situaciones de estrés poblacional y que, se expresarán en mayor medida cuando las células se encuentren en situaciones pro-oxidantes".

En cuanto a la segunda hipótesis "la molécula de Microcystina cumple un rol en la comunicación celular en el desarrollo del florecimiento, por tanto, las células de *Microcystis* son capaces de censar la presencia de toxina en su entorno y generar una respuesta intracelular", nos queda por entender que:

Si consideramos a Microcystina como molécula señal o involucrada en la informacion, cómo es que opera esa respuesta, tanto sea a nivel intracelular como extracelular.

En este sentido el grupo de investigación del Dr. Hernando en la CONEA, intenta demostrar funciones antioxidantes de las MCs, que de ser así se explicaría porque las toxinas aumentan con la exposición a estresores y porque las células de la fase estacionaria que poseen mayor cantidad de toxina, resultan ser más resistentes a los mismos.

Como aporte la tesis, nos brinda que:

- la molécula de [D-Leu¹] MC-LR encontrada en la cepa de *Microcystis aeruginosa* CAAT
2005-3 en Argentina, sirve para estudiar la distribución en el ambiente con otras cepas de *Microcystis* productoras de la misma cianotoxina encontradas en el mismo continente.
Como también a nivel regional poder determinar en el futuro su toxicidad.

- la cepa de *Microcystis aeruginosa* CAAT 2005-3, mantenida en condiciones de laboratorio en el Laboratorio de Toxicología (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP) ha permitido el desarrollo de numerosos trabajos científicos al conocimiento de cianobacterias y cianotoxinas en la región. Su contribución se ve reflejado en varios reportes (Crettaz-Minaglia y col., 2017; 2020; Giannuzzi y col., 2016; Hernando y col., 2018; Ouahid y col., 2011; Qi y col., 2015; Rosso y col., 2014).

VII.-Bibliografía

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, *105*(C), 121–126. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., Battchikova, N., Cournac, L., & Aro, E. M. (2013).
 Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 4111–4116. https://doi.org/10.1073/pnas.1221194110
- Amé, M. V., Galanti, L. N., Menone, M. L., Gerpe, M. S., Moreno, V. J., & Wunderlin, D. A. (2010). Microcystin-LR, -RR, -YR and -LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae*, 9(1), 66–73. https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.08.001
- Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1985). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1 Introduction. *Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 38–39, 291–302.
 http://www.schweizerbart.de//papers/archiv%5C_algolstud/detail/38-39/62868/Modern%5C_approach%5C_to%5C_the%5C_classification %5C system%5C of%5C cyanophytes%5C_1%5C_Introduction
- Andrade, L., Keim, C. N., Farina, M., & Pfeiffer, W. C. (2004). Zinc detoxification by a cyanobacterium from a metal contaminated bay in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(1), 147–152. https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000100020
- Andrinolo, D., Pereira, P., Giannuzzi, L., Aura, C., Massera, S., Caneo, M., Caixach, J., Barco, M., & Echenique, R. (2007). Occurrence of Microcystis aeruginosa and microcystins in Rio de la Plata river (Argentina). Acta Toxicológica Argentina, 15(1), 8–14.
- Andrinolo, D., Sedan, D., Telese, L., Aura, C., Masera, S., Giannuzzi, L., Marra, C. A., & de Alaniz, M. J. T. (2008). Hepatic recovery after damage produced by sub-chronic intoxication with the cyanotoxin microcystin LR. *Toxicon*, 51(3), 457–467. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.11.012
- Babica, P., Bláha, L., & Maršálek, B. (2006). Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology*, 42(1), 9–20. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00176.x

- Barrington, D. J., & Ghadouani, A. (2008). Application of hydrogen peroxide for the removal of toxic cyanobacteria and other phytoplankton from wastewater. *Environmental Science and Technology*, 42(23), 8916–8921. https://doi.org/10.1021/es801717y
- Bartram, J., Carmichael, W. W., Chorus, I., Jones, G., & Skulberg, O. M. (1999). Introduction. In *Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.*
- Beardall, J., & Raven, J. A. (2004). The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia*, 43(1), 26–40. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-1-26.1
- Bidle, K. D., & Falkowski, P. G. (2004). Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 643–655. https://doi.org/10.1038/nrmicro956
- Bláhová, L., Babica, P., Adamovský, O., Kohoutek, J., Maršálek, B., &
 Bláha, L. (2008). Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. *Environmental Chemistry Letters*, 6(4), 223–227. https://doi.org/10.1007/s10311-007-0126-x
- Bláhová, L., Babica, P., Maršálková, E., Maršálek, B., & Bláha, L. (2007).
 Concentrations and seasonal trends of extracellular microcystins in freshwaters of the Czech Republic Results of the national monitoring program. *Clean Soil, Air, Water*, 35(4), 348–354.
 https://doi.org/10.1002/clen.200700010
- Bormans, M., Sherman, B. S., & Webster, I. T. (1999). Is buoyancy regulation in cyanobacteria an adaptation to exploit separation of light and nutrients? *Marine and Freshwater Research*, 50(8), 897–906. https://doi.org/10.1071/MF99105
- Bortoli, S., Oliveira-Silva, D., Krügerd, T., Dörra, F. A., Colepicolo, P., Volmerb, D. A., & Pinto, E. (2014). Growth and microcystin production of a brazilian microcystis aeruginosa strain (LTPNA 02) under different nutrient conditions. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(4), 389–398. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.019
- Botes, D. P., Wessels, P. L., Kruger, H., Runnegar, M. T. C., Santikarn, S., Smith, R. J., Barna, J. C. J., & Williams, D. H. (1985). Structural studies on cyanoginosins-LR{,} -YR{,} -YA{,} and -YM{,} peptide toxins from Microcystis aeruginosa. J. Chem. Soc.{,} Perkin Trans. 1, 0, 2747–2748. https://doi.org/10.1039/P19850002747

- Bouchard, J. N., & Purdie, D. A. (2011). Effect of elevated temperature, darkness, and hydrogen peroxide treatment on oxidative stress and cell death in the bloom-forming toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa. *Journal of Phycology*, 47(6), 1316–1325. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01074.x
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microram quantitis of prtein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–245. https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003
- Briand, E., Bormans, M., Gugger, M., Dorrestein, P. C., & Gerwick, W. H. (2016). Changes in secondary metabolic profiles of Microcystis aeruginosa strains in response to intraspecific interactions. *Environmental Microbiology*, 18(2), 384–400. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12904
- Brutemark, A., Engstrom-Ost, J., Vehmaa, A., & Gorokhova, E. (2015). Growth, toxicity and oxidative stress of a cultured cyanobacterium (Dolichospermum sp.) under different CO2/pH and temperature conditions. *Phycological Research*, 63(1), 56–63. https://doi.org/10.1111/pre.12075
- Cámara, M., Hardman, A., Williams, P., & Milton, D. (2002). Quorum sensing in Vibrio cholerae. *Nature Genetics*, *32*(2), 217–218. https://doi.org/10.1038/ng1002-217
- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification on protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *52*(2), 297–354. https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-297
- Cavalier-Smith, T. (2010). Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1537), 111–132. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0161
- Chen, T., Zhao, X., Liu, Y., Shi, Q., Hua, Z., & Shen, P. (2004). Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR. *Toxicology*, 197(1), 67–77. https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.12.013
- Chia, M. A., Jankowiak, J. G., Kramer, B. J., Goleski, J. A., Huang, I. S., Zimba, P. V., do Carmo Bittencourt-Oliveira, M., & Gobler, C. J. (2018). Succession and toxicity of Microcystis and Anabaena (Dolichospermum) blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. *Harmful Algae*, 74, 67–77.

https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.03.002

- Chorus, I. (2001). Cyanotoxin Occurrence in Freshwaters. In *Cyanotoxins*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59514-1_2
- Colautti, D. C., Remes Lenicov, M., Gómez, N., & Claps, M. C. (1998). Mortandad de peces en el arroyo San Miguel (partido de Pila, Provincia de Buenos Aires). *Gayana Zool.*, 62(2), 191–197.
- Collier, J. L., & Grossman, A. R. (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in Synechococcus sp. strain PCC 7942: Not all bleaching is the same. *Journal of Bacteriology*, 174(14), 4718–4726. https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4718-4726.1992
- Crettaz-Minaglia, M. C. (2020). Modelado matemático del crecimiento de Microcystis aeruginosa en condiciones de laboratorio bajo diferentes temperaturas. *Aids*, *130*(May), 61–67. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/60750.
- Crettaz-Minaglia, M. C., Rosso, L., Jorge Oswaldo, A., Sandro, G., Daniela, S., Dario, A., & Leda, G. (2017). Mathematical modeling of Microcystis aeruginosa growth and [D-Leu1] microcystin-LR production in culture media at different temperatures. *Harmful Algae*, 67(July), 13–25. https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.05.006
- De Leon, L., & Yunes, J. S. (2001). First report of a Microcystincontaining bloom of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa in the La Plata River, South America. *Environmental Toxicology*, *16*(1), 110– 112. https://doi.org/10.1002/1522-7278(2001)16:1<110::AID-TOX1012>3.0.CO;2-Z
- DeLisa, M. P., & Bentley, W. E. (2002). Bacterial autoinduction: Looking outside the cell for new metabolic engineering targets. *Microbial Cell Factories*, 1, 1–9. https://doi.org/10.1186/1475-2859-1-5
- Desikan, R., Cheung, M. K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 205– 212. https://doi.org/10.1093/jxb/erh033
- Dicke, M., & Sabelis, M. W. (1988). Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? *Functional Ecology*, 2(2), 131. https://doi.org/10.2307/2389687
- Ding, Y., Gan, N., Li, J., Sedmak, B., & Song, L. (2012). Hydrogen peroxide induces apoptotic-like cell death in Microcystis aeruginosa (Chroococcales, Cyanobacteria) in a dose-dependent manner. *Phycologia*, 51(5), 567–575. https://doi.org/10.2216/11-107.1

- Dittmann, E., Erhard, M., Kaebernick, M., Scheler, C., Neilan, B. A., Von Döhren, H., & Börner, T. (2001). Altered expression of two lightdependent genes in a microcystin-lacking mutant of Microcystis aeruginosa PCC 7806. *Microbiology*, 147(11), 3113–3119. https://doi.org/10.1099/00221287-147-11-3113
- Dittmann, E, Neilan, B. A., Erhard, M., Von Döhren, H., & Börner, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806. *Molecular Microbiology*, *26*(4), 779–787. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6131982.x
- Dittmann, Elke, Gugger, M., Sivonen, K., & Fewer, D. P. (2015). Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends in Microbiology*, *23*(10), 642–652. https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.008
- Dörr, F. A., Pinto, E., Soares, R. M., & Feliciano de Oliveira e Azevedo, S. M. (2010). Microcystins in South American aquatic ecosystems:
 Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon*, 56(7), 1247–1256. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.018
- Drábková, M., Matthijs, H. C. P., Admiraal, W., & Maršálek, B. (2007). Selective effects of H2O2 on cyanobacterial photosynthesis. *Photosynthetica*, 45(3), 363–369. https://doi.org/10.1007/s11099-007-0062-9
- Drábková, Michaela, Admiraal, W., & Maršálek, B. (2007). Combined exposure to hydrogen peroxide and light-selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environmental Science and Technology*, 41(1), 309–314. https://doi.org/10.1021/es060746i
- Dziallas, C., & Grossart, H. P. (2011). Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic microcystis sp. *PLoS ONE*, *6*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025569
- Echenique, R., & Aguilera, A. (2009). Cyanobacteria toxígenas: aspectos generales para su identificación taxonómica. (pp. 37–51). https://doi.org/10.13140/2.1.3899.7443
- Echenique, R., Rodríguez, J., Mariela, C., Giannuzzi, L., Barco, M., Rivera, J., Caixach, J., & Andrinolo, D. (2005). *Microcystins in the Drinking Water Supply in the Cities of Ensenada and La Plata (Argentina)*. March 2016.
- Falconer, I., & Humpage, A. R. (1996). *Tumour promotion by* cyanobacterial toxins. 35, 74–79.

- Ferrari, G., del Carmen Pérez, M., Dabezies, M., Míguez, D., & Saizar, C. (2011). Planktic Cyanobacteria in the Lower Uruguay River, South America. *Fottea*, 11(1), 225–234. https://doi.org/10.5507/fot.2011.021
- Ferrario, M. E., Sar, E. A., & Sala, S. E. (1995). Metodologia basica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. *Manual de Métodos Ficológicos*, 23.
- Fluhr, R., Sagi, M., Davydov, O., & Ashtamker, C. (2005). Signals from reactive oxygen species. *BMC Plant Biology*, 5(Suppl 1), S15. https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-s1-s15
- Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C., & Song, L. (2012). The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming Microcystis spp. *Environmental Microbiology*, 14(3), 730–742. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02624.x
- Gao, L., Pan, X., Zhang, D., Mu, S., Lee, D. J., & Halik, U. (2015).
 Extracellular polymeric substances buffer against the biocidal effect of H2O2 on the bloom-forming cyanobacterium Microcystis aeruginosa. *Water Research*, 69, 51–58.
 https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.060
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., & Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28(11), 1091–1101. https://doi.org/10.1002/bies.20493
- Gerbersdorf, S. U. (2006). An advanced technique for immuno-labelling of microcystins in cryosectioned cells of Microcystis aeruginosa PCC 7806 (cyanobacteria): Implementations of an experiment with varying light scenarios and culture densities. *Toxicon*, 47(2), 218–228. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.10.019
- Giannuzzi, L., Krock, B., Minaglia, M. C. C., Rosso, L., Houghton, C., Sedan, D., Malanga, G., Espinosa, M., Andrinolo, D., & Hernando, M. (2016). Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of Microcystis aeruginosa (Cyanophyceae) exposed to temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part -C: Toxicology and Pharmacology*, 189(July), 22–30. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.07.001
- Giannuzzi, L., Pinotti, A., & Zaritzky, N. (1998). Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 39(1–2), 101–110. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00127-X

- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., & Andrinolo, D. (2011). An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs*, 9(11), 2164– 2175. https://doi.org/10.3390/md9112164
- Gupta, N., Pant, S. C., Vijayaraghavan, R., & Rao, P. V. L. (2003). Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, 188(2–3), 285–296. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00112-4
- Havens, K. E. (2008). Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. Advances in Experimental Medicine and Biology, 619(2004), 733–747. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_33
- Helman, Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B., & Kaplan, A. (2005). Fractionation of the three stable oxygen isotopes by oxygen-producing and oxygen-consuming reactions in photosynthetic organisms. *Plant Physiology*, 138(4), 2292–2298. https://doi.org/10.1104/pp.105.063768
- Hernando, M., Minaglia, M. C. C., Malanga, G., Houghton, C., Andrinolo, D., Sedan, D., Rosso, L., & Giannuzzi, L. (2018). Physiological responses and toxin production of: Microcystis aeruginosa in short-term exposure to solar UV radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 17(1), 69–80. https://doi.org/10.1039/c7pp00265c
- Hesse, K., Dittmann, E., & Börner, T. (2001). Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of Microcystis aeruginosa PCC 7806. *FEMS Microbiology Ecology*, 37(1), 39–43. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00142-8
- Hooser, S. B., Beasley, V. R., Basgall, E. J., Carmichael, W. W., & Haschek, W. M. (1990). Microcystin-LR-induced Ultrastructural Changes in Rats. *Veterinary Pathology*, 27(1), 9–15. https://doi.org/10.1177/030098589002700102
- Hooser, S. B., Beasley, V. R., Lovell, R. A., Carmichael, W. W., & Haschek, W. M. (1989). Toxicity of Microcystin LR, a Cyclic Heptapeptide Hepatotoxin from Microcystis aeruginosa, to Rats and Mice. *Veterinary Pathology*, *26*(3), 246–252. https://doi.org/10.1177/030098588902600309
- Huisman, J., & Hulot, F. D. (2005). Population Dynamics of Harmful Cyanobacteria. *Harmful Cyanobacteria*, 143–176. https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3_7

Humble, A. V, Gadd, G. M., & Codd, G. A. (1997). Binding of copper and

zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography. *Water Research*, *31*(7), 1679–1686. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00033-X

- Hung, S. H., Yu, C. W., & Lin, C. H. (2005). Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46(1), 1–10. https://doi.org/10.7016/BBAS.200501.0001
- Huo, X., Chang, D. W., Tseng, J. H., Burch, M. D., & Lin, T. F. (2015).
 Exposure of microcystis aeruginosa to hydrogen peroxide under light: Kinetic modeling of cell rupture and simultaneous microcystin degradation. *Environmental Science and Technology*, 49(9), 5502– 5510. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00170
- Jacinavicius, F. R., Gama Júnior, W. A., Azevedo, M. T. de P., & Sant'Anna, C. L. (2012). Manual para cultivo de cianobactérias. Secretaria Do Meio Ambiente Do Estado de São Paulo - Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa Em Ficologia, 1, 1–32.
- Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. M., Antunes, M. B., de Melo Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S. T., Azevedo, S. M. F. O., & Jarvis, W. R. (1998). Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 338(13), 873–878. https://doi.org/10.1056/nejm199803263381304
- Kaebernick, M., Dittmann, E., Börner, T., & Neilan, B. A. (2002). Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 449–455. https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.449-455.2002
- Kaebernick, M., & Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00093-3
- Kaplan, A., Harel, M., Kaplan-Levy, R. N., Hadas, O., Sukenik, A., & Dittmann, E. (2012). The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Frontiers in Microbiology*, 3(APR), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00138
- Katz, M. E., Fennel, K., & Falkowski, P. G. (2007). Geochemical and Biological Consequences of Phytoplankton Evolution. *Evolution of Primary Producers in the Sea*, 405–430. https://doi.org/10.1016/B978-012370518-1/50019-9

Koksharova, O., & Wolk, C. (2002). Genetic tools for cyanobacteria.

Applied Microbiology and Biotechnology, *58*(2), 123–137. https://doi.org/10.1007/s00253-001-0864-9

- Komárek, J., & Anagnostidis, K. (2005). Cyanoprokaryota, Part 2: Oscillatoriales. In *Süsswasserflora von Mitteleuropa 19/1*.
- Komárek, J., & Komárková, J. (2002). Review of the European Microcystis morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Fottea*, 2(1), 1–24.
- Kühl, M., Chen, M., Ralph, P. J., Schreiber, U., & Larkum, A. W. D. (2005). A niche for cyanobacteria. *Nature*, 433(February), 2005–2005. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15729331
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O., & Granéli, E. (2003). Allelopathy in phytoplankton - Biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42(4), 406–419. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-42-4-406.1
- Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R., & Pakrasi, H. B. (2006). Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803. *Protoplasma*, 227(2–4), 129–138. https://doi.org/10.1007/s00709-006-0145-7
- Liu, M., Shi, X., Chen, C., Yu, L., & Sun, C. (2017). Responses of Microcystis colonies of different sizes to hydrogen peroxide stress. *Toxins*, 9(10). https://doi.org/10.3390/toxins9100306
- Liu, T., Mazmouz, R., Ongley, S. E., Chau, R., Pickford, R., Woodhouse, J. N., & Neilan, B. A. (2017). Directing the Heterologous Production of Specific Cyanobacterial Toxin Variants. ACS Chemical Biology, 12(8), 2021–2029. https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00181
- Lukač, M., & Aegerter, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of Microcystis aeruginosa. *Toxicon*, *31*(3), 293–305. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90147-B
- Lürling, M., Meng, D., & Faassen, E. J. (2014). Effects of hydrogen peroxide and ultrasound on biomass reduction and toxin release in the cyanobacterium, microcystis aeruginosa. *Toxins*, 6(12), 3260–3280. https://doi.org/10.3390/toxins6123260
- Lyck, S. (2004). Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with Microcystis aeruginosa. *Journal of Plankton Research*, *26*(7), 727–736. https://doi.org/10.1093/plankt/fbh071

Makower, A. K., Schuurmans, J. M., Groth, D., Zilliges, Y., Matthijs, H. C.

P., & Dittmann, E. (2015). Transcriptomics-aided dissection of the intracellular and extracellular roles of microcystin in Microcystis aeruginosa PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(2), 544–554. https://doi.org/10.1128/AEM.02601-14

- Malik, V. S. (1980). Microbial secondary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 5(3), 68–72. https://doi.org/10.1016/0968-0004(80)90071-7
- Mancini, M., Rodriguez, C., Bagnis, G., Liendo, A., Prosperi, C., Bonansea, M., & Tundisi, J. G. (2010). Cianobacterial bloom and animal mass mortality in a reservoir from Central Argentina. *Brazilian Journal of Biology*, 70(3 SUPPL.), 841–845. https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000400015
- Marker, A. (1980). The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods : conclusions and recommendations. *Arch Hydrobiol Beih*, *14*, 91–106. http://ci.nii.ac.jp/naid/10016843059/en/
- Matthiensen, A., Beattie, K. A., Yunes, J. S., Kaya, K., & Codd, G. A. (2000). [D-Leu1]Microcystin-LR, from the cyanobacterium Microcystis RST 9501 and from a Microcystis bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry*, 55(5), 383–387. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00335-6
- Matthijs, H. C. P., Visser, P. M., Reeze, B., Meeuse, J., Slot, P. C., Wijn, G., Talens, R., & Huisman, J. (2012). Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. *Water Research*, 46(5), 1460–1472. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.016
- Meissner, S., Fastner, J., & Dittmann, E. (2013). Microcystin production revisited: Conjugate formation makes a major contribution. *Environmental Microbiology*, 15(6), 1810–1820. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12072
- Michalak, A. M., Anderson, E. J., Beletsky, D., Boland, S., Bosch, N. S., Bridgeman, T. B., Chaffin, J. D., Cho, K., Confesor, R., Daloglu, I., DePinto, J. V., Evans, M. A., Fahnenstiel, G. L., He, L., Ho, J. C., Jenkins, L., Johengen, T. H., Kuo, K. C., LaPorte, E., ... Zagorski, M. A. (2013). Record-setting algal bloom in Lake Erie caused by agricultural and meteorological trends consistent with expected future conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(16), 6448–6452. https://doi.org/10.1073/pnas.1216006110

- Mikula, P., Zezulka, S., Jancula, D., & Marsalek, B. (2012). Metabolic activity and membrane integrity changes in Microcystis aeruginosa new findings on hydrogen peroxide toxicity in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, 47(3), 195–206. https://doi.org/10.1080/09670262.2012.687144
- Neilan, B. A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L. L., Hawkins, P. R., Cox, P. T., & Goodman, A. E. (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 693–697. https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-693
- Neilan, B. A., Jacobs, D., & Goodman, A. E. (1995). Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(11), 3875–3883. https://doi.org/10.1128/aem.61.11.3875-3883.1995
- Neilan, B. A., Pearson, L. A., Moffitt, M. C., Mihali, K. T., Kaebernick, M., Kellmann, R., & Pomati, F. (2008). The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619, 417–452. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_17
- Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E. (2012). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1239–1253. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. I., & Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in Microcystis spp. *Journal of Biochemistry*, *126*(3), 520–529. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022481
- O'Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A., & Gobler, C. J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, *14*, 313–334. https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027
- Oren, A. (2004). A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(5), 1895–1902. https://doi.org/10.1099/ijs.0.03008-0
- Orr, P. T., & Jones, G. J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited Microcystis aeruginosa cultures. *Limnology and Oceanography*, *43*(7), 1604–1614.

https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.7.1604

- Oteiza, J. M., Ouahid, Y., Baron, A., Andrinolo, D., Echenique, R., Giannuzzi, L., Zaritzky, N., & Fernández del Campo, F. (1993). *Utilización de marcadores moleculares para la detección de*. 1–9.
- Oteiza, J., Ouahid, Y., Baron, A., Andrinolo, D., Echenique, R., Giannuzzi, L., Mariela1, C., & Fernández del Campo, F. (2007). *Microcystis Potencialmente Toxicas En Cuerpos De Agua De La. January*.
- Ouahid, Y., Zaccaro, M. C., Zulpa, G., Storni, M., Stella, A. M., Bossio, J. C., Tanuz, M., & Del Campo, F. F. (2011). A single microcystin in a toxic Microcystis bloom from the river Río de la Plata (Argentina). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 91(6), 525–536. https://doi.org/10.1080/03067310903359492
- Paerl, H. W., Gardner, W. S., Havens, K. E., Joyner, A. R., McCarthy, M. J., Newell, S. E., Qin, B., & Scott, J. T. (2016). Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*, 54, 213–222. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.009
- Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 27–37. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x
- Paerl, H. W., & Paul, V. J. (2012). Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, 46(5), 1349– 1363. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002
- Park, H., Namikoshi, M., Brittain, S. M., Carmichael, W. W., & Murphy, T. (2001). waterbloom in a Canadian prairie lake. *Toxicon*, 39, 855– 862.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., & Dunand, C. (2007). PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605–1611. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.005
- Pearson, L. A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S. E., D'Agostino, P. M., & Neilan, B. A. (2016). The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae*, 54, 98–111. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002
- Pearson, L. A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., & Neilan, B. A. (2004). Inactivation of an ABC transporter gene, mcyH, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium Microcystis

aeruginosa PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6370–6378. https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6370-6378.2004

- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., & Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. In *Marine Drugs* (Vol. 8, Issue 5). https://doi.org/10.3390/md8051650
- Pflugmacher, S. (2002). Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology*, *17*(4), 407–413. https://doi.org/10.1002/tox.10071
- Phelan, R. R., & Downing, T. G. (2011). A growth advantage for microcystin production by microcystis PCC7806 under high light. *Journal of Phycology*, 47(6), 1241–1246. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01056.x
- Pochodylo, A. L., Klein, A. R., & Aristilde, L. (2017). Metal-binding selectivity and coordination dynamics for cyanobacterial microcystins with Zn, Cu, Fe, Mg, and Ca. *Environmental Chemistry Letters*, 15(4), 695–701. https://doi.org/10.1007/s10311-017-0639-x
- Qi, Y., Rosso, L., Sedan, D., Giannuzzi, L., Andrinolo, D., & Volmer, D. A. (2015). Seven new microcystin variants discovered from a native Microcystis aeruginosa strain - Unambiguous assignment of product ions by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(2), 220–224. https://doi.org/10.1002/rcm.7098
- Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., & Sivonen, K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 568–573. https://doi.org/10.1073/pnas.0304489101
- Reynolds, C. S. (1987). Cyanobacterial Water-Blooms. *Advances in Botanical Research*, *13*(C), 67–143. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60341-9
- Reynolds, C. S., Jaworski, G. H. M., Cmiech, H. A., Leedale, G. F., & Lund, J. W. G. (1981). On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis Aeruginosa* K\&\#xfc;tz. Emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 293(1068), 419–477. https://doi.org/10.1098/rstb.1981.0081
- Rinehart, K. L., Namikoshi, M., & Choi, B. W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal*

of Applied Phycology, *6*(2), 159–176. https://doi.org/10.1007/BF02186070

- Rippka, R., Deruelles, J., & Waterbury, J. B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(1), 1–61. https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1
- Rizvi, S. J. H., Haque, H., Singh, V. K., & Rizvi, V. (1992). A discipline called allelopathy. *Allelopathy*, *c*, 1–10. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2376-1_1
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Börner, T., & Christoffersen, K. (2001). Effects of Cell-Bound Microcystins on Survival and Feeding of Daphnia spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3523–3529. https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3523-3529.2001
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Börner, T., & Kohl, J. G. (1999).
 Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of
 Daphnia galeata caused by the cyanobacterium Microcystis aeruginosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 737–739.
 https://doi.org/10.1128/aem.65.2.737-739.1999
- Rosso, L., Sedan, D., Kolamn, M., Caixach, J., Flores, C., Oteiza, J.,
 Salerno, G., Echenique, R., Giannuzzi, L., & Andrinolo, D. (2014).
 Microcystis aeruginos strain [D-Leu1] Mcyst-LR producer, from
 Buenos Aires province, Argentina. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(4), 287–296. https://doi.org/10.12980/jclm.2.2014jclm-2014-0002
- Rudolph-Böhner, S., Mierke, D. F., & Moroder, L. (1994). Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. *FEBS Letters*, 349(3), 319–323. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00680-6
- Runnegar, M., Berndt, N., & Kaplowitz, N. (1995). Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: Effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 134, Issue 2, pp. 264–272). https://doi.org/10.1006/taap.1995.1192
- Ryals. (1996). Systemic acquired resistance. *Pesticide Outlook*, 9(2), 34. https://doi.org/10.2307/3870231
- Salinas, P., Ruiz, D., Cantos, R., Lopez-Redondo, M. L., Marina, A., & Contreras, A. (2007). The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7942. *Molecular*

Microbiology, *66*(6), 1607–1619. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06035.x

- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set). In *Cold Springs Harbour Press* (Vol. 1).
- Sasikumar, R., Joseph, J., & Peschek, G. (2011). An Alternate Hypothesis for the Origin of Mitochondria (pp. 89–107). https://doi.org/10.1007/978-94-007-0388-9 3
- Sathicq, M. B., Gómez, N., Andrinolo, D., Sedán, D., & Donadelli, J. L. (2014). Temporal distribution of cyanobacteria in the coast of a shallow temperate estuary (Río de la Plata): some implications for its monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(11), 7115–7125. https://doi.org/10.1007/s10661-014-3914-3
- Schatz, D., Keren, Y., Hadas, O., Carmeli, S., Sukenik, A., & Kaplan, A. (2005). Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic Microcystis strains. *Environmental Microbiology*, 7(6), 798–805. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00752.x
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., Dittmann, E., & Kaplan, A. (2007). Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology*, 9(4), 965–970. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01218.x
- Schuster, M., & Greenberg, E. P. (2006). A network of networks: Quorumsensing gene regulation in Pseudomonas aeruginosa. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2–3), 73–81. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036
- Schuurmans, J. M., Brinkmann, B. W., Makower, A. K., Dittmann, E., Huisman, J., & Matthijs, H. C. P. (2018). Microcystin interferes with defense against high oxidative stress in harmful cyanobacteria. *Harmful Algae*, 78(June), 47–55. https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.07.008
- Sedan, D., Andrinolo, D., Telese, L., Giannuzzi, L., de Alaniz, M. J. T., & Marra, C. A. (2010). Alteration and recovery of the antioxidant system induced by sub-chronic exposure to microcystin-LR in mice: Its relation to liver lipid composition. *Toxicon*, 55(2–3), 333–342. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.008
- Sedan, D., Giannuzzi, L., Rosso, L., Marra, C. A., & Andrinolo, D. (2013). Biomarkers of prolonged exposure to microcystin-LR in mice.

Toxicon, 68, 9-17. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.002

- Sedmak, B., & Eleršek, T. (2005). Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. *Microbial Ecology*, 50(2), 298–305. https://doi.org/10.1007/s00248-004-0189-1
- Shao, J., Wu, Z., Yu, G., Peng, X., & Li, R. (2009). Allelopathic mechanism of pyrogallol to Microcystis aeruginosa PCC7806 (Cyanobacteria): From views of gene expression and antioxidant system. *Chemosphere*, 75(7), 924–928. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.021
- Shapiro, J. (1990). Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO 2 and pH . *SIL Proceedings*, 1922-2010, 24(1), 38–54. https://doi.org/10.1080/03680770.1989.11898689
- Shi, L., Carmichael, W. W., & Kennelly, P. J. (1999). Multifunctional Capabilities and Are Resistant to Microcystin-LR *. *Biochemistry*, 274(15), 10039–10046.
- Shishido, T. K., Kaasalainen, U., Fewer, D. P., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Fiore, M. F., Yunes, J. S., Rikkinen, J., & Sivonen, K. (2013). Convergent evolution of [D-Leucine1] microcystin-LR in taxonomically disparate cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-86
- Silva-Stenico, M. E., Neto, R. C., Alves, I. R., Moraes, L. A. B., Shishidoa, T. K., & Fiore, M. F. (2009). Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(3), 535– 542. https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000300019
- Šmarda, J., Šmajs, D., Komrska, J., & Krzyžánek, V. (2002). S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron*, 33(3), 257–277. https://doi.org/10.1016/S0968-4328(01)00031-2
- Smayda, T. J. (1997). Bloom dynamics : Physiology, behavior, trophic e: ffects. *Limonaology and Oceanography*, *42*, 1132–1136.
- Soares, R. M., Cagido, V. R., Ferraro, R. B., Meyer-Fernandes, J. R., Rocco, P. R. M., Zin, W. A., & Azevedo, S. M. F. O. (2007). Effects of microcystin-LR on mouse lungs. *Toxicon*, 50(3), 330–338. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.003
- Spät, P., Klotz, A., Rexroth, S., Maček, B., & Forchhammer, K. (2018). Chlorosis as a developmental program in cyanobacteria: The proteomic fundament for survival and awakening. *BioRxiv*, 1–59. https://doi.org/10.1101/325761

- Stal, L. (2007). Cyanobacteria: Diversity and Versatility, Clues to Life in Extreme Environments. *Environments*, 500.
- Staub. (1961). Ern ihrungsphysiologisch-aut6kologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge Oscillatoria rubescens DC. *KI. Luft- Und Kältetechnik*, 33(6), 253–255.
- Tillett, D., Parker, D. L., & Neilan, B. A. (2001). Detection of Toxigenicity by a Probe for the Microcystin Synthetase a Gene (mcyA) of the Cyanobacterial Genus Microcystis: Comparison of Toxicities with 16S rRNa and Phycocyanin Operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) Phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2810– 2818. https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2810-2818.2001
- Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *SIL Communications, 1953-1996, 9*(1), 1– 38. https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091
- Utkilen, H., & Gjølme, N. (1995). Iron-Stimulated Toxin Production in Microcystis aeruginosa Edited by Foxit Reader. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 797–800.
- van der Westhuizen, A. J., & Eloff, J. N. (1985). Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga Microcystis aeruginosa (UV-006). *Planta*, *163*(1), 55–59. https://doi.org/10.1007/BF00395897
- Vassilakaki, M., & Pflugmacher, S. (2008). Oxidative stress response of Synechocystis sp. (PCC 6803) due to exposure to microcystin-LR and cell-free cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 219–225. https://doi.org/10.1007/s10811-007-9222-3
- Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in Pseudomonas. FEMS Microbiology Reviews, 30(2), 274–291. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00012.x
- Vidal, F., Sedan, D., D'Agostino, D., Cavalieri, M. L., Mullen, E., Parot Varela, M. M., Flores, C., Caixach, J., & Andrinolo, D. (2017).
 Recreational exposure during algal bloom in carrasco beach, uruguay: A liver failure case report. *Toxins*, 9(9), 1–12. https://doi.org/10.3390/toxins9090267
- Visser, P. M., Verspagen, J. M. H., Sandrini, G., Stal, L. J., Matthijs, H. C. P., Davis, T. W., Paerl, H. W., & Huisman, J. (2016). How rising CO2 and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54(April), 145–159.

https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.006

- Watanabe, M. F., & Oishi, S. (1985). Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (Microcystis aeruginosa) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(5), 1342– 1344. https://doi.org/10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985
- Welker, M., Maršálek, B., Šejnohová, L., & von Döhren, H. (2006).
 Detection and identification of oligopeptides in Microcystis (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides*, 27(9), 2090–2103.
 https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.014
- Welker, M., Von Döhren, H., Täuscher, H., Steinberg, C. E. W., & Erhard, M. (2003). Toxic Microcystis in shallow lake Müggelsee (Germany) -Dynamics, distribution, diversity. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 157(2), 227–248. https://doi.org/10.1127/0003-9136/2003/0157-0227
- Wiedner, C., Visser, P. M., Fastner, J., Metcalf, J. S., Codd, G. A., & Mur, L. R. (2003). Effects of light on the microcystin content of Microcystis strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1475–1481. https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1475-1481.2003
- Wingreen, N. S., & Levin, S. A. (2006). Cooperation among microorganisms. *PLoS Biology*, 4(9), 1486–1488. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040299
- Wolf-Watz, H., & Miller, V. L. (2003). Host-microbe interactions: Bacteria. Bacteria and host: An eternally evolving interplay. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 6, Issue 1). https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00009-2
- Xiao, M., Li, M., & Reynolds, C. S. (2018). Colony formation in the cyanobacterium Microcystis. *Biological Reviews*, *93*(3), 1399–1420. https://doi.org/10.1111/brv.12401
- Yagi, K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15(2), 212–216. https://doi.org/10.1016/0006-2944(76)90049-1
- Yang, Z., Buley, R. P., Fernandez-Figueroa, E. G., Barros, M. U. G., Rajendran, S., & Wilson, A. E. (2018). Hydrogen peroxide treatment promotes chlorophytes over toxic cyanobacteria in a hyper-eutrophic aquaculture pond. *Environmental Pollution*, 240(March), 590–598. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.012
- You, J., Mallery, K., Hong, J., & Hondzo, M. (2018). Temperature effects on growth and buoyancy of Microcystis aeruginosa. *Journal of*

Plankton Research, 40(1), 16–28. https://doi.org/10.1093/plankt/fbx059

- Young, F. M., Thomson, C., Metcalf, J. S., Lucocq, J. M., & Codd, G. A. (2005). Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of Microcystis. *Journal of Structural Biology*, 151(2), 208–214. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.05.007
- Zhang, Y., Jiang, H. B., & Qiu, B. S. (2013). Effects of UVB Radiation on Competition between the Bloom-Forming Cyanobacterium Microcystis aeruginosa and the Chlorophyceae Chlamydomonas microsphaera1. *Journal of Phycology*, 49(2), 318–328. https://doi.org/10.1111/jpy.12038
- Zhao, Y., Yu, Z., Song, X., & Cao, X. (2009). Biochemical compositions of two dominant bloom- forming species isolated from the Yangtze River Estuary in response to different nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 368(1), 30–36. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.09.023
- Zilliges, Y., Kehr, J. C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., Kaplan, A., Börner, T., & Dittmann, E. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of Microcystis under oxidative stress conditions. *PLoS ONE*, 6(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017615
- Zilliges, Y., Kehr, J. C., Mikkat, S., Bouchier, C., De Marsac, N. T., Börner, T., & Dittmann, E. (2008). An extracellular glycoprotein is implicated in cell-cell contacts in the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2871–2879. https://doi.org/10.1128/JB.01867-07