

---

# Factores involucrados en la expansión de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* en el continente americano

---

Tesina para optar por el grado de Licenciado en Bioquímica

Bruno Cremella

2014

**Orientadora:** Sylvia Bonilla

Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias

**Coorientadora:** Claudia Piccini

Departamento de Microbiología, IIBCE

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mi madre Patricia, a mi padre Jorge, a mi hermana Luciana, a mi abuela Clara, a mis abuelos Juan y Zulma, y al resto de mi familia por todo su amor y apoyo incondicional, por su esfuerzo, por ayudarme a crecer y apoyarme en mis sueños. A mis más que amigos, hermanos: Daniel, Joaquín, Juampi, Martín, Maxi, Michel, Nacho, Pablo, Rodrigo y Tabaré. A amigos y amigas de Fray Bentos con los que he crecido y que me han acompañado.

A mi orientadora Sylvia, por su tiempo y su apoyo en la pasantía, y principalmente por brindarme su confianza y mis primeras oportunidades de trabajo por las que siempre voy a estar agradecido. A mi coorientadora Claudia, por compartir su tiempo y su experiencia siempre con buena onda.

A los compañeros y compañeras de la Sección Limnología, por recibirme cálidamente como un compañero más y por formar un entrañable grupo. A Amelia y Andrea por su ayuda en la pasantía. A los integrantes del Departamento de Microbiología del IIBCE por su ayuda y disponibilidad, especialmente a Gabriela y Germán. A Yasmín Plata-Díaz de Colombia por brindar generosamente datos no publicados de su maestría de la ciénaga de Chucurí. A la LLCD “Lake Lemon Conservancy District” del estado de Indiana, EEUU, por brindarnos acceso a informes limnológicos del lago Lemon.

A todas las maestras, profesores, y autores de libros que ayudaron de una u otra manera a mantener viva mi curiosidad.

Éste trabajo fue financiado en el marco del proyecto ANII 6384.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>1</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>2</b>
<b>1 RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
2.1 CIANOBACTERIAS .....	6
2.2 DISPERSIÓN DE MICROORGANISMOS Y ECOTIPOS .....	7
2.3 ECOESTRATEGIAS LUMÍNICAS .....	8
2.4 EL CASO DE LA CIANOBACTERIA <i>CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII</i> .....	10
2.5 <i>C. RACIBORSKII</i> EN AMÉRICA .....	11
<b>3 HIPÓTESIS Y PREDICCIONES</b> .....	<b>13</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>5 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
5.1 CULTIVOS Y CRECIMIENTO .....	15
5.1.1 <i>Mantenimiento de la cepa LB2897</i> .....	15
5.1.2 <i>Aclimatación y curvas de crecimiento</i> .....	16
5.1.3 <i>Ajuste de modelos P-I</i> .....	17
5.1.4 <i>Aislamiento de una nueva cepa local de C. raciborskii</i> .....	18
5.2 TOXICIDAD Y PRESENCIA DE GENES <i>CYR</i> EN CEPAS AMERICANAS .....	18
5.2.1 <i>Análisis de producción de saxitoxina</i> .....	18
5.2.2 <i>Presencia del gen cyrA</i> .....	19
5.3 DISTRIBUCIÓN DE <i>C. RACIBORSKII</i> EN AMBIENTES LÍMNICOS DE AMÉRICA .....	19
5.3.1 <i>Generación de matriz de datos ambientales</i> .....	19
5.3.2 <i>Análisis de rangos ambientales con presencia significativa de C. raciborskii</i> .....	20
5.3.3 <i>Análisis de máximos de C. raciborskii en gradientes de T, PT y Zeu</i> .....	20
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
6.1 CRECIMIENTO EN UN GRADIENTE LUMÍNICO .....	21
6.1.1 <i>Características de la cepa LB2897</i> .....	21
6.1.2 <i>Aclimatación y Crecimiento en un gradiente de intensidad de luz</i> .....	22
6.2 TOXICIDAD Y PRESENCIA DE GENES DE CIANOTOXINAS .....	23

6.3	VARIABLES AMBIENTALES ASOCIADAS A <i>C. RACIBORSKII</i> EN AMÉRICA .....	26
6.3.1	<i>Características de los cuerpos de agua incluidos en el estudio</i> .....	27
6.3.2	<i>Rangos de variables ambientales con presencia significativa de C. raciborskii</i> ....	27
6.3.3	<i>Máximos biovolumen y dominancia en gradientes ambientales.</i> .....	27
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
7.1	MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO .....	29
7.1.1	<i>Morfología de las cepas estudiadas</i> .....	29
7.1.2	<i>Crecimiento y ajuste al modelo P-I</i> .....	31
7.1.3	<i>Crecimiento de la cepa LB2897 en un gradiente lumínico</i> .....	33
7.2	TOXICIDAD Y GENES DE TOXINAS .....	35
7.3	DISTRIBUCIÓN DE <i>C. RACIBORSKII</i> EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS DE AMÉRICA .....	36
7.4	DISCUSIÓN GENERAL .....	39
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>42</b>
<b>10</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>52</b>
10.1	BÚSQUEDA PRELIMINAR DE GENES <i>CYR</i> EN LA CEPA LB 2897 .....	52

## 1 RESUMEN

La expansión de la cianobacteria planctónica de agua dulce *Cylindrospermopsis raciborskii* desde el trópico hacia climas subtropicales y templados constituye un potencial peligro debido a su capacidad de producir toxinas. Dentro de las hipótesis que explican su expansión se encuentran el efecto del cambio climático, su plasticidad fenotípica y la presencia de múltiples ecotipos. Diferentes  $I_k$  (intensidad de luz de saturación de la fotosíntesis, indicador de la ecoestrategia lumínica) entre ecotipos y su plasticidad fenotípica le permitirían dominar diferentes condiciones de irradiancia. Las cepas sudamericanas pueden producir saxitoxina mientras que las norteamericanas no producen toxinas, pero cepas uruguayas presentan genes del clúster para la síntesis de cylindrospermopsina (*cyr*), sugiriendo un escenario complejo de dispersión. La distribución de la especie abarca amplios rangos de variables ambientales y parece estar guiada por bajo PT, pero no se ha evaluado a nivel de todo el continente americano. En este estudio se realizó una aproximación polifásica integrando el análisis de: 1) experimentos fisiológicos a distintas intensidades de luz, 2) la determinación de un gen del clúster de cylindrospermopsina y 3) la distribución de la especie a lo largo del gradiente latitudinal del continente americano. Se analizó el crecimiento en un gradiente de luz de 3 a 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (26°C, medio BG11, cultivos *batch* con aclimatación previa), la producción de saxitoxina (ELISA) y la presencia de genes *cyr* (PCR) en la cepa norteamericana LB 2897 y en un nuevo aislamiento uruguayo (MVCC35). Además se recopiló una base de datos de la distribución y preferencias ecológicas de la especie en el continente americano. Se caracterizaron diferencias entre climas, rangos ambientales de presencia y máximos biovolumen y contribución en gradientes de T, PT y  $Z_{eu}$ . La máxima tasa de crecimiento fue de  $1.161 \pm 0.009 \text{ d}^{-1}$  en el tratamiento de 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y presentó un  $I_k$  de 60.27  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . A pesar de no ser productoras de cylindrospermopsina, ambas cepas presentaron genes del clúster *cyr*. En el caso de saxitoxinas, únicamente el aislamiento uruguayo fue capaz de producirla. La cepa LB 2897 presentó el gen *cyrA* y no produjo saxitoxina y el nuevo aislamiento (MVCC35) presentó el gen y sí produjo. El estudio de datos limnológicos permitió identificar que las poblaciones alcanzadas por la especie en el clima templado fueron diferentes a los climas subtropicales y tropicales ( $p < 0.001$ ), pero no entre éstos ( $p = 0.16$ ), y la presencia de biovolúmenes  $> 0.1 \text{ mm}^3$  ocurrió en amplios rangos ambientales. Los máximos biovolúmenes ocurrieron a temperaturas de 30.5°C, 130

$\mu\text{gL}^{-1}$  de PT y 1.3 m de  $Z_{\text{eu}}$ , la contribución porcentual tuvo un máximo a  $62 \mu\text{gL}^{-1}$  y no mostró dependencia clara con la temperatura y la turbidez. La presencia del gen *cyrA* a lo largo del continente indicaría que la producción de cylindrospermopsina estaba presente en las poblaciones *C. raciborskii* que originalmente colonizaron América. La variabilidad en la fisiología frente a la luz sugiere que varía entre ecotipos, y los datos ambientales indican que las poblaciones americanas de *C. raciborskii* poseen altas tolerancias ambientales. Además niveles eutróficos de fósforo son claves determinando la dominancia de las comunidades, siendo menos importante la temperatura y la luz.

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Cianobacterias

Las cianobacterias son un clado de microorganismos procariotas capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Existe un sólido registro fósil datado en 2.700 millones de años de antigüedad que indica su presencia y el aumento del oxígeno de la atmósfera es atribuido a éstos organismos (Whitton & Potts 2002). Forman parte del fitoplancton en ecosistemas marinos y límnicos, pudiendo llegar a dominar las comunidades. Una floración (comúnmente llamadas “bloom”, de su nombre en inglés) es un fenómeno que consiste en el súbito incremento en la biomasa de un determinado organismo del fitoplancton (Bonilla 2009). Su ocurrencia acarrea una serie de procesos que actúan en detrimento de la calidad de agua, la biodiversidad del ecosistema límnic y pueden ocasionar problemas para la salud humana o animal por la producción de toxinas, en éste caso llamándose “Harmful algae blooms” (HABs). Los HABs más importantes son producidos por dinoflagelados en ambientes marinos (mareas rojas) y por cianobacterias en ecosistemas de agua dulce, llamados “CyanoHABs” (Carmichael 2001). Recientemente el incremento de CyanoHABs ha llamado mucho la atención de las instituciones y público en general (Paerl & Huisman 2008).

Las floraciones de cianobacterias pueden generar mal olor y mal sabor en el agua debido a la producción de compuestos aromáticos como la geosmina y el 2-metilisoborneol (2-MIB) (Izaguirre et al. 1982). Las floraciones también pueden afectar los usos de recreación, debido al efecto visual y a que sus paredes bacterianas son inmunogénicas pudiendo generar alergias y erupciones en la piel al contacto (Stewart et al. 2006). También pueden afectar la industria pesquera por mortandad de peces (Chellappa et al. 2008). Se ha descrito una serie de metabolitos producidos por cianobacterias denominados cianotoxinas que poseen efectos nocivos en la salud humana tanto agudos como crónicos, produciendo muertes masivas de ganado y cuyo efecto ha sido estudiado en ratones (Chorus & Bartram 1999). Las cianotoxinas incluyen las familias de las microcistina, cylindrospermopsina, anatoxina y saxitoxina, entre otras (Leflaive & Ten-Hage 2007).

La aparición de floraciones usualmente se asocia a la eutrofización, que es el conjunto de fenómenos consecuencia de la “fertilización” de los cuerpos de agua y el subsiguiente aumento de la producción primaria (Bonilla 2009). En ambientes límnicos

dicho aumento de la producción primaria generalmente se da por un aumento de fósforo y nitrógeno, principales limitantes del crecimiento del fitoplancton (Smith & Schindler 2009). El aumento del fósforo en condiciones de limitación por nitrógeno puede llevar a floraciones de cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno, principalmente del orden Nostocales, que realizan dicha función mediante células especializadas llamadas heterocitos (Sukenik et al. 2012). La eutrofización disminuye la luz disponible en el cuerpo de agua y hace propenso un aumento de los grupos fitoplanctónicos que crecen a bajas intensidades de luz, “shade-tolerants”, como algunas cianobacterias filamentosas (Schwaderer et al. 2011), generándose un proceso de retroalimentación positiva de la dominancia de cianobacterias (Scheffer & Nes 2007; Carey et al. 2012).

La temperatura juega un rol también especial en la formación de floraciones, ya que las tasas de crecimiento de cada organismo aumentan con la temperatura. En general se considera que las cianobacterias tienen generalmente una mayor temperatura óptima de crecimiento que sus pares eucariotas, por lo que, ante el fenómeno del cambio climático y en general aumento de temperatura, poseerían una mayor capacidad de generar *blooms* frente a eucariotas fitoplanctónicos como diatomeas y dinoflagelados (Paerl & Huisman 2008; Carey et al. 2012; Paerl & Paul 2012; Beaulieu et al. 2013). Sin embargo, Lüring et al. (2013) no encontraron diferencias en la tasa de crecimiento entre cianobacterias y clorofitas (algas verdes) a altas temperaturas, sugiriendo que la intensificación de las floraciones de cianobacterias en un escenario de calentamiento global se debe a otras ventajas competitivas y no solamente a mayores tasas de crecimiento. También el aumento de temperatura podría ser el causante de que cianobacterias tropicales invadan y dominen cuerpos de agua de zonas templadas. Por ejemplo, la germinación de formas de resistencia propias del Orden Nostocales es críticamente dependiente de la temperatura, lo que fomentaría el crecimiento de dichas especies en cuerpos de agua templados (Sukenik et al. 2012).

## **2.2 Dispersión de microorganismos y ecotipos**

El cambio climático y las actividades antrópicas podrían favorecer la invasión de microorganismos tales como las cianobacterias del fitoplancton. Se ha propuesto que la dispersión de microorganismos, debido a su pequeño tamaño y enormes poblaciones, funciona bajo un régimen “todo está en todos lados, pero el ambiente selecciona” según

la visión clásica de Baas Becking (de Wit & Bouvier 2006). Dada la dinámica de los grandes números poblacionales y cortos tiempos, se podría pensar en que básicamente no hay diferencias filogeográficas (Fenchel & Finlay 2004). Sin embargo, esto no parece ser así en todos los casos, hallándose clústeres filogeográficos para muchos microorganismos como bacterias causantes de enfermedades vegetales y cianobacterias (Litchman 2010). Los eucariotas poseen unidad reproductiva a nivel de especie, mientras que los procariotas, como las cianobacterias, solo poseen unidad provista por la selección, e intercambian material genético con grupos cercanos y no cercanos. Esta coyuntura daría como resultado la diferenciación genética en ecotipos, que son el conjunto de organismos que comparten unidad fenotípica y genotípica provista por fuerzas de selección ecológica comunes (Cohan 2001). Dado los enormes números poblacionales y gran variabilidad de las poblaciones de especies que habitan diferentes cuerpos de agua, es de esperar que se diferencien en ecotipos adaptados a los nichos propios del cuerpo de agua. Para las cianobacterias, se ha detectado la diferenciación de múltiples ecotipos cohabitantes en especies oceánicas de *Prochlorococcus* adaptados a las diferentes profundidades y sus diferentes condiciones lumínicas y *Synechococcus* que habitan diferentes capas de una mata microbiana (Moore et al. 1998; Ward et al. 2006).

### 2.3 Ecoestrategias lumínicas

La luz es un recurso fundamental para el crecimiento del fitoplancton, y en los ambientes límnicos varía en cantidad y calidad, debido tanto al régimen hidrológico del sistema como a la propia presencia del fitoplancton, sedimento en suspensión y sustancias húmicas originadas a partir de la degradación de la vegetación circundante. La zona eufótica se define como la capa de agua en donde la intensidad de luz es mayor al 1% de la luz subsuperficial incidente, y comúnmente se le atribuye como la zona apta para la realización de la fotosíntesis (Kirk 1994). En lagos con estratificación térmica se define la zona de mezcla como la capa subsuperficial o epilimnion, y es aquí donde el fitoplancton circula. El cociente entre la profundidad de la zona eufótica y profundidad de la zona de mezcla ( $Z_{eu}/Z_{mix}$ ) es un indicador del régimen lumínico que percibe el fitoplancton. Si es  $<1$  los organismos pueden circular por zonas de muy baja intensidad lumínica, mientras que si es  $>>1$  el fitoplancton siempre se hallaría en condiciones no limitantes de luz (Reynolds 1994; Fabre et al. 2010).

Los diferentes organismos del fitoplancton pueden poseer diferentes estrategias para explotar los recursos lumínicos. Existen especies con tolerancia a luces muy bajas (shade-tolerants), con altos requerimientos lumínicos, con mayor crecimiento en luces intermedias, o ser altamente plástica y crecer bien a bajas y altas intensidades de luz (Reynolds 1993, 1994). La estrategia lumínica se puede caracterizar evaluando el crecimiento a las diferentes intensidades de luz en cultivos a través de una curva de respuesta llamada curva “P-I” (del inglés “photosynthesis-irradiance”), definida por las tasas máximas de crecimiento en función de la intensidad de luz de exposición. Diferentes modelos matemáticos se pueden ajustar para obtener una serie de parámetros biológicamente relevantes, que son  $\mu_{\max}$  (asíntota horizontal, máxima tasa de crecimiento),  $\alpha$  (pendiente de la porción lineal de la curva, eficiencia fotosintética), y ocasionalmente el valor  $\beta$  (pendiente de la porción lineal decreciente en intensidades de saturación) que describe la fotoinhibición del crecimiento (Jassby & Platt 1976; Falkowski et al. 1993; Schwaderer et al. 2011). Del cociente  $\mu_{\max}/\alpha$  se obtiene el  $I_k$ , el valor de intensidad correspondiente a la intersección entre la curva de  $\alpha$  y la asíntota a la máxima tasa de crecimiento, definida como la máxima capacidad de fotones que el organismo puede procesar (en unidades de intensidad de luz) y nos da una idea del nicho de intensidad de luz de los organismos.

Las cianobacterias responden a los cambios en las condiciones lumínicas por diferentes mecanismos que requieren diferentes tiempos de exposición con el fin de aumentar su eficiencia fotosintética. Las transiciones de estado son mecanismos rápidos que se dan en minutos controlados por el nivel de oxidación del ‘pool’ de plastoquinona, y consiste en desvíos de la energía de los ficobilisomas hacia un fotosistema u otro (Schubert et al. 1995; Campbell et al. 1998). En tiempos de exposición de días ocurren fenómenos de adaptación cromática, cambios en las relaciones PSI:PSII, cambios en la proteína D1 del PSII (D1:1 y D1:2), biosíntesis de carotenoides y expresión de proteínas de unión a los mismos, entre otros (Foy & Gibson 1982; Hihara et al. 2001; Schagerl & Müller 2006; Majeed et al. 2012; Vinyard et al. 2013). En general, las cianobacterias, son más eficientes en la captura de luz y crecen mejor a intensidades de luz más bajas que las algas eucariotas (Schwaderer et al. 2011).

## 2.4 El caso de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*

*Cylindrospermopsis raciborskii* es una cianobacteria filamentosa perteneciente al Orden Nostocales por lo que puede fijar nitrógeno en células especializadas (heterocitos) y forma células de resistencia (acinetes). Es una especie originalmente descrita como de origen tropical (Padisák 1997), pero recientemente ha captado la atención de la comunidad científica debido al aumento de registros de su presencia y floraciones en climas subtropicales y templados de todo el mundo (Sinha et al. 2012); esto sumado a su capacidad de producir toxinas. Diferentes cepas tienen la capacidad de producir diferentes toxinas, siendo las cepas asiáticas y australianas usualmente productoras de cylindrospermopsina, las cepas sudamericanas productoras de PSP (Paralytic Shellfish Poison), y en las cepas europeas, africanas y norteamericanas no se ha detectado producción de toxinas (Stucken et al. 2009). Para explicar su expansión hacia zonas templadas, diferentes propuestas se han planteado, incluyendo una mejor competitividad debido a una gran eficiencia de captación de nutrientes (Istvánovics et al. 2000; Shafik et al. 2001), gran plasticidad fenotípica que le permite explotar un rango amplio de condiciones (Bonilla et al. 2012), existencia de múltiples ecotipos (Piccini et al. 2011) y que un aumento global de temperaturas favorece su crecimiento (Rucker et al. 2009; Sinha et al. 2012).

El comportamiento de la especie frente a diferentes intensidades de luz ha resultado muy variable entre estudios, hallándose un comportamiento homogéneo entre diferentes cepas y describiéndolas como “shade-tolerants” con  $I_K$  en torno a  $20 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y tasas de crecimiento de  $0.5\text{-}0.7 \text{ d}^{-1}$  en algunos experimentos (Briand et al. 2004). Pero se han obtenido mayores tasas de crecimiento, diferentes  $I_K$  y marcadas diferencias entre cepas en otros (Shafik et al. 2001; Mehnert et al. 2010; Fabre 2011; González-Piana 2012), siendo quizás la metodología un factor determinante. La divergencia en la fisiología de dos ecotipos de origen geográfico cercano y altamente emparentados filogenéticamente pone en duda la homogeneidad fisiológica de la especie (Piccini et al. 2011), e incluso se han detectado diferencias fisiológicas entre diferentes aislamientos del mismo cuerpo de agua (Saker et al. 1999).

*C. raciborskii* ha sido descrita como una especie con alta afinidad y capacidad de almacenamiento de  $\text{PO}_4^{2-}$  (en forma de gránulos de polifosfato) que le permite crecer a bajas concentraciones del nutriente, pudiendo producir más biomasa por  $\text{PO}_4^{2-}$  que otras especies (Istvánovics et al. 2000). Su plasticidad fenotípica le permite adaptarse a

diferentes formas de suministro del nutriente optimizando su tasa de crecimiento, y si bien existen diferencias entre cepas en dicho comportamiento, comparten la alta afinidad y eficiencia en el uso del nutriente (Amaral et al. 2014 en prensa; Piccini et al. 2011; Martigani 2012). Bonilla et al. (2012) han mostrado que esto se refleja en los datos ambientales de *C. raciborskii* existiendo una relación negativa entre el fósforo total (PT) y la máxima contribución de la especie al fitoplancton. En el mismo sentido en un estudio enfocado en lagos de Alemania se encontraron los mayores biovolúmenes y contribuciones al fitoplancton total en los menores valores de PT y las mayores relaciones NT/PT de los hallados para los representantes del Orden Nostocales, alcanzando las mayores biomásas de dicho Orden (Dolman et al. 2012). Menores PT indicarían una menor biodisponibilidad de  $\text{PO}_4^{2-}$ , ya que en experimentos que midieron el estado estacionario en la incorporación de fosfato por comunidades naturales encontraron que el PT era el mejor indicador comúnmente usado de la verdadera biodisponibilidad del nutriente (Vandergucht et al. 2013).

Múltiples análisis genéticos evidencian la presencia de clústeres filogeográficos continentales que indican una dispersión mundial antigua de la especie (Dyble et al. 2002; Neilan et al. 2003; Gugger et al. 2005; Piccini et al. 2011). Parece existir una relación entre la toxicidad y los clústeres filogeográficos, siendo las cepas de Australia y Nueva Zelanda productoras de cylindrospermopsinas y las cepas sudamericanas de saxitoxinas, denominados “toxitipos” (Sinha et al. 2012). Sin embargo, dentro de cada clúster la toxicidad no se relaciona con la filogenia (Stucken et al. 2009). Se ha caracterizado el clúster *cyr* de biosíntesis de cylindrospermopsina en 3 cepas australianas (Mihali et al. 2008; Sinha et al. 2014) y el clúster *sxt* de biosíntesis de saxitoxina en una cepa de Brasil (Kellmann et al. 2008). Se han secuenciado los genomas de *C. raciborskii* CS-505, CS-506 y CS-509 (Australia) y *Raphidiopsis brooki* D9 (Brasil), los cuales presentan una gran homología entre sí, y constituyen los genomas más pequeños de cianobacterias filamentosas (Stucken et al. 2010; Sinha et al. 2014).

## 2.5 *C. raciborskii* en América

La capacidad de *C. raciborskii* de producir toxinas es variable a lo largo del continente americano. La producción de PSP (saxitoxinas y sus análogos) se ha

encontrado solo en aislamientos sudamericanos, existiendo allí también aislamientos no tóxicos (Sant'Anna et al. 2008; Piccini et al. 2011; Hoff-Risseti et al. 2013). En Norteamérica no se ha detectado producción de toxinas por la especie (Yilmaz & Phlips 2011b). Existen registros de la presencia de *C. raciborskii* en el Norte y Sur del continente con más de 50 años de antigüedad (Padisák 1997). Latitudinalmente se ha encontrado desde Canadá (Hamilton et al. 2005) hasta Uruguay (Vidal & Kruk 2008), con un amplio número de casos en lagos, ríos y embalses de Estados Unidos y Brasil (Holland et al. 2006; Sant'Anna et al. 2008). En el estado de Indiana (EEUU) se encontró una amplia distribución de la especie (Jones & Sauter 2005). En Brasil la especie está muy extendida y constituye un gran problema en la sanidad y calidad de agua del país (Sant'Anna et al. 2008; Soares et al. 2013).

En Norteamérica, Yilmaz y Phlips (2011b) analizaron la presencia de los genes involucrados en la síntesis de diferentes toxinas para 20 cepas de Florida (EEUU) y la cepa LB 2897 (proveniente de Indiana, EEUU). Ninguna de ellas presentó secuencias correspondientes a los genes *mcyA* y *mcyB* (microcistina), *cyrA* y *cyrB* (cylindrospermopsina) y *sxtA4* (saxitoxina), ni se detectaron toxinas por ELISA. En otro trabajo en muestras ambientales de Florida se encontraron secuencias de *cyrB* con alta homología con cepas australianas de *C. raciborskii* (Yilmaz & Phlips 2011a). La reciente detección de genes *cyr* en cepas sudamericanas (que no producen cylindrospermopsina) es un hecho que puede cambiar las perspectivas acerca de la dispersión de la especie (Piccini et al. 2013; Hoff-Risseti et al. 2013).

En Uruguay, ha sido hallada en el lago Javier, lago Leandro y la laguna Chica del Departamento de Canelones, y en la laguna Blanca y la laguna del Sauce, en Maldonado (Vidal & Kruk 2008; Fabre et al. 2010). Las cepas MVCC19 y MVCC14 fueron aisladas del lago Javier y de la laguna Blanca, respectivamente. Presentan entre sí diferencias ecofisiológicas en su crecimiento respecto a diferentes intensidades de luz, diferencias de producción de toxinas a diferentes condiciones nutricionales y diferencias de secuencia en genes conservados (Piccini et al. 2011). En el otro extremo latitudinal de su distribución en América, la cepa LB 2897 de la Universidad de Texas (UTEX) fue aislada del lago Lemon en Indiana en 2005, no habiéndose detectado toxinas (Clark & Jones 2006). No se han hecho estudios ecofisiológicos comparativos entre cepas del Norte y el Sur de su distribución latitudinal, y los mismos podrían reflejar motivos comunes o diferentes detrás de su expansión en ambos extremos. Dado que *C.*

*raciborskii* en América constituye un clúster filogenéticamente distinto, podría ser que su distribución esté asociada a diferentes rangos de variables ambientales y caracteres fenotípicos que los descritos en análisis de otras regiones.

### 3 HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

#### **Hipótesis 1:**

Las algas y cianobacterias pueden optimizar su crecimiento aclimatándose a diferentes condiciones lumínicas con respuestas que pueden requerir días (Stomp et al. 2008). Comúnmente los experimentos no respetan el tiempo de aclimatación, obteniéndose parámetros de crecimiento sesgados que afectan la comprensión de la ecología de los organismos (Gerla et al. 2011). *C. raciborskii* se ha descrito como una especie de sombra, pero tras aclimatación extensiva se vio que la intensidad de luz óptima varía a nivel de ecotipos y la tasa de crecimiento en su  $I_k$  fue mayor que la registrada en la literatura (Fabre 2011; Piccini et al. 2011; González-Piana 2012). Se plantea entonces la siguiente hipótesis:

La plasticidad fenotípica de *C. raciborskii* le permite aclimatarse a diferentes condiciones lumínicas optimizando su crecimiento, y la ecoestrategia lumínica varía a nivel de ecotipos.

**Predicción:** La cepa LB 2897 presentará valores de  $\mu$  en su  $I_k$  superiores a los obtenidos para la especie en experimentos sin aclimatación, y los parámetros  $\alpha$  y  $\mu_{max}$  serán diferentes a los de las cepas del extremo sur de su distribución en el continente (MVCC14 y MVCC19).

#### **Hipótesis 2:**

La presencia de clústeres filogeográficos con diferente capacidad de producción de toxinas sugiere una dispersión temprana de *C. raciborskii*, siendo las cepas de Australia y Nueva Zelanda productoras de cylindrospermopsina y las cepas sudamericanas productoras de saxitoxina. La presencia de genes de biosíntesis de cylindrospermopsina en cepas sudamericanas que no producen la toxina podría deberse, a lo largo de la evolución, a una colonización del continente por cepas de Australia/Nueva Zelanda que perdieron la funcionalidad del clúster *cyr*, o a una ganancia independiente más reciente por transferencia horizontal (Piccini et al. 2013;

Hoff-Rissetti et al. 2013). Las cepas norteamericanas se han descrito como no tóxicas, pero podrían poseer genes de *cyr* que aporten a la comprensión de su distribución. Se plantea entonces la siguiente hipótesis:

*C. raciborskii* posee genes del clúster de biosíntesis de cylindrospermopsina a lo largo del continente americano aunque no produzcan la toxina.

**Predicción 1:** La cepa LB2897 no produce saxitoxina al contrario que los aislamientos uruguayos.

**Predicción 2:** La cepa LB2897 de *C. raciborskii* no produce cylindrospermopsina pero, al igual que cepas uruguayas, presenta genes correspondientes al clúster *cyr*.

### **Hipótesis 3:**

*Cylindrospermopsis raciborskii* ha sido caracterizada como especie tropical con preferencias por las altas temperaturas (Padisák 1997), lo que ha hecho plantear al calentamiento global como el principal motor de su expansión (Briand et al. 2004; Sukenik et al. 2012; Sinha et al. 2012). La presencia de la especie en climas templados sin diferencias con los climas tropicales y subtropicales indica que esto no es así, sumado a que su contribución máxima al fitoplancton no se encuentra asociada a la temperatura ni a la disponibilidad de luz (Bonilla et al. 2012). La distribución de *C. raciborskii* abarca un amplio rango de condiciones ambientales, pero sus máximos de biomasa ocurren en niveles eutróficos de fósforo disminuyendo a mayores concentraciones del nutriente (Dolman et al. 2012; Bonilla et al. 2012). Esto concuerda con una alta afinidad y capacidad de almacenamiento de fosfato, y una mayor producción de biomasa por unidad de fósforo (Istvánovics et al. 2000). Planteamos entonces la hipótesis:

En América *C. raciborskii* no es una especie tropical y los tamaños poblacionales no varían en un gradiente latitudinal. Su éxito es independiente respecto a la luz y la temperatura debido a la variabilidad entre ecotipos en estos aspectos fisiológicos, mientras que domina el fitoplancton en ambientes de moderada eutrofia según fósforo total.

**Predicción 1:** No existen diferencias significativas en las distribuciones de biovolumen entre los climas tropical, subtropical y templado.

**Predicción 2:** La contribución total al fitoplancton (% biovolumen de *C. raciborskii* del biovolumen total) disminuye al aumentar el fósforo total por encima de niveles eutróficos y no muestra una relación clara con la temperatura y la zona eufótica.

## 4 OBJETIVOS

### Objetivo general:

Caracterizar la situación de la distribución de *C. raciborskii* en América mediante múltiples acercamientos que incluyen caracterizar el crecimiento y la presencia de genes de cianotoxinas de una cepa del extremo Norte de su distribución para comparar con las cepas del extremo Sur, y analizar el comportamiento de la especie en gradientes ambientales.

### Objetivos específicos:

1. Caracterizar el crecimiento de la cepa LB2897 de *C. raciborskii* en un gradiente de luz.
2. Comparar la capacidad de producción de saxitoxina y la presencia de genes *cyr* entre las cepas LB2897 y un nuevo aislamiento del lago Javier.
3. Analizar la distribución de *C. raciborskii* en un gradiente latitudinal de América en relación a variables ambientales.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivos y crecimiento

#### 5.1.1 Mantenimiento de la cepa LB2897

Todos los cultivos se mantuvieron en la cámara de la Sección Limnología de Facultad de Ciencias a 26°C y fotoperíodo de 16:8 (luz blanca, fría). La cepa LB2897 (Universidad de Texas, xénica, unialgal) se cultivó en medio BG-11 (Stanier et al. 1971) sin nitrógeno adicional a intensidades de luz de 30  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  medidas con un fotoradiómetro 4 $\pi$  (Li-Cor) hasta obtener un cultivo madre de 400 mL en un matraz cónico de borosilicato de 1 l. Los cultivos permanecieron estáticos y se agitaron

manualmente a diario. El cultivo madre se mantuvo en la fase estacionaria transfiriéndose una vez por mes a un nuevo recipiente con medio fresco en volúmenes 1:1 cultivo:medio.

### 5.1.2 Aclimatación y curvas de crecimiento

Se prepararon sub-cultivos de la cepa LB2897 en medio BG-11 expuestos a diferentes intensidades de luz en condiciones de agitación intermitente (50 rpm, 20 minutos cada etapa) en matraces cónicos de borosilicato de 250 mL con 100 mL de cultivo. Se siguió su crecimiento mediante la turbidez dada por la absorbancia a 750 nm ( $Abs_{750nm}$ ) y se midió la absorbancia a 440 nm ( $Abs_{440nm}$ ) para estimar la extinción interna de la luz por la propia biomasa de los cultivos con un espectrofotómetro Evolution 60 (Thermo Scientific). El blanco de la turbidez fue medio BG-11. Los cultivos se repicaron al pasar las 0.2  $U_{Abs_{750nm}}$  (unidades de absorbancia a 750 nm) con el mismo medio para evitar la disminución de la luz promedio percibida por las células y permitir la aclimatación a la luz externa. Se midió la turbidez antes y después de la dilución que varió dependiendo del tratamiento, hasta obtener 0.02 - 0.05  $U_{Abs_{750nm}}$ . Se obtuvo la tasa de crecimiento de aclimatación a partir de la pendiente de los últimos 5 días de la curva  $\ln(Abs_{750nm})$  vs. tiempo (días) ajustando la biomasa según la dilución hecha en cada repique. La luz percibida por los organismos se calculó según (Kenesi et al. 2008) a partir de la luz incidente y en el centro del recipiente según la fórmula:

$$I_{est} = \sqrt{I_0 I_C}$$

donde  $I_{est}$  es la intensidad de luz estimada percibida por los organismos ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ),  $I_0$  es la intensidad de luz incidente de tratamiento ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e  $I_C$  es la intensidad de luz en el centro del frasco ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).  $I_C$  se estimó a partir de la  $Abs_{440nm}$  según;

$$I_C = I_0 * e^{-k_d r}$$

en dónde  $r$  representa el radio del matraz (cm) y el  $k_d$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) es una propiedad de los cuerpos de agua que representa la constante de extinción de PAR (radiación fotosintéticamente activa), que se puede estimar mediante la ley de Lambert-Beer con la  $Abs_{440nm}$  según Kirk (1994):

$$k_d = \frac{Abs_{440nm}}{l}$$

en las que  $l$  representa el camino óptico de la celda (1 cm). La aclimatación a  $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se realizó aumentando  $I_0$  de manera secuencial ( $35\text{-}85\text{-}200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) hasta el día 8 para evitar fotodaño.

El experimento se inició separando en 3 réplicas cada cultivo previamente aclimatado en matraces cónicos de borosilicato de 125 mL con 50 mL de cultivo. La turbidez inicial de cada sub-cultivo estuvo en el rango de 0.01-0.05 UAbs<sub>750nm</sub>. Siguiéndose el crecimiento diario y la luz interna estimada como se hizo en la aclimatación, se obtuvo la tasa de crecimiento diaria como el cambio en el  $\text{Ln}(\text{Abs}_{750nm})$  por unidad de tiempo entre medidas consecutivas y la tasa de crecimiento en la fase exponencial como la pendiente de la porción lineal de la curva  $\text{Ln}(\text{Abs}_{750nm})$  vs.  $t(\text{d})$ .

### 5.1.3 Ajuste de modelos P-I

La función de Fotosíntesis vs. Irradiancia sin inhibición propuesta por Jassby & Platt (1976) se ajustó mediante el programa TableCurve 2D (Systat Software);

$$\mu = \mu_{\max} \tanh\left(\frac{\alpha I}{\mu_{\max}}\right)$$

en donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento ( $\text{d}^{-1}$ ),  $I$  es la intensidad de luz incidente ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ),  $\alpha$  es la pendiente inicial sin saturación ( $\text{m}^2\text{s} \mu\text{mol fotón}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) y  $\mu_{\max}$  es la tasa máxima de crecimiento ( $\text{d}^{-1}$ ), a dos selecciones diferentes de datos. El primero consistió en las tasas de crecimiento diarias de las curvas de crecimiento ( $I_{\text{est final}}$ ), y el segundo consistió en las pendientes de ajustes lineales a la fase exponencial ( $I_{\text{est}}$  promedio entre puntos). Las réplicas que presentaron fase lag no fueron usados en el ajuste que se realizó con las pendientes de la fase exponencial por considerarse no aclimatados. Sólo dos casos presentaron fase lag (tratamientos de 3 y  $60 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), lo que llevó a que dichos tratamientos no fueran usados en el modelado de la curva P-I.

#### 5.1.4 **Aislamiento de una nueva cepa local de *C. raciborskii*:**

Se aisló una nueva cepa de *C. raciborskii* del lago Javier (Canelones, Uruguay) empleando diferentes medios de cultivo y condiciones lumínicas. Se realizó primero un enriquecimiento de organismos diazotróficos con medio BG11-N (sin nitrógeno adicional), seguido de un tratamiento con BG11-N con cicloheximida ( $50 \mu\text{g l}^{-1}$ ) para eliminar eucariotas presentes (principalmente ciliados). Posteriormente el pre-cultivo estuvo conformado principalmente por individuos de *C. raciborskii* con presencia de otros géneros como *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon* y *Planktolyngbya*. Se probaron diferentes medios de cultivo con diluciones seriadas. Los medios Spirulina y DYIII (Andersen 2005) produjeron un gran aumento de *Planktolyngbya*. En placas de agarosa 1% diluida en medio BG11 sembradas con  $100 \mu\text{l}$  de cultivo mediante rastrillo se observó un gran aumento de *Planktolyngbya* y no se observó crecimiento de *Cylindrospermopsis*. En cultivos expuestos a mayores intensidades de luz se observó un incremento en *Aphanizomenon*. Diluciones seriadas del cultivo en medio BG11 sin nitrógeno saturado con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , siguiendo los resultados de Holland et al. (2012), produjeron un cultivo con solo *Cylindrospermopsis* y *Planktolyngbya*. Finalmente, repiques consecutivos con diluciones mayores a 1/100 en medio BG11 sin nitrógeno produjeron un aislamiento unialgal, que se catalogó como MVCC35 en el cepario de la Sección Limnología (Facultad de Ciencias).

## 5.2 **Toxicidad y presencia de genes *cyr* en cepas americanas**

### 5.2.1 **Análisis de producción de saxitoxina**

Cultivos de las cepas LB2897 y MVCC35 en estado estacionario en medio BG11-N y expuestos a  $30 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fueron analizados en su capacidad de producir saxitoxina mediante un kit comercial de inmunoensayos de tipo ELISA (Abraxis), con un límite de detección de  $0.02 \text{ ng/mL}$ . Muestras de  $9 \text{ mL}$  de cultivo más  $1 \text{ mL}$  de fijador se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$  y fueron enviadas al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química (equipo de investigación de la Dra. Beatriz Brena) para ser analizadas.

### 5.2.2 Presencia del gen *cyrA*

Se extrajo ADN de cultivos stock de la cepa LB 2897 y MVCC35 mediante el ZR Soil Microbe DNA Mini Prep (Zymoresearch) siguiendo un protocolo modificado en que se sonicaron durante 10 segundos 1 mL de cada cultivo y se siguió del paso 4 al 10 del instructivo del fabricante.

La reacción de PCR fue realizada en un volumen de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo PCR Buffer 1 $\times$  (Invitrogen), 1 UA *Taq*-polimerasa (Invitrogen), 0.4 mM de cada dNTP (Invitrogen), 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 pM de los primers CYLTOXf (5'-GCGCTTCTAGAATCACAGGG-3', posición en el gen *cyrA*: 157-196) y CYLTOXr (5'-TGCGAAAGGGAATTGGATAG-3', posición en el gen *cyrA*: 979-960) (Piccini et al. 2013), 1.75  $\mu\text{L}$  de Seroalbúmina bovina (30 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) y 2  $\mu\text{L}$  de muestra (tamaño esperado de amplicón: 823 pb). Agua de PCR fue usada como control negativo. La reacción consistió de un ciclo inicial de 5 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 55°C y 1 min a 72°C, y un ciclo final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.5% durante 40 min a 110 V y se visualizaron mediante tinción con Gelred 1x durante 25 min con agitación. Se tomaron fotos del gel en un transiluminador ultravioleta. El contraste y el color de las fotos fueron ajustados con el programa ImageJ.

## 5.3 Distribución de *C. raciborskii* en ambientes límnicos de América

### 5.3.1 Generación de matriz de datos ambientales

Se recopilaron 404 datos ambientales de *C. raciborskii* provenientes de artículos publicados en revistas científicas (12), informes técnicos y tesis (3) y comunicaciones personales (2), que contuvieran información de al menos una variable indicadora de biomasa de *C. raciborskii* (biovolumen, número de células o porcentaje de biovolumen de *C. raciborskii* del fitoplancton total) asociado a datos fisicoquímicos ambientales de ecosistemas límnicos en América (Chapman & Schelske 1997; Zalocar de Domitrovic et al. 1998; Bouvy et al. 2000; Plata-Díaz 2001; Hamilton et al. 2005; Clark & Jones 2006; Costa et al. 2006; Hong et al. 2006; Conroy et al. 2007; Vidal & Kruk 2008; Dantas et al. 2008; Moschini-Carlos et al. 2009; Soares et al. 2009; Calandrino & Paerl 2011; Bonilla et al. 2012; Gomes 2012). En los casos que solo contenían número de células como indicador de biomasa, se transformó a biovolumen usando promedios de

medidas morfométricas disponibles en la literatura de cepas aisladas de cuerpos de agua. No fueron incluidas fuentes que solo cuantificaran *C. raciborskii* como número de individuos. La base de datos incluyó 290 entradas de biovolumen de *C. raciborskii* y 131 entradas de %biovolumen fitoplanctónico total de *C. raciborskii*. Se buscaron diferencias significativas entre las distribuciones de biovolumen de climas tropicales (n=150), subtropicales (n=111) y templados (n=29) mediante test pareados de Kruskal-Wallis.

### 5.3.2 **Análisis de rangos ambientales con presencia significativa de *C. raciborskii***

De la matriz de datos ambientales fueron seleccionadas aquellas entradas que presentaron un biovolumen de *C. raciborskii* mayor a 0.1 mm<sup>3</sup>. De ésta selección se obtuvieron las medianas, mínimos, máximos y percentiles 10 y 90 de las variables ambientales temperatura (°C), área (há), profundidad media ( $Z_{med}$ , m), profundidad máxima ( $Z_{max}$ , m), profundidad de la zona eufótica ( $Z_{eu}$ , m), relación zona eufótica-zona de mezcla ( $Z_{eu}/Z_{mix}$ ), pH, conductividad (K,  $\mu\text{Scm}^{-1}$ ), fósforo total (PT,  $\mu\text{gl}^{-1}$ ), clorofila-*a* por extracción ( $\mu\text{gl}^{-1}$ ), biovolumen de fitoplancton total ( $\text{mm}^3\text{l}^{-1}$ ), biovolumen de *C. raciborskii* ( $\text{mm}^3\text{l}^{-1}$ ) y % biovolumen total de *C. raciborskii*. Las mismas conforman las usadas por Bonilla et al. (2012) con excepción de la profundidad de la zona de mezcla, el número de especies y la alcalinidad, e incluyendo  $Z_{med}$ ,  $Z_{eu}$  y la concentración de clorofila-*a*. La falta de datos de  $Z_{med}$  y  $Z_{mix}$  hizo que no se utilizara el cociente  $Z_{eu}/Z_{mix}$ . La  $Z_{eu}$  se utilizó como indicador de penetración de la luz y los casos que sólo presentaban profundidad del disco de Secchi ( $Z_{Secchi}$ , m) se transformaron estimativamente a  $Z_{eu}$  (m) según el  $k_d$  ( $\text{m}^{-1}$ ):

$$k_d = \frac{1.7}{Z_{Secchi}}$$

$$Z_{eu} = \frac{4.6}{k_d}$$

### 5.3.3 **Análisis de máximos de *C. raciborskii* en gradientes de T, PT y Zeu**

Se obtuvieron los máximos biovolúmenes y % de biovolumen total fitoplanctónico correspondiente a *C. raciborskii* para categorías definidas por rangos determinados en gradientes de temperatura (T), fósforo total (PT) y profundidad de la

zona eufótica ( $Z_{eu}$ ). Las categorías usadas fueron determinadas conteniendo al menos 5 datos, y los máximos hallados se asignaron al valor superior del rango. Los 5 mayores valores de cada variable ambiental se situaron en una única categoría asignándole el valor de variable ambiental correspondiente al máximo biovolumen o % biovolumen total de los mismos.

Los puntos de máximo biovolumen o % biovolumen total vs. rango de variable fueron ajustados a diferentes funciones en el programa TableCurve 2D (Systat Software) para obtener tendencias del comportamiento de la especie en los diferentes gradientes ambientales, se ajustaron funciones del paquete “peak functions” incluido en el programa o en el caso que no se vea un claro máximo se procedió a ajustar funciones sencillas del paquete “simple functions”.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Crecimiento en un gradiente lumínico

Para caracterizar el crecimiento en un gradiente de luz de una cepa del extremo Norte de la distribución latitudinal de *C. racibroskii* en América, la cepa norteamericana LB2897 fue cultivada en medio BG-11, 26°C y agitación intermitente fueron expuestos a diferentes intensidades de luz externa constante (3, 20, 28, 37, 54, 60, 80, 120 y 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) durante períodos de entre 9-19 días y repicándose al alcanzar una densidad óptica de 0.2  $\text{UAbs}_{750\text{nm}}$  (para evitar que disminuya la luz interna) para alcanzar el estado aclimatado. Dichos cultivos se separaron en 3 subcultivos que se expusieron a intensidades de luz similares (3, 10, 20, 37, 45, 60, 80, 120 y 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y se siguió su crecimiento hasta finalizar la fase exponencial. Las tasas de crecimiento diarias y tendenciales de la fase exponencial se compararon en su ajuste a un modelo P-I sin inhibición.

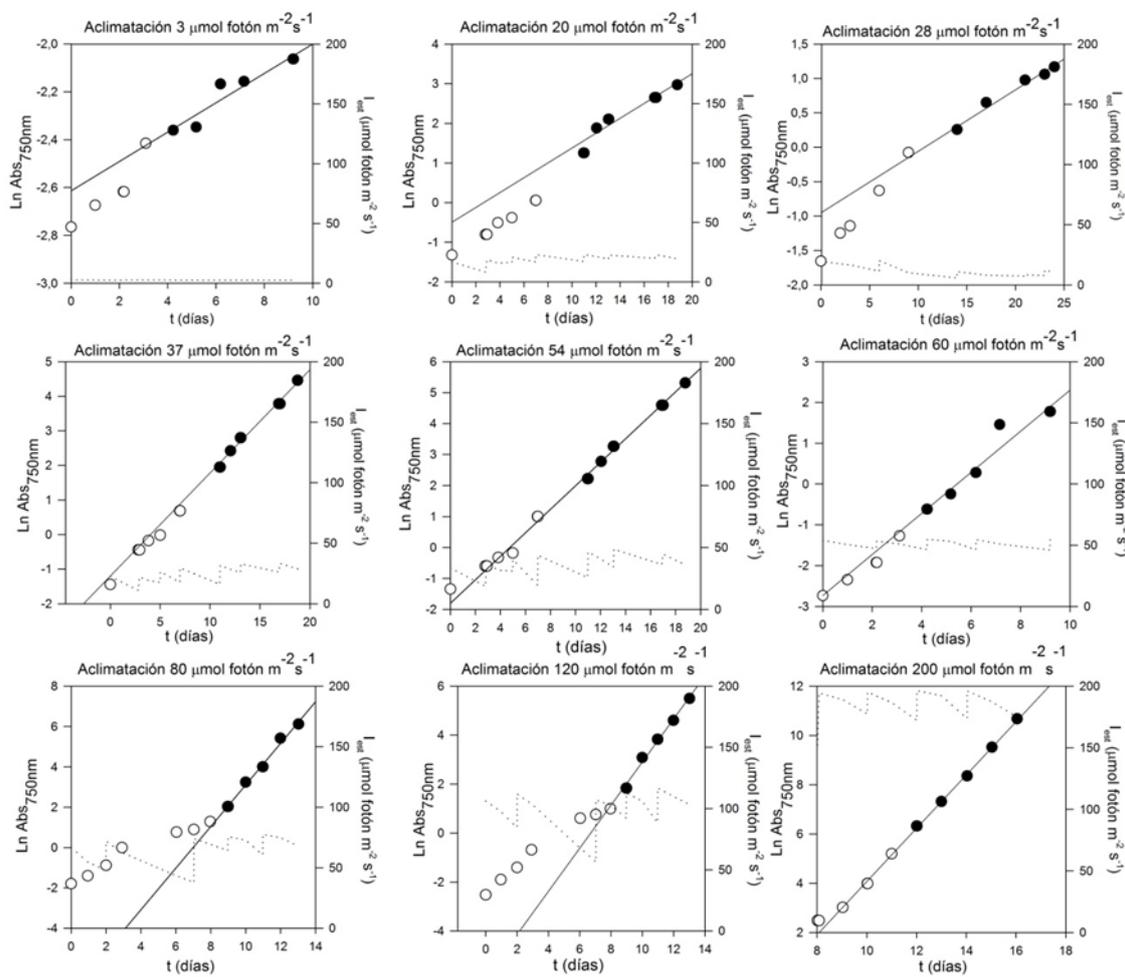
#### 6.1.1 Características de la cepa LB2897

La cepa creció en forma de filamentos individuales o unidos a través de sus heterocitos, siempre con tricomas rectos levemente curvados. Las células fueron cilíndricas ( $2.06 \pm 0.16 \mu\text{m}$  de ancho,  $8.3 \pm 1.9 \mu\text{m}$  de largo) y los filamentos variaron ampliamente en su largo máximo ( $440 \mu\text{m} - 27.5 \mu\text{m}$ ). Los heterocitos fueron terminales, siempre uno por filamento. En varios casos se observó que los filamentos

por sus heterocitos, mediado por mucílago, formando redes de varios filamentos. Esta estructura era laxa y poco consistente a la agitación. La cepa creció en medio sin nitrógeno alcanzando altas biomásas. No se observó en ningún caso la presencia de acinetes (Figura IV, Anexo).

### 6.1.2 Aclimatación y Crecimiento en un gradiente de intensidad de luz

La aclimatación a las diferentes intensidades de luz mostró mayores tasas de crecimiento a mayores intensidades de luz, excepto por la pendiente a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Fig. 1, Tabla 1). Las curvas de crecimiento mostraron una fase exponencial que



**Figura 1.** Aclimatación de *C.raciborskii* a los diferentes tratamientos. La intensidad de luz incidente se indica sobre cada gráfico. (•) Datos usados para el ajuste (o) Datos no usados para el ajuste (—) Tasa de crecimiento de los últimos 5 días ( $\mu_{\text{últ5}}$ ) (...) Intensidad de luz estimada percibida por los organismos ( $I_{\text{est}}$ )

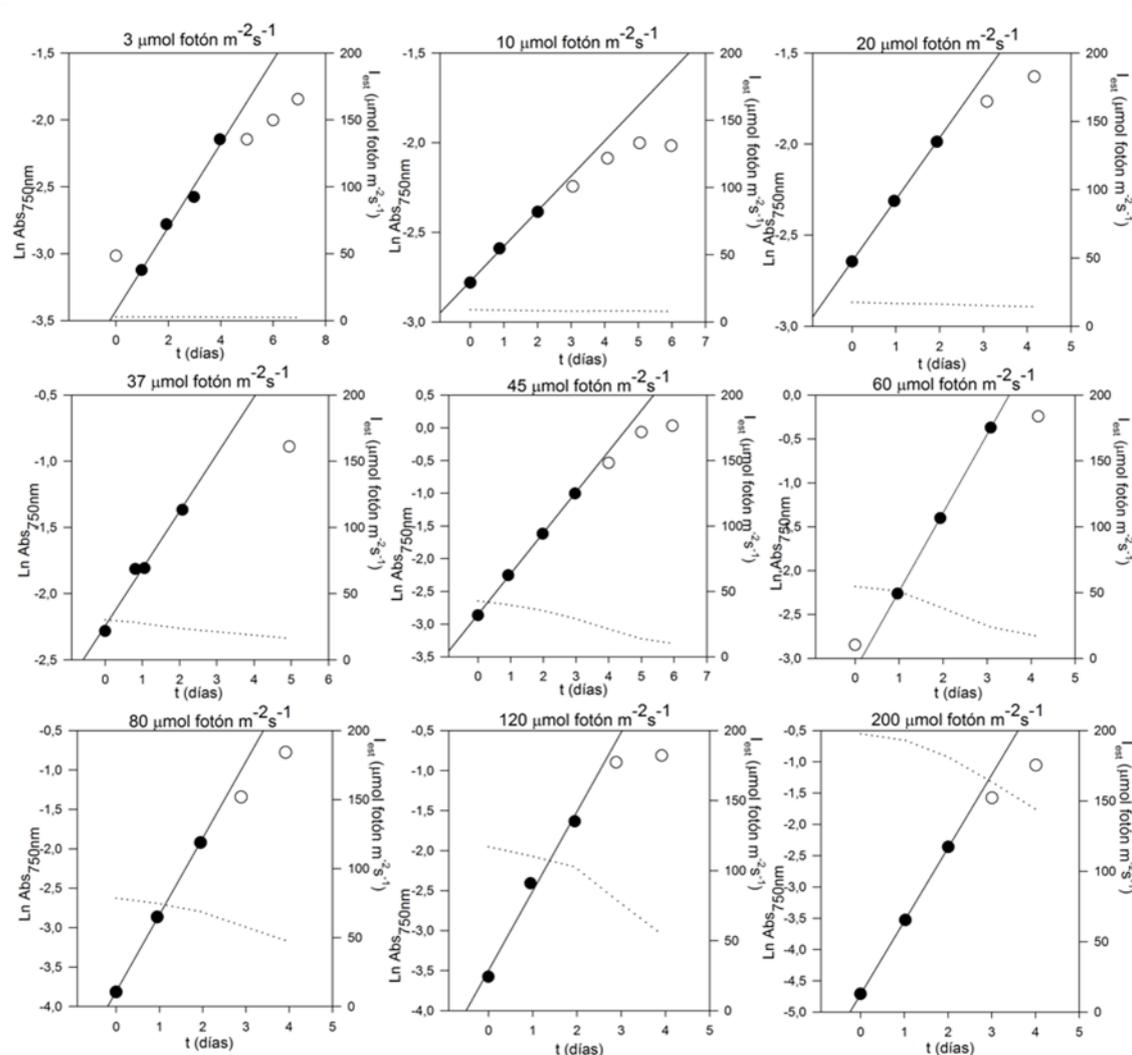
**Tabla 1.** Tasa de crecimiento de aclimatación en relación a la intensidad de luz. Se indica la intensidad de luz incidente de cada tratamiento, la intensidad de luz estimada promedio, mínima y máxima de los últimos 5 días, la tasa de crecimiento calculada a partir del ajuste lineal de la Fig. 1 y el  $r^2$  de los ajustes lineales.

Tratamiento ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$I_{\text{últ5}}$ ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) Prom. (mín-máx)	$\mu_{\text{últ5}}$ ( $\text{d}^{-1}$ )	$r^2$
3	2.6 (2.5-2.7)	0.061	0.911
20	20.6 (17.3-22.9)	0.187	0.918
28	8.8 (5.7-12.0)	0.089	0.979
37	27.8 (16.1-33.3)	0.298	0.988
54	39.0 (25.8-48.5)	0.379	0.993
60	51.2 (46.0-57.3)	0.503	0.944
80	71.5 (60.6-77.4)	1.031	0.988
120	106.2 (88.6-116.6)	0.880	0.989
200	184.7 (172.4-196.3)	1.081	0.998

no resentó fase lag excepto en los tratamientos 3 y 60  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La fase exponencial fue de 3 días excepto para los tratamientos de 3 y 45  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en los que fue de 4 días. No se vio decrecimiento significativo en la tasa de crecimiento a las mayores luces que sugiriera el uso de un modelo con fotoinhibición (Fig. 2, Tabla 2). La tasa máxima de crecimiento diaria hallada fue de  $1.25 \text{ d}^{-1}$  a una  $I_{\text{est}}$  de  $109 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en el tratamiento de  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Se probaron dos selecciones diferentes de resultados, las tasas de crecimiento diarias y las pendientes de las fases exponenciales (porción lineal en el gráfico  $\text{Ln}(\text{Abs}_{750\text{nm}} \text{ vs. } t)$ ). El ajuste al modelo fotosíntesis-irradiancia (Jassby & Platt 1976) indicó resultados similares para ambas selecciones (Fig. 3, Tabla 3). Los tratamientos que presentaron fase lag no ajustaron bien al modelo utilizado (datos no mostrados).

## 6.2 Toxicidad y presencia de genes de cianotoxinas

Dos cepas de *C. raciborskii*, la cepa norteamericana LB2897 y un nuevo aislamiento uruguayo denominado MVCC35 obtenido en este trabajo fueron comparados en su capacidad de producir saxitoxina y en la presencia del gen *cyrA* del clúster de producción de cylindrospermopsina para entender mejor la relación entre la toxicidad y la geografía en el continente.



**Figura 2.** Curvas de crecimiento de *C. raciborskii* a diferentes intensidades de luz. Se muestra la réplica 1 (de 3) de los diferentes tratamientos de luz incidente, indicados sobre cada gráfico. (•) Datos usados para el ajuste (o) Datos no usados para el ajuste (—) Tasa de crecimiento en la fase exponencial ( $\mu_{\text{FaseExp}}$ ). (...) Intensidad de luz estimada percibida por los organismos ( $I_{\text{est}}$ )

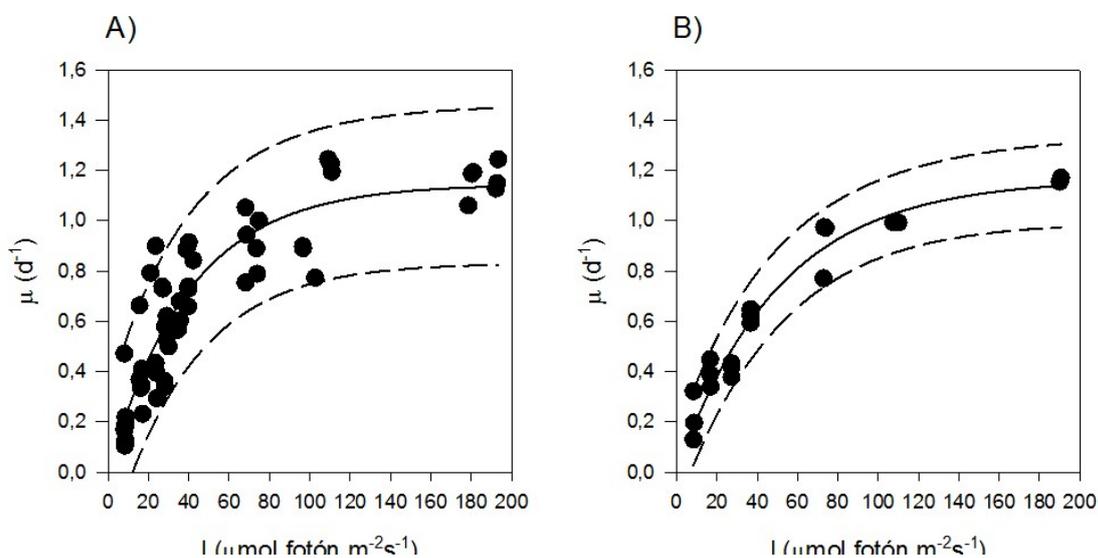
La cepa MVCC35 creció de forma de filamentos individuales rectos y presentando hasta 2 heterocitos por filamento, con capacidad de alcanzar altas biomásas en medio sin nitrógeno y generó acinetes (Figura V, Anexo).

Los resultados de analizar la concentración de saxitoxina (método ELISA) en cultivos densos ( $\text{Abs}_{750\text{nm}} > 1$ , del orden de  $10^7$  cél mL<sup>-1</sup>) de *C. raciborskii* no se detectó STX ( $< 0.02$  ng/mL) en la cepa LB 2897 mientras que por el contrario la cepa MVCC35 presentó una concentración de saxitoxina  $> 24$  ng/mL.

**Tabla 2.** Tasa de crecimiento e intensidad de luz de la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada tratamiento. Se indica la intensidad de luz incidente de tratamiento, la intensidad de luz estimada promedio y desvío para la fase exponencial, el promedio y desvío de las tasas de crecimiento calculadas a partir de los ajustes lineales ejemplificados en la figura 2, y el  $r^2$  de los ajustes lineales.

Tratamiento ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{d}^{-1}$ )	$I_{\text{est}}$ ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$r^2$ (réplicas 1/2/3)
3	0.284±0.026	2.657±0.015	0.9796/0.9784/0.875
10	0.216±0.098	8.480±0.164	0.9967/0.9397/0.9914
20	0.392±0.055	16.660±0.131	0.9999/0.9282/0.999
37	0.410±0.029	27.257±0.006	0.9791/0.991/0.9829
45	0.622±0.027	36.733±0.006	0.9997/0.9952/0.9924
60	0.927±0.102	37.303±0.472	1/0.9983/0.9903
80	0.905±0.117	73.307±0.533	0.9997/0.9998/0.9977
120	0.993±0.000	108.627±1.320	0.9829/0.9829/0.9829
200	1.161±0.009	190.237±0.338	0.9999/0.9979/0.9998

El estudio genético permitió demostrar que ambas cepas mostraron un amplicón



**Figura 3.** Relación de la tasa de crecimiento y la intensidad de luz ( $\mu$  vs.  $I$ ). a) Todas las tasas de crecimiento instantáneas vs. la intensidad de luz estimada, b) Tasas calculada a partir de la fase exponencial vs. el promedio de la fase exponencial de intensidades de luz estimadas. (•) Tasas de crecimiento en función de la intensidad de luz obtenidas de las curvas de crecimiento. (—) Ajuste del modelo P-I sin inhibición (Jassby & Platt, 1976). (---) Límites de predicción (95%).

**Tabla 3.** Parámetros de ajuste de los datos de crecimiento en función de la intensidad de luz al modelo de Fotosíntesis-Irradiancia de Jassby & Platt (1976) mediante dos métodos de cálculo de tasa de crecimiento diferentes: La tasa de crecimiento calculada como la pendiente de la fase exponencial de la curva Ln ( $Abs_{750nm}$ ) vs. t (d), y las tasas de crecimiento diarias de la fase exponencial.

Cálculo de tasa de crecimiento	Parámetro	Error		$I_k$	$r^2$
		Valor	estándar		
pendientes fase exponencial*	$\mu_{max}$	1.1089	0.0385	60.27	0.9461
	$\alpha$	0.0184	0.0011		
$\mu$ diaria fase exponencial**	$\mu_{max}$	1.0956	0.0452	48.26	0.7953
	$\alpha$	0.0227	0.0015		

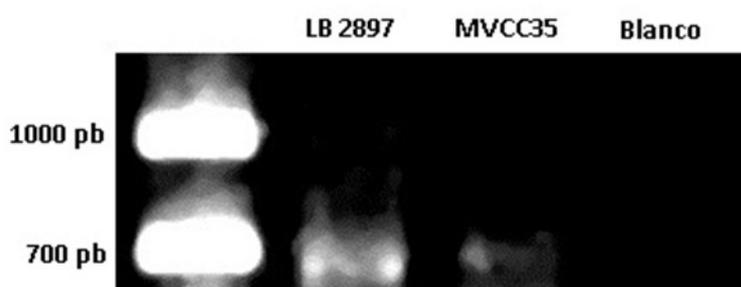
\*Sin tratamientos 10, 60 y 90  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$

\*\*Sin tratamientos 3 y 90  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , un valor 1,2 del trat. 60  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y un valor 0,02 del tratamiento 37  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$

de entre 700-1000 pb (Fig. 4), correspondiente al gen *cyrA* (tamaño esperado de amplicón 823pb) involucrado en la síntesis de cylindrospermopsina. La presencia de genes *cyr* en la cepa LB2897 fue respaldada por PCR por triplicado en las que no se incluyó un control positivo (Anexo, Figs. I-III).

### 6.3 Variables ambientales asociadas a *C. raciborskii* en América

Con el objetivo de caracterizar la distribución de *C. raciborskii* en el continente y su relación con estudios de otras áreas, se recopiló y caracterizó una base de datos con



**Figura 4.** Fragmento de gel de agarosa 1.5% teñido con Gelred mostrando productos de amplificación por PCR del gen *cyrA* (823 pb) de las cepas LB2897 y MVCC35. Se muestra también el marcador (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen). Agua para PCR fue usada como control negativo (Blanco).

información limnológica asociada a la presencia de la especie y se caracterizó el efecto del clima latitudinal y de gradientes de fósforo, temperatura y luz en diferentes indicadores de la presencia de la especie.

### 6.3.1 **Características de los cuerpos de agua incluidos en el estudio**

El estudio de la distribución de *C. raciborskii* en 56 cuerpos de agua con una distribución latitudinal que abarcó desde 45.4° N (Lago Constance, Canadá) a los 34.9° S (Laguna Blanca, Uruguay) incluyó gran diversidad morfológica e hidrológica de los ecosistemas (Fig.5, Tabla 4). La presencia de *C. raciborskii* no presentó diferencias (Test pareados de Kruskal-Wallis,  $H=31.604$ ,  $n=290$ ) entre los climas tropical ( $n = 150$ ,  $R = 145.59$ ,  $p > 0.05$ ) y subtropical ( $n = 111$ ,  $R = 165.77$ ,  $p > 0.05$ ), mientras que el clima templado ( $n = 29$ ,  $R = 67.448$ ) resultó diferente a los anteriores ( $p < 0.001$  en las 2 comparaciones) (Fig. 6).

### 6.3.2 **Rangos de variables ambientales con presencia significativa de *C. raciborskii***

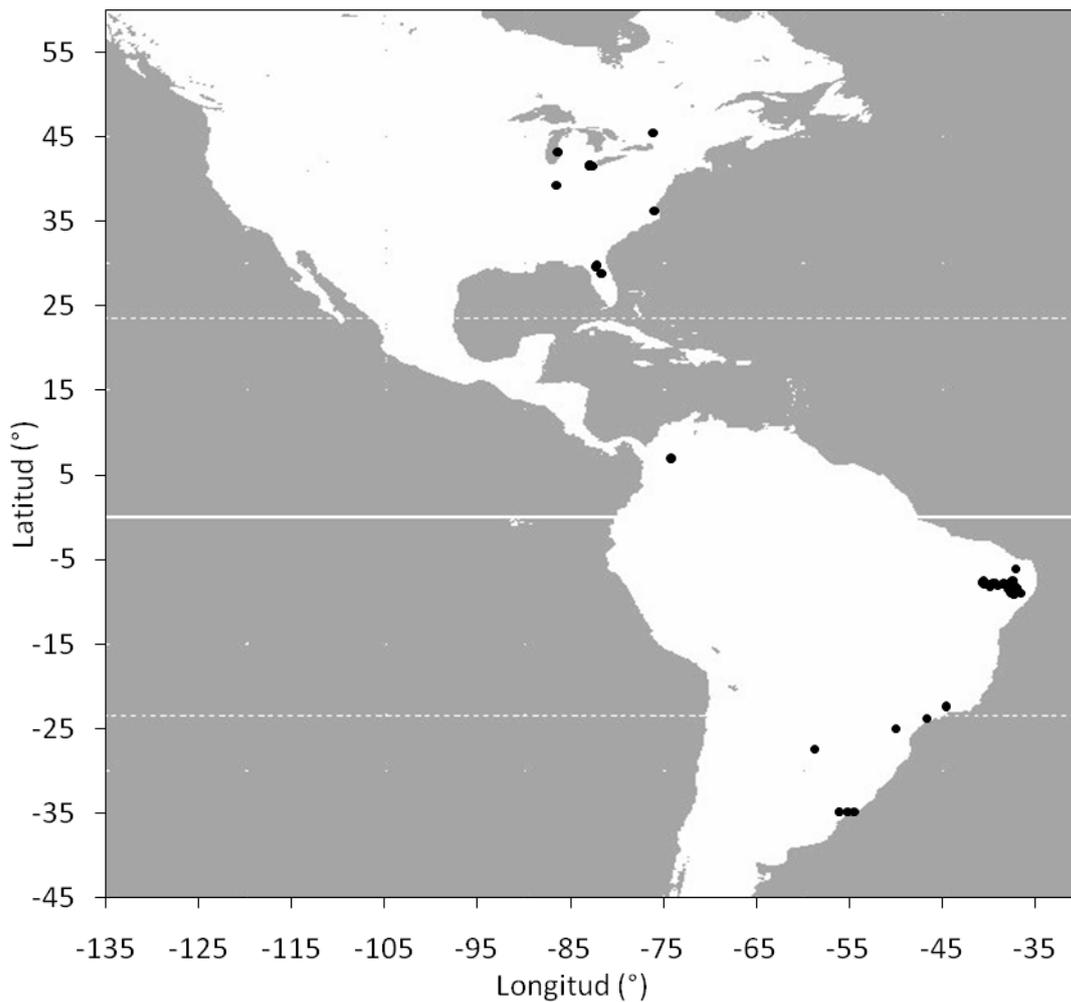
De acuerdo al análisis de las variables ambientales, se pudo determinar que *C. raciborskii* desarrolla biovolúmenes  $> 0.1\text{mm}^3$  principalmente en sistemas eutróficos, turbios y con temperaturas altas, y cuando esto ocurre usualmente domina las comunidades ( $>40\%$  biovolumen total). *C. raciborskii* mostró biovolúmenes significativos en diferentes tipos de sistemas y amplios rangos ambientales (Tabla 6).

### 6.3.3 **Máximos biovolumen y dominancia en gradientes ambientales.**

El biovolumen de *C. raciborskii* alcanzó máximos a temperaturas de 30.5°C, en concentraciones de PT de  $130.2\ \mu\text{g l}^{-1}$  y en profundidades de zona eufótica de 1.23 m, disminuyendo a menores y mayores valores de dichas variables ambientales. Los máximos porcentajes de *C. raciborskii* en el biovolumen fitoplanctónico total no mostraron una clara dependencia con la temperatura, disminuyeron al aumentar la zona eufótica y mostraron un máximo a  $62.4\ \mu\text{g l}^{-1}$  de PT, disminuyendo a mayores y menores concentraciones (Fig. 7, Tabla 7).

**Tabla 4.** Características geográficas y morfométricas de los cuerpos de agua incluidos en este estudio. La columna de profundidades media  $Z_{med}$  indica entre paréntesis la profundidad máxima ( $Z_{max}$ ), ambas en metros (m).

Nombre cuerpo de agua	País	Origen	Tipo cuerpo agua	Latitud	Longitud	Clima	Área (há)	$Z_{med}$ ( $Z_{max}$ ) (m)	Año	Fuente
Constance	Canadá	Natural	Lago	45.400°N	75.983°W	Templado	132	2 (3.3)	1998	Hamilton et al., 2005
Muskegon	EUA	Natural	Embalse	43.232°N	86.295°W	Templado	1680	(24)	2002	Hong et al., 2006
Mona	EUA	Natural	Embalse	43.169°N	86.264°W	Templado	281	(12.8)	2002	Hong et al., 2006
Erie	EUA	Natural	Lago	41.568°N	82.504°W	Templado	90000	13.3	2005	Conroy et al., 2007
Sandusky (Boca de la Bahía)	EUA	Natural	Río	41.479°N	82.708°W	Templado	90000	13.3	2005	Conroy et al., 2007
Sandusky (Bahía Este)	EUA	Natural	Río	41.465°N	82.778°W	Templado	16200	2.6	2005	Conroy et al., 2007
Sandusky (Bahía Oeste)	EUA	Natural	Río	41.451°N	82.911°W	Templado	16200	2.6	2005	Conroy et al., 2007
Sandusky (Boca del Río)	EUA	Natural	Río	41.447°N	83.007°W	Templado	16200	2.6	2005	Conroy et al., 2007
Lemon	EUA	Artificial	Embalse	39.259°N	86.406°W	Templado	670	3 (7)	2005	LLCD report 2005
Currituck Sound	EUA	Natural	Laguna costera	36.284°N	75.871°W	Templado			2007	Calandrino & Paerl, 2011
Newnans	EUA	Natural	Lago	29.651°N	82.218°W	Subtropical	3000	1.5	1995	Chapman & Schelske, 1997
Wauberg	EUA	Natural	Lago	29.506°N	82.282°W	Subtropical	100	3.8	1995	Chapman & Schelske, 1997
Eustis	EUA	Natural	Lago	28.849°N	81.725°W	Subtropical	3135	3.5	1995	Chapman & Schelske, 1997
Dora	EUA	Natural	Lago	28.806°N	81.643°W	Subtropical	1790	2.6	1995	Chapman & Schelske, 1997
Chucurí	Colombia	Natural	Lago	6.833°N	74.067°W	Tropical	12545	2.5	1998	Plata-Díaz & Pimienta-Rueda 2011
Armando Ribeiro Gonçalves	Brasil	Artificial	Embalse	6.133°S	37.117°W	Tropical	16.8		2004	Costa et al., 2004
São José II	Brasil	Artificial	Embalse	7.476°S	37.296°W	Tropical	121	4	1998	Bouvy et al., 2000
Araripina	Brasil	Artificial	Embalse	7.576°S	40.472°W	Tropical	75	0.8	1998	Bouvy et al., 2000
Racharia	Brasil	Artificial	Embalse	7.700°S	40.557°W	Tropical	32	4.8	1998	Bouvy et al., 2000
Barrinha	Brasil	Artificial	Embalse	7.729°S	39.265°W	Tropical	46	5.5	1998	Bouvy et al., 2000
Brotas	Brasil	Artificial	Embalse	7.746°S	37.621°W	Tropical	467	5	1998	Bouvy et al., 2000
Lagõa do Barro	Brasil	Artificial	Embalse	7.770°S	40.384°W	Tropical	405	4.5	1998	Bouvy et al., 2000
Rosário	Brasil	Artificial	Embalse	7.772°S	37.472°W	Tropical	898	7	1998	Bouvy et al., 2000
Chinelo	Brasil	Artificial	Embalse	7.784°S	37.790°W	Tropical	98	2	1998	Bouvy et al., 2000
Gergelim	Brasil	Artificial	Embalse	7.816°S	40.484°W	Tropical		1.2	1998	Bouvy et al., 2000
Barriguda	Brasil	Artificial	Embalse	7.862°S	40.493°W	Tropical		5	1998	Bouvy et al., 2000
Lopes II	Brasil	Artificial	Embalse	7.873°S	39.935°W	Tropical	760	3	1998	Bouvy et al., 2000
Saco I	Brasil	Artificial	Embalse	7.945°S	38.286°W	Tropical	661	2	1998	Bouvy et al., 2000
Barra	Brasil	Artificial	Embalse	7.945°S	38.286°W	Tropical	59	4	1998	Bouvy et al., 2000
Cachoeira II	Brasil	Artificial	Embalse	7.974°S	38.322°W	Tropical	390	5	1998	Bouvy et al., 2000
Custódia	Brasil	Artificial	Embalse	7.974°S	38.322°W	Tropical	390	1.5	1998	Bouvy et al., 2000
Algodões	Brasil	Artificial	Embalse	7.979°S	40.321°W	Tropical	1158	2.2	1998	Bouvy et al., 2000
Chapéu	Brasil	Artificial	Embalse	7.994°S	39.568°W	Tropical	2615	7.2	1998	Bouvy et al., 2000
Jazigo	Brasil	Artificial	Embalse	7.999°S	38.242°W	Tropical	460	4	1998	Bouvy et al., 2000
Bõa Vista	Brasil	Artificial	Embalse	8.059°S	39.053°W	Tropical	270	5.5	1998	Bouvy et al., 2000
Cachoeira I	Brasil	Artificial	Embalse	8.068°S	37.221°W	Tropical	120	1.5	1998	Bouvy et al., 2000
Entremontes	Brasil	Artificial	Embalse	8.229°S	39.897°W	Tropical	4605	6.5	1998	Bouvy et al., 2000
Ipaneminha	Brasil	Artificial	Embalse	8.368°S	36.859°W	Tropical	67	5	1998	Bouvy et al., 2000
Mororó	Brasil	Artificial	Embalse	8.494°S	36.946°W	Tropical	42	8.6	1998	Bouvy et al., 2000
Poço da Cruz	Brasil	Artificial	Embalse	8.509°S	37.705°W	Tropical	5610	12	1998	Bouvy et al., 2000
Arcoverde	Brasil	Artificial	Embalse	8.559°S	36.985°W	Tropical	200	8	1998	Bouvy et al., 2000
Venturosa	Brasil	Artificial	Embalse	8.580°S	36.877°W	Tropical		2	1998	Bouvy et al., 2000
Ingazeira	Brasil	Artificial	Embalse	8.613°S	36.906°W	Tropical	130	6	1998	Bouvy et al., 2000
Buique	Brasil	Artificial	Embalse	8.629°S	37.167°W	Tropical		2.5	1998	Bouvy et al., 2000
Itai	Brasil	Artificial	Embalse	8.636°S	37.167°W	Tropical	305	6	1998	Bouvy et al., 2000
Itaíba	Brasil	Artificial	Embalse	8.928°S	37.425°W	Tropical	14	5	1998	Bouvy et al., 2000
Mundaú	Brasil	Artificial	Embalse	8.946°S	36.493°W	Tropical	125	(9)	2005	Woclyli et al., 2008
Ipanema	Brasil	Artificial	Embalse	9.088°S	37.159°W	Tropical	30	3	1998	Bouvy et al., 2000
Funil	Brasil	Artificial	Embalse	22.500°S	44.580°W	Tropical	2700.0	(45)	2002	Soares et al. 2009; Bonilla et al. 2012
Billings	Brasil	Artificial	Embalse	23.783°S	46.667°W	Subtropical			2007	Moschini-Carlos et al., 2009
Alagados	Brasil	Artificial	Embalse	25.007°S	56.022°W	Subtropical	731	(14)	2008	Gomes et al., 2011
Aeroclub	Argentina	Natural	Lago	27.483°S	58.750°W	Subtropical	26	3.5 (6)	1995	Zalocar et al., 1998
Sauce	Uruguay	Natural	Lago	34.800°S	55.050°W	Subtropical	4550	(4.1)	2004	Vidal & Kruk, 2008
Javier	Uruguay	Artificial	Lago	34.847°S	56.041°W	Subtropical	23.5	(9.8)	2005	Vidal & Kruk, 2008; Bonilla et al., 2012; Somma 2013
Chica	Uruguay	Artificial	Lago	34.850°S	50.033°W	Subtropical	0.5	(4.5)	2005	Vidal & Kruk, 2008
Blanca	Uruguay	Natural	Lago	34.883°S	54.333°W	Subtropical	40.5	(2.6)	2004	Vidal & Kruk, 2008



**Figura 5.** Ubicación en el continente americano de los cuerpos de agua incluidos en el estudio. Los ejes indican latitudes y longitudes (S y W se indican como valores negativos)

## 7 Discusión

### 7.1 Morfología y crecimiento

#### 7.1.1 Morfología de las cepas estudiadas

La particularidad de la cepa LB2897 de crecer en forma de asociaciones de filamentos unidos por sus heterocitos ha sido observado en otras cianobacterias producto de asociaciones con bacterias (Stevenson & Waterbury 2006; Stevenson et al. 2011), como respuesta de los individuos frente a depredadores (Burns 1987) o a cambios en la intensidad de luz (Brookes 1999). Este comportamiento puede ser una

**Tabla 5.** Rangos de variables ambientales con presencia significativa (biovolumen $>0.1\text{mm}^3$ ) de *C. raciborskii* en América. Se indican el número de datos (N), la mediana, mínimos y máximos, y percentiles 10 y 90.

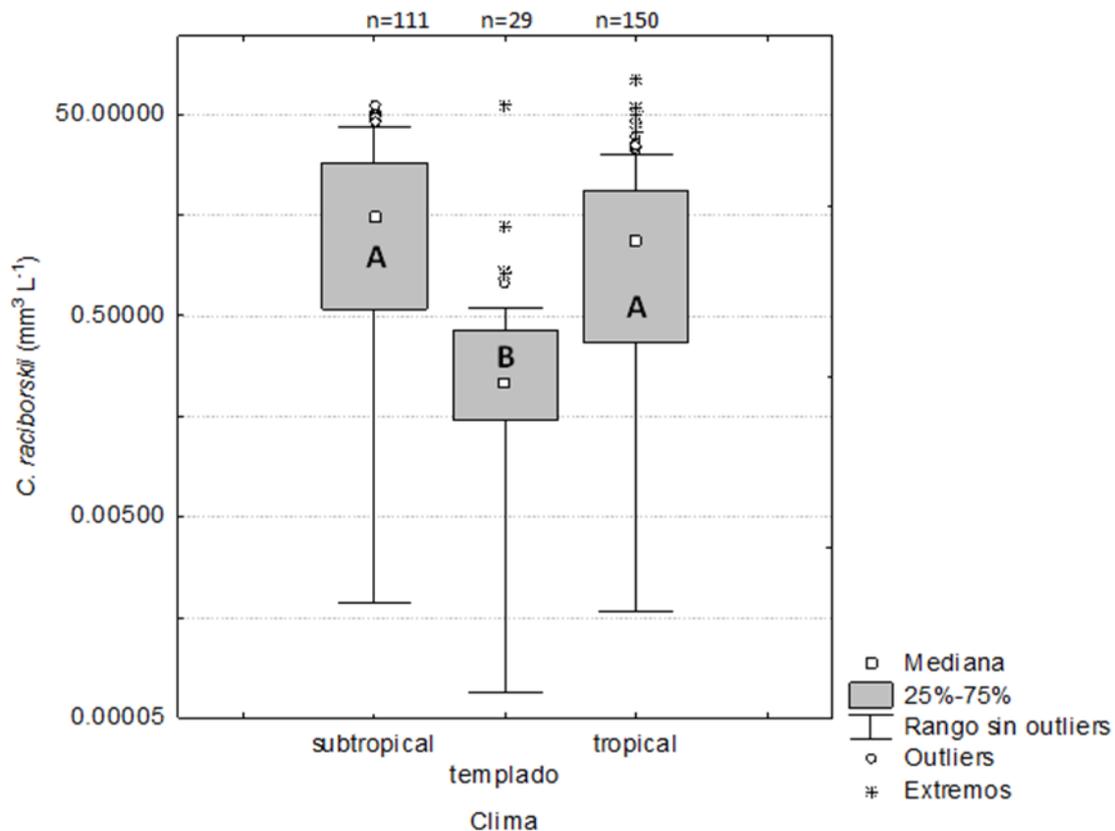
	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Percentil 10	Percentil 90
Temperatura (°C)	227	25.5	2.8	34.0	16.6	30.6
Área (há)	242	347.5	0.5	16200	23.5	12545.0
Z <sub>med</sub> (m)	119	3.8	0.8	13.3	2.2	5.5
Z <sub>max</sub> (m)	133	14.0	2.6	45.0	5.4	45.0
Z <sub>eu</sub> (m)	134	1.50	0.03	9.59	0.24	4.80
Z <sub>eu</sub> /Z <sub>mix</sub>	80	0.43	0.03	3.87	0.14	2.48
pH	102	7.8	6.1	9.8	7.1	8.8
K ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	97	77	6	19630	44	1492
PT ( $\mu\text{g P L}^{-1}$ )	113	69.8	8.5	745	32	184.2
Clorofila-a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	98	33.0	1.5	867.0	4.1	97.4
Biovolumen fitoplancton total ( $\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$ )	104	17.1	0.3	697.4	2.8	72.7
Biovolumen <i>C. raciborskii</i> ( $\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$ )	246	4.7	0.1*	114.6	0.2	29.9
%Biovolumen total <i>C. raciborskii</i>	104	41.3	0.1	97.4	2.4	83.2

\*Valor dado por coincidencia con el criterio de selección de datos

respuesta común a estrés por diversos factores. Sin embargo, esta es la primera vez que se reporta este comportamiento en una cepa de *C. raciborskii*, difiriendo claramente de otras cepas de la especie estudiadas (Saker & Neilan 2001; Shafik et al. 2003; Chonudomkul et al. 2004; Piccini et al. 2011) lo cual refuerza la heterogeneidad intraespecífica de la especie.

El morfotipo de la cepa norteamericana es recto, levemente curvado, al igual que en la floración de origen en el lago Lemon (Jones & Sauter 2005). La cepa MVCC35 crece en forma de filamentos rectos, solitarios, con hasta dos heterocitos terminales, similar a la cepa MVCC19 (Piccini et al. 2011) y a la población de *C. raciborskii* del lago Javier descrita por Vidal & Kruk (2008), y al igual que ésta última produce acinetes.

El ajuste lineal realizado de los últimos 5 días de aclimatación presentó  $r^2 > 0.9$  en todos los casos y  $r^2 > 0.95$  en la mayoría, indicando que la tasa de crecimiento se estabiliza y que la metodología utilizada (cultivos batch semi-continuos) resultó buena para alcanzar la aclimatación. En otro estudio previo, (Fabre 2011) determinó que el tiempo de aclimatación para la cepa MVCC19 varía entre 9 y 15 días según la intensidad de luz. Los experimentos de este estudio se realizaron en forma de repiques

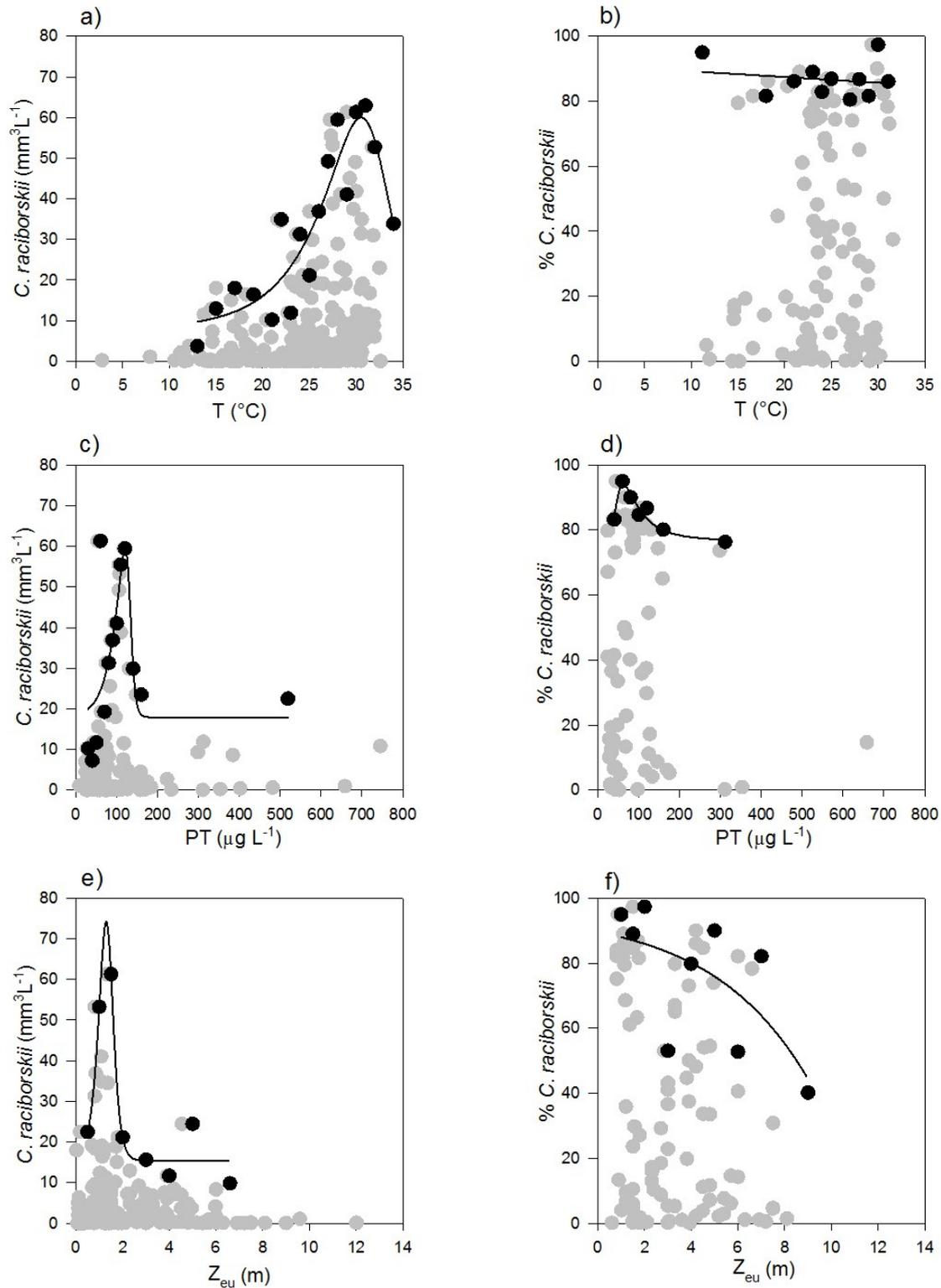


**Figura 6.** Diferencias poblacionales de *C.raciborskii* entre los diferentes climas, calculados en base a diferencias en la distribución de los biovolúmenes. Nótese la escala logarítmica en el eje correspondiente al biovolumen de *C. raciborskii*. En el margen superior se indica el número de datos de cada categoría. Letras (A, B) iguales en los indican grupos sin diferencias significativas entre las distribuciones. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Kruskal-Wallis

continuos para asegurar la aclimatación. La aclimatación previa de un organismo es crítica en una aproximación experimental para determinar su máxima capacidad de crecimiento como indica (Fabre 2011) para el caso de *Cylindrospermopsis*.

### 7.1.2 Crecimiento y ajuste al modelo P-I

Las curvas de crecimiento mostraron una fase exponencial estimativa que duró entre 2 y 3 días. La fase exponencial derivó en una disminución gradual de la tasa de crecimiento instantáneo, y dado el exceso de nutrientes en el medio, se debió probablemente a la disminución de la luz interna ( $I_{est}$ ). El modelo ajustó mejor a los datos de pendientes seleccionadas que al de tasas de crecimiento instantáneas. Esta selección es más precisa debido a que utiliza la fase exponencial como un todo y



**Figura 7.** Máximos biovolúmenes y contribución total al fitoplancton (% biovolumen total) de *C. raciborskii* frente a diferentes variables ambientales. (•) Máximo *C. raciborskii* (BV o %) por categoría de variable ambiental (•) Todos los datos (—) Curva de ajuste a los máximos (ver tabla 6). \*El valor de 114  $\text{mm}^3$  del embalse de Araripina fue removido en éste análisis por estar demasiado alejado del resto de los biovolúmenes utilizados.

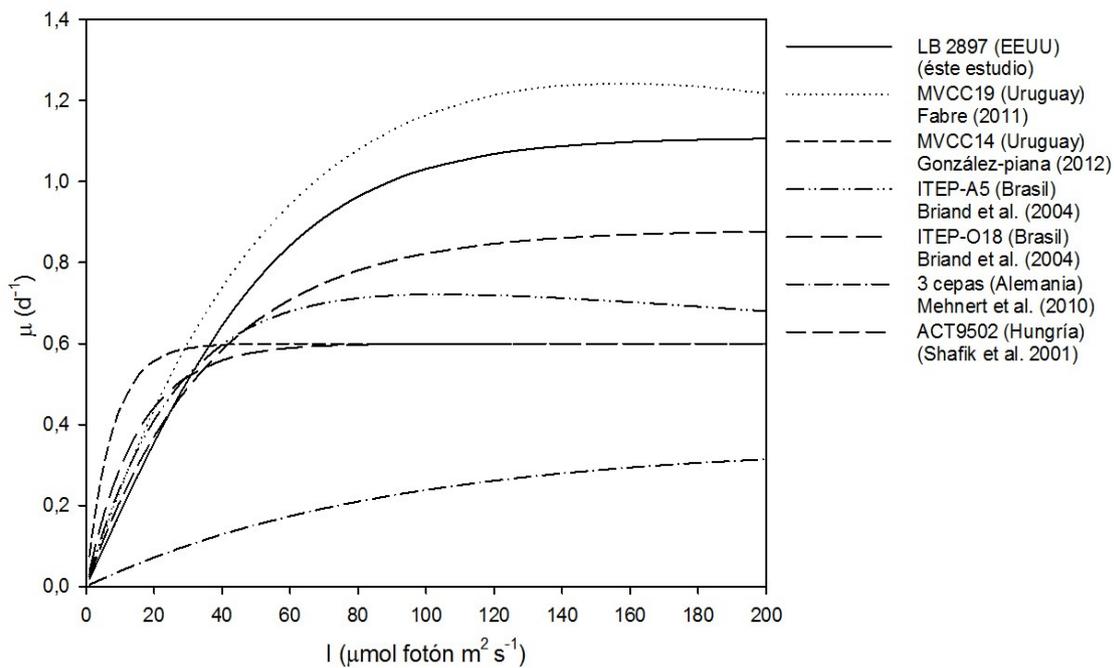
**Tabla 6.** Funciones y resultados del ajuste para los diferentes gráficos de *C. raciborskii* vs. diferentes variables ambientales de la figura 7. Se indica la variable ambiental, la variable biológica de *C. raciborskii*, la función de ajuste, el valor máximo (en caso de ser una función “pico”), el  $r^2$  y el número de datos usados para calcular los máximos.

Variable ambiental	Variable biológica	Función de ajuste	x en máximo (b)	$r^2$	N (n° datos)
Temperatura	Biovolumen	$y = a \left[ 1 + \exp\left(-\frac{x+c \ln d - b}{c}\right) \right]^{-d-1} d^{-d} (d+1)^{d+1} \exp\left(-\frac{x+c \ln d - b}{c}\right)$	30.5	0.838	265
	% Biovolumen	$y = a + bx$	-	0.036	114
Fósforo Total	Biovolumen	$y = \left[ \frac{a}{1 + \exp\left(-\frac{x-b+\frac{c}{2}}{d}\right)} \right] \left[ \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{x-b-\frac{c}{2}}{e}\right)} \right]$	130.2	0.540	140
	% Biovolumen	$y = ax^{-c-1} b^{c+1} \exp\left[\frac{(b^c x^{-c} - 1)(-c-1)}{c}\right]$	62.4	0.920	69
Profundidad de la zona eufótica	Biovolumen	$y = a \left[ 1 + \exp\left(-\frac{x+c \ln d - b}{c}\right) \right]^{-d-1} d^{-d} (d+1)^{d+1} \exp\left(-\frac{x+c \ln d - b}{c}\right)$	1.3	0.951	164
	% Biovolumen	$y = a + b \exp\left(-\frac{x}{c}\right)$	-	0.450	95

disminuye el efecto de la variabilidad biológica y metodológica en medidas de días consecutivos. Sin embargo el cambio en la intensidad de luz interna durante la fase exponencial de crecimiento es amplio y la tasa de crecimiento calculada se corresponde con un rango de intensidades de luz en lugar de un valor específico.

### 7.1.3 Crecimiento de la cepa LB2897 en un gradiente lumínico

La cepa LB presentó altas tasas de crecimiento a altas intensidades de luz, mayores a la mayoría de los datos publicados para la especie. El valor de  $I_k$  ( $59 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) es mayor que el obtenido para la mayoría de las cepas estudiadas excepto las halladas por Mehnert et al. (2010), quién también realizó aclimatación. La tasa máxima de crecimiento del modelo ( $1.16 \text{ d}^{-1}$ ) es similar a la tasa de crecimiento de la cepa uruguaya MVCC19 (Fabre 2011), siendo ambas considerablemente más altas que el resto de las cepas de *C. raciborskii* estudiadas en un gradiente de luz hasta el momento (Fig. 8). Esto podría deberse a una limitación metodológica de la mayoría de los estudios fisiológicos que no consideran la aclimatación previa a las condiciones experimentales que se quieren probar, lo que lleva a subestimar la capacidad del



**Figura 8** Modelos de crecimiento vs. intensidad de luz de diferentes cepas de América, y dos extranjeras en comparación. Se muestra la curva correspondiente a la cepa LB 2897 (éste estudio) y el resto obtenidas a partir de la recopilación de Fabre (2011)

organismo. Las tasas de crecimiento obtenidas en este estudio fueron calculadas con  $\text{NO}_3^{2-}$  como fuente de nitrógeno. En otros trabajos, utilizando cultivos continuos (lo que implica que alcancen el estado aclimatado) expuestos a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con  $\text{NH}_3^+$  como fuente de nitrógeno la cepa húngara ACT 9502 alcanzó tasas de  $1.5 \text{ d}^{-1}$ , mientras que con  $\text{NO}_3^{2-}$  fue de  $1.25 \text{ d}^{-1}$  (Kenesi et al. 2008), cercana a las encontradas para las cepas LB 2897 y MVCC19. La cepa MVCC14, otra cepa uruguaya estudiada con aclimatación, presentó el  $\alpha$  más alto de la especie, y su crecimiento es considerablemente más alto que el resto de las cepas a luces bajas (González-Piana 2012). De deberse lo anterior a las metodologías, significa que potencialmente las poblaciones naturales de *C. raciborskii* que originaron dichas cepas podrían desarrollar altas tasas de crecimiento como las observadas, lo que facilitaría su invasión, expansión y dominancia en los cuerpos de agua. Las tasas de crecimiento de la especie, son considerablemente altas dentro de las cianobacterias y el fitoplancton en general con excepción de las clorofitas (Schwaderer et al. 2011). Los parámetros de crecimiento-intensidad de luz son muy diversos entre cepas, por lo que podemos decir que existe una gran variabilidad en el control de la fotosíntesis entre los diferentes ecotipos de *C.*

*raciborskii*. Sin embargo la respuesta de estrés térmico y lumínico, en forma de producción aumentada del pigmento afanizofila (4-myxol-glicósido) fue muy similar entre una cepa uruguaya y 3 cepas alemanas (Mehnert et al. 2012; Bonilla et al. 2012), indicando que ciertos aspectos de la fotosíntesis se encuentran conservados y dan unidad a la especie. Lo anteriormente planteado sugiere que la alta tasa de crecimiento de *C. raciborskii* ha sido subestimada, por limitaciones metodológicas, como posible factor determinante en el éxito e invasibilidad de la especie.

## 7.2 Toxicidad y genes de toxinas

Nuestros resultados apoyan las tendencias encontradas hasta el presente respecto a la producción de saxitoxina solamente en cepas sudamericanas (Haande et al. 2008; Piccini et al. 2011; Sinha et al. 2012). Los resultados de producción de saxitoxina son coherentes con lo hallado hasta el momento, siendo la cepa MVCC35 productora al igual que la cepa altamente toxígena MVCC19, aislada del mismo lago (Piccini et al. 2011). La cepa LB2897 no produjo saxitoxina, mismo resultado que obtuvieron Yilmaz & Philips (2011b). Nuestros resultados también apoyan la evidencia reciente de que cepas americanas presentan genes del clúster *cyr* de producción de cylindrospermopsina (Piccini et al. 2013; Hoff-Risetti et al. 2013). La cepa MVCC35 presentó el gen *cyrA* al igual que las cepas uruguayas (Piccini et al. 2013). La cepa LB2897 mostró presencia del gen *cyrA*, contrariamente a los hallazgos de Yilmaz & Philips (2011b) que usaron primers que no amplificaron el gen *cyrA* en cepas uruguayas, al contrario que los diseñados por Piccini et al. (2013). Este es el primer reporte de genes del clúster de cylindrospermopsina en cepas norteamericanas de *C. raciborskii*, si bien hace falta confirmación por secuenciación, pero la amplificación del gen *cyrA* y de otro gen del clúster, *cyrC* (primers A205PKF y A205PKR (Kellmann et al. 2006)) se observó en otras reacciones de PCR (Anexo, Figs. I-III).

Lo anteriormente planteado sugiere que el clúster de cylindrospermopsina se halla presente de forma dispersa en poblaciones de *C. raciborskii* a lo largo de todo el continente americano. El hecho de que ninguna cepa americana estudiada hasta el momento produzca cylindrospermopsina sugiere un escenario de dispersión de la especie en el continente a partir de poblaciones que originalmente producían cylindrospermopsina. Hasta el momento la producción de cylindrospermopsina se ha

encontrado en cepas de Australia, Nueva Zelanda y Asia Oriental (Saker & Neilan 2001; Wood & Stirling 2003; Chonudomkul et al. 2004; Stucken et al. 2009; Wu et al. 2013), regiones geográficamente cercanas del Pacífico Oeste, y la relación filogenética de las cepas de esas regiones no está resuelta pero no presentan marcadas diferencias (Chonudomkul et al. 2004; Wu et al. 2010, Wu et al. 2011), por lo que podrían conformar un toxitipo. La presencia de saxitoxinas, en cambio, solo está reportada en poblaciones y cepas sudamericanas (Bouvy et al. 1999; Bernard et al. 2003; Costa et al. 2006; Kellmann et al. 2008; Moschini-Carlos et al. 2009; Piccini et al. 2011; Hoff-Rissetti et al. 2013), lo que puede indicar que el clúster *sxt* en particular fue adquirido por las nuevas poblaciones al dispersar por el continente. Hasta ahora, no se ha encontrado la producción de saxitoxina o cylindrospermopsina por cepas o poblaciones de Norteamérica (Clark & Jones 2006; Yilmaz et al. 2008; Yilmaz & Philips 2011b), y hacen falta más estudios para determinar la presencia o no de genes *cyr* y *sxt* en el continente que aporten al entendimiento de la dispersión y evolución de la especie. Se ha sugerido una dispersión de la especie tras la última glaciación a partir de nichos tropicales (Gugger et al. 2005). En éste escenario, la presencia de genes *cyr* en cepas americanas, así como la producción de cylindrospermopsina por cepas de la costa Oeste del Pacífico sugiere la colonización del continente a partir de poblaciones de *C. raciborskii* originalmente productoras de cylindrospermopsina que posteriormente perdieron dicha capacidad.

### **7.3 Distribución de *C. raciborskii* en ecosistemas acuáticos de América**

Nuestros resultados indican que en América *C. raciborskii* tiene una amplia distribución que va desde el clima templado Norte al clima subtropical Sur. En el continente la especie se registró en un amplio rango latitudinal, desde climas templados en el Norte al límite del área subtropical en el Sur, abarcando gran diversidad de tipos de cuerpos de agua. Una gran mayoría de los registros son provenientes de la zona costera de Brasil y del Este de Norteamérica, probablemente debido a la mayor densidad de población e investigación en esas áreas. En Norteamérica la especie se ha encontrado en un enorme número de cuerpos de agua a lo largo de todos los Estados Unidos (Holland et al. 2006), indicando que la distribución no es endémica y que

probablemente *C. raciborskii* tenga una distribución mucho más cosmopolita que la que aportan los registros. La diferencia actual entre las poblaciones de regiones templadas y las tropicales y subtropicales podría deberse a limitaciones fisiológicas comunes a la especie, o que no ha terminado el proceso de selección y proliferación de ecotipos adaptados a dichos climas, en una escala evolutiva. A diferencia de éstos resultados, Bonilla et al. (2012) no encontraron diferencias en las poblaciones de *C. raciborskii* entre los climas incluyendo el templado, representado por numerosos registros europeos, y en el clima templado de Indiana (Estados Unidos) se registraron floraciones y poblaciones considerables de *C. raciborskii* en numerosos cuerpos de agua (Jones & Sauter 2005), pero a mayores latitudes las poblaciones encontradas alcanzaron menor biovolumen. La presencia de clústeres filogeográficos continentales señala que su dispersión a nivel mundial ocurrió hace mucho tiempo, por lo que queda la duda de cuál es la causa detrás de que generó el aumento de registros en zonas más frías. La especie se encuentra en amplios rangos de condiciones ambientales. Los rangos y medias ambientales de este estudio fueron similares a los encontrados por Bonilla et al. (2012), con otro set de datos. Esto indica que las poblaciones americanas de *C. raciborskii* poseen amplias tolerancias fisiológicas, probablemente debido a su flexibilidad fenotípica y a la diversidad de ecotipos (Amaral et al. 2014 en prensa; Chonudomkul et al. 2004; Piccini et al. 2011). La relación de los máximos biovolúmenes de la especie con respecto a la temperatura fue similar a la relación de ésta con la tasa de crecimiento en el laboratorio, con los máximos de biovolumen y tasas crecimiento hallados a 30°C (Briand et al. 2004). Su contribución máxima en cambio, no mostró dependencia con la temperatura, y los máximos a bajas temperaturas (10-15°C) estuvieron principalmente compuestos por los datos del lago Javier, que presentó altos biovolúmenes en invierno (Fabre et al. 2010) mientras que en el resto de los ecosistemas descendía drásticamente a bajas temperaturas. Ésta tolerancia a bajas temperaturas podría estar seleccionada a nivel de ecotipos, como lo indican diferencias entre cepas de orígenes tropicales y templados en el crecimiento (Chonudomkul et al. 2004) y en la producción de carotenoides a bajas temperaturas (Mehnert et al. 2012). Por lo tanto la presencia de poblaciones de *C. raciborskii* que dominan el fitoplancton a bajas temperaturas, pone en duda la hipótesis de que el calentamiento global es el principal causante de la expansión de la especie.

*C. raciborskii* mostró un aumento de los máximos tamaños poblacionales (biovolumen) a medida que aumenta el PT en niveles eutróficos, comenzando un descenso al aumentar a niveles hipereutróficos, y su contribución relativa al fitoplancton se comportó de manera similar pero con el máximo ocurriendo a menores niveles de fósforo. Esto concuerda con lo encontrado por Bonilla et al. (2012) y Dolman et al. (2012) en estudios de gradientes ambientales donde se encuentra la especie. En buena concordancia, en el laboratorio se ha demostrado que la especie posee una alta afinidad por fosfato y gran capacidad de almacenamiento (Amaral et al. 2014 en prensa; Istvánovics et al. 2000; Martigani 2012). En concentraciones hipereutróficas de PT, los cuerpos de agua pasarían a ser dominados por otros géneros como *Planktothrix* y *Microcystis* (Dolman et al. 2012), por lo que podríamos decir que los sistemas hasta niveles eutróficos de PT son los más susceptibles a las floraciones de *C. raciborskii*. Los datos de NT fueron escasos como para incluirlos en el análisis, pero el comportamiento con el nitrógeno es peculiar, dado que el crecimiento de *C. raciborskii* parece asociarse a altos niveles de nitrógeno total y amonio (Kenesi et al. 2008; Dolman et al. 2012), pese a su capacidad de crecer con  $N_2$  como única fuente de nitrógeno.

Los resultados ya discutidos del crecimiento con respecto a la luz de *C. raciborskii* concuerdan con el comportamiento de la especie en gradientes ambientales de penetración de la luz en los cuerpos de agua. En cuanto a la profundidad de la zona eufótica, los máximos de biovolumen se encontraron en  $Z_{eu}$  de 1.3 m, disminuyendo a menores y mayores transparencias. Esto podría estar asociado a la turbidez alcanzada en niveles eutróficos de fósforo, aunque indica que *C. raciborskii* no es necesariamente una especie de sombra como ha sido descrita (Padisák & Reynolds 1998). La variabilidad en los  $I_k$  entre diferentes cepas (9-101  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) recopilados por Fabre (2011) apoya lo anterior e indica que la ecoestrategia de utilización de la luz es cepa-específica. En la laguna Aeroclub (Zalocar de Domitrovic et al. 1998) y el embalse de Funil (Soares et al. 2009) *C. raciborskii* dominó (>40% biomasa de fitoplancton total) con  $Z_{eu}$  >3m (hasta 6,6 m en Funil), mostrando que la especie puede ser exitosa en altas intensidades de luz. Lo anteriormente planteado sugiere que en América la fisiología frente a la luz de *C. raciborskii* está seleccionado a nivel de ecotipos y abarca desde ecosistemas desde alta a baja penetración de la luz.

## 7.4 Discusión general

El hecho de que *C. raciborskii* domine cuerpos de agua a bajas temperaturas va en contra de la hipótesis que plantea al calentamiento global como principal motor detrás de la expansión de la especie. Es por eso que debemos plantear un escenario detrás de su expansión integrando las hipótesis más respaldadas. Su alta tasa de crecimiento y pequeño genoma (Stucken et al. 2010), probablemente hayan contribuido a generar una diversificación de ecotipos con diferentes capacidades fenotípicas (Piccini et al. 2011), con poblaciones probablemente estabilizadas debido a restricciones ecosistémicas. La eutrofización antropogénica y la generación de cuerpos de agua artificiales combinadas con algunas propiedades de esta especie como su alta tasa de crecimiento, amplia tolerancia fisiológica (Bonilla et al. 2012) y gran eficiencia en el uso del fósforo (Istvánovics et al. 2000), pueden conferirle una ventaja para dominar las nuevas condiciones ecosistémicas. La eutrofización puede ser entendida como un factor que ha promovido la dispersión de la especie al favorecer el crecimiento de grandes poblaciones y por lo tanto un aumento en los inóculos de dispersión y en la diversidad genética. Dicho proceso también es el causante de la disminución de la penetración de la luz por el aumento de la biomasa, por lo que especies con  $I_k$  intermedios a bajos como *C. raciborskii* se ven beneficiadas en un ciclo de retroalimentación. La alta variabilidad entre cepas en su  $I_k$  podría llevar a que diferentes clones tengan mejor éxito a lo largo del proceso de eutrofización o en la colonización de nuevos ecosistemas y contribuyan al éxito de la especie.

Ésta hipotética sucesión de eventos podría explicar su expansión. Estudios de metagenómica de poblaciones dominadas por *C. raciborskii* podrían dar luz sobre la constitución y unidad de los ecotipos. El estudio de la dinámica de la pérdida y adquisición de los clústeres de las diferentes toxinas puede ser un indicador de la direccionalidad de la expansión de *C. raciborskii*. En América el escenario complejo de producción de saxitoxinas restringido a Sudamérica y la presencia de genes *cyr* a lo largo del continente debe ser evaluado en más cepas y poblaciones naturales acompañado de estudios filogeográficos que aporten sobre la historia natural de la especie en el continente y su relación con el resto del mundo.

## 8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. El comportamiento de *C. raciborskii* frente a diferentes intensidades de luz varía a nivel de ecotipo, y su plasticidad fenotípica le permite aclimatarse a las intensidades de luz expresando mayores tasas de crecimiento que las determinadas sin aclimataciones extensivas. Las mayores tasas de crecimiento pueden contribuir a la expansión de la especie. Esto coincide con su capacidad de dominar el fitoplancton en un amplio rango de penetración de la luz, y que la especie genere altas biomásas que disminuyan mucho la penetración de la luz dominando el fitoplancton y generando un ciclo de retroalimentación positiva.
2. Genes del clúster *cyr* se encuentran en cepas del Norte y el Sur de América, sugiriendo un panorama complejo de dispersión de la especie y/o capacidad de producción de cylindrospermopsina en relación con poblaciones productoras de CYR de otras áreas geográficas.
3. Las poblaciones de *C. raciborskii* se distribuyen alcanzando altas biomásas en todo el gradiente del continente americano aunque son mayores en los climas tropical y subtropical, mientras que en climas templados las poblaciones son menores y las floraciones son casos aislados. La alta plasticidad fenotípica de la especie le permite mantener poblaciones significativas en amplios rangos de variables ambientales. Su mayor éxito ésta asociado a niveles eutróficos de fósforo total, mientras que si bien la especie genera mayores biovolúmenes a la temperatura óptima de crecimiento determinada en cultivos, su capacidad de dominar el fitoplancton es indiferente de la temperatura.

El mayor crecimiento obtenido en experimentos con aclimatación previa indica que ésta metodología es de preferencia a la hora de determinar caracteres fisiológicos. Establecer los tiempos de aclimatación a las diferentes intensidades de luz a partir de diferentes condiciones iniciales puede mejorar el entendimiento del valor adaptativo de éste proceso. Siguiendo esa metodología, experimentos que comparen el crecimiento de diferentes cepas bajo diferentes combinaciones de luz, temperatura y fósforo pueden ayudar a establecer los pesos relativos de la diversidad de ecotipos y la plasticidad fenotípica en el éxito de la especie en las diferentes condiciones. Para comprender mejor los eventos de dispersión de *C. raciborskii*, sería muy útil una caracterización genética

de los clústeres de cylindrospermopsina y saxitoxina en cepas originadas a lo largo de América. La base de datos realizada durante éste trabajo puede ser expandida en el futuro y de ella se pueden hacer análisis más complejos y minuciosos en búsqueda de los determinantes de su distribución. La similitud en el comportamiento en la naturaleza y las propiedades fisiológicas descritas en el laboratorio indica la necesidad y complementariedad de ambas aproximaciones a la hora de predecir comportamientos futuros de la especie. Para comprender mejor su relación con las variables ambientales resultaría útil una base de datos paralela con sistemas en donde no se encuentre la especie con fines comparativos.

## 9 REFERENCIAS

- Amaral, V., S. Bonilla, & L. Aubriot. 2014 en prensa. Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuation. *Eur. J. Phycol.*
- Andersen, R. A. 2005. *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press.
- Beaulieu, M., F. Pick, & I. Gregory-Eaves. 2013. Nutrients and water temperature are significant predictors of cyanobacterial biomass in a 1147 lakes dataset. *Limnol. Oceanogr.* **58**: 1736–1746.
- Bernard, C., M. Harvey, J. F. Briand, R. Biré, S. Kryszewski, & J. J. Fontaine. 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* **18**: 176–86.
- Bonilla, S. 2009. Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión, PHI-LAC, UNESCO.
- Bonilla, S., L. Aubriot, M. C. S. Soares, M. González-Piana, A. Fabre, V. L. M. Huszar, M. Lüring, D. Antoniades, J. Padisák, & C. Kruk. 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**: 594–607.
- Bouvy, M., D. Falcão, M. Marinho, M. Pagano, & A. Moura. 2000. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**: 13–27.
- Bouvy, M., R. Molica, S. De Oliveira, M. Marinho, & B. Beker. 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquat. Microb. Ecol.* **20**: 285–297.
- Briand, J.-F., C. Lebourlier, J.-F. Humbert, C. Bernard, & P. Dufour. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* **40**: 231–238.
- Brookes, J. 1999. The influence of light and nutrients on buoyancy, filament aggregation and flotation of *Anabaena circinalis*. *J. Plankton Res.* **21**: 327–341.
- Burns, C. W. 1987. Insights into zooplankton-cyanobacteria interactions derived from enclosure studies. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **21**: 477–482.

- Calandrino, E. S., & H. W. Paerl. 2011. Determining the potential for the proliferation of the harmful cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Currituck Sound, North Carolina. *Harmful Algae* **11**: 1–9.
- Campbell, D., V. Hurry, a K. Clarke, P. Gustafsson, & G. Oquist. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 667–83.
- Carey, C. C., B. W. Ibelings, E. P. Hoffmann, D. P. Hamilton, & J. D. Brookes. 2012. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Res.* **46**: 1394–407.
- Carmichael, W. W. 2001. Health effects of toxin-producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs.” *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* **7**: 1393–1407.
- Chapman, A. D., & C. L. Schelske. 1997. Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. *J. Phycol.* **33**: 191–195.
- Chellappa, N. T., S. L. Chellappa, & S. Chellappa. 2008. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of northeast Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **51**: 633–641.
- Chonudomkul, D., W. Yongmanitchai, G. Theeragool, M. Kawachi, F. Kasai, K. Kaya, & M. M. Watanabe. 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 345–55.
- Chorus, I., & J. Bartram. 1999. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.*, World Health Organization.
- Clark, M. A. L., & W. W. Jones. 2006. Lake Lemon Monitoring Program, 2005 Results.
- Cohan, F. M. 2001. Bacterial species and speciation. *Syst. Biol.* **50**: 513–24.
- Conroy, J. D., E. L. Quinlan, D. D. Kane, & D. a. Culver. 2007. *Cylindrospermopsis* in Lake Erie: Testing its association with other cyanobacterial genera and major limnological parameters. *J. Great Lakes Res.* **33**: 519.
- Costa, I. A. S., S. M. F. O. Azevedo, P. A. C. Senna, R. R. Bernardo, S. M. Costa, & N. T. Chellappa. 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian J. Biol.* **66**: 211–219.

- Dantas, Ê. W., N. Moura, & M. D. C. Bittencourt-Oliveira. 2008. Temporal variation of the phytoplankton community at short sampling intervals in the Mundaú reservoir, Northeastern Brazil. **22**: 970–982.
- Dolman, A. M., J. Rücker, F. R. Pick, J. Fastner, T. Rohrlack, U. Mischke, & C. Wiedner. 2012. Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One* **7**: e38757.
- Dyble, J., H. W. Paerl, & B. A. Neilan. 2002. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins Based on nifH and cpcBA -IGS nucleotide sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2567–2571.
- Fabre, A. 2011. Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* en un gradiente lumínico. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la República, Uruguay.
- Fabre, A., C. Carballo, E. Hernández, P. Piriz, L. Bergamino, L. Mello, S. González, G. Pérez, J. G. León, L. Aubriot, S. Bonilla, & C. Kruk. 2010. El nitrógeno y la relación zona eufótica / zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales , artificiales de Uruguay. *Panam. J. Aquat. Sci.* **5**: 112–125.
- Falkowski, P. G., R. Greene, & Z. Kolber. 1993. Light utilization and photoinhibition of photosynthesis in marine phytoplankton.
- Fenchel, T., & B. J. Finlay. 2004. The Ubiquity of Small Species: Patterns of Local and Global Diversity. *Bioscience* **54**: 777.
- Foy, R., & C. Gibson. 1982. Photosynthetic characteristics of planktonic blue-green algae: changes in photosynthetic capacity and pigmentation of *Oscillatoria redekei* Van Goor under high and low light. *Br. Phycol. J.* **17**: 183–193.
- Gerla, D. J., W. M. Mooij, & J. Huisman. 2011. Photoinhibition and the assembly of light-limited phytoplankton communities. *Oikos* **120**: 359–368.
- Gomes, J. 2012. Avaliação da floração da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* na represa de Alagados, Ponta Grossa, Paraná. Disertación de Maestría Profesional. Universidade Federal do Paraná.
- González-Piana, M. 2012. Efecto de la intensidad lumínica y la temperatura sobre el crecimiento y la morfología de dos cianobacterias filamentosas formadoras de floraciones. Tesis de Maestría, PEDECIBA. Universidad de la República, Uruguay.

- Gugger, M., R. Molica, B. Le Berre, P. Dufour, C. Bernard, & J.-F. Humbert. 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (cyanobacteria) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1097–1100.
- Haande, S., T. Rohrlack, A. Ballot, K. Røberg, R. Skulberg, M. Beck, & C. Wiedner. 2008. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* **7**: 692–701.
- Hamilton, P. B., L. M. Ley, S. Dean, & F. R. Pick. 2005. The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. *Phycologia* **44**: 17–25.
- Hihara, Y., a Kamei, M. Kanehisa, a Kaplan, & M. Ikeuchi. 2001. DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* **13**: 793–806.
- Hoff-Rissetti, C., F. A. Dörr, P. D. C. Schaker, E. Pinto, V. R. Werner, & M. F. Fiore. 2013. *Cylindrospermopsis* and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from brazilian freshwater. *PLoS One* **8**: e74238.
- Holland, D. P., A. Pantorno, P. T. Orr, S. Stojkovic, & J. Beardall. 2012. The impacts of a high CO<sub>2</sub> environment on a bicarbonate user: the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Water Res.* **46**: 1430–7.
- Holland, T., A. St Amand, & G. Good. 2006. Otter Lake'05: A successful response. *Lakeline* **26**: 52–56.
- Hong, Y., A. Steinman, B. Biddanda, R. Rediske, & G. Fahnenstiel. 2006. Occurrence of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon lakes, Michigan. *J. Great Lakes Res.* **32**: 645–652.
- Istvánovics, V., H. M. Shafik, M. Présing, & S. Juhas. 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biol.* **43**: 257–275.
- Izaguirre, G., C. J. Hwang, S. W. Krasner, & M. J. McGuire. 1982. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 708–14.
- Jassby, A. D., & T. Platt. 1976. Mathematical formulation of the relationship photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **21**: 540–547.

- Jones, W. W., & S. Sauter. 2005. Distribution and abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana lakes and reservoirs.
- Kellmann, R., T. K. Mihali, Y. J. Jeon, R. Pickford, F. Pomati, & B. A. Neilan. 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 4044–53.
- Kellmann, R., T. Mills, & B. a Neilan. 2006. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *J. Mol. Evol.* **62**: 267–80.
- Kenesi, G., H. M. Shafik, A. W. Kovács, S. Herodek, & M. Présing. 2008. Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N<sub>2</sub> fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus-limited chemostat cultures. *Hydrobiologia* **623**: 191–202.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, Cambridge University Press.
- Leflaive, J., & L. Ten-Hage. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biol.* **52**: 199–214.
- Litchman, E. 2010. Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* **13**: 1560–72.
- Lürling, M., F. Eshetu, E. J. Faassen, S. Kosten, & V. L. M. Huszar. 2013. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biol.* **58**: 552–559.
- Majeed, W., Y. Zhang, Y. Xue, S. Ranade, R. N. Blue, Q. Wang, & Q. He. 2012. RpaA regulates the accumulation of monomeric photosystem I and PsbA under high light conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* **7**: e45139.
- Martigani, F. 2012. Influencia de la deficiencia por nutrientes en el crecimiento y la producción de toxinas de una cianobacteria invasora. Tesis de Licenciatura en Ciencias biológicas. Universidad de la República, Uruguay.
- Mehnert, G., F. Leunert, S. Cires, K. D. Johnk, J. Rucker, B. Nixdorf, & C. Wiedner. 2010. Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *J. Plankton Res.* **32**: 1009–1021.
- Mehnert, G., J. Rucker, A. Nicklisch, F. Leunert, & C. Wiedner. 2012. Effects of thermal acclimation and photoacclimation on lipophilic pigments in an invasive and a native cyanobacterium of temperate regions. *Eur. J. Phycol.* **47**: 182–192.

- Mihali, T. K., R. Kellmann, J. Muenchhoff, K. D. Barrow, & B. a Neilan. 2008. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 716–22.
- Moore, L. R., G. Rocap, & S. W. Chisholm. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**: 464–7.
- Moschini-Carlos, V., S. Bortoli, E. Pinto, P. Y. Nishimura, L. Gomes De Freitas, M. L. M. Pompêo, & F. Dörr. 2009. Cyanobacteria and cyanotoxin in the Billings reservoir (São Paulo, SP, Brazil). *Limnetica* **28**: 273–282.
- Neilan, B. a, M. L. Saker, J. Fastner, A. Törökné, & B. P. Burns. 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.* **12**: 133–40.
- Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. für Hydrobiol. Suppl. Monogr. beitrage* **107**: 563–593.
- Padisák, J., & C. S. Reynolds. 1998. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. *Hydrobiologia* **384**: 41–53.
- Paerl, H. W., & J. Huisman. 2008. Blooms like it hot. *Science* **320**: 57–58.
- Paerl, H. W., & V. J. Paul. 2012. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* **46**: 1349–63.
- Piccini, C., L. Aubriot, B. D’Alessandro, F. Martigani, & S. Bonilla. 2013. Revealing toxin signatures in Cyanobacteria: Report of genes involved in cylindrospermopsin synthesis from saxitoxin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Adv. Microbiol.* **03**: 289–296.
- Piccini, C., L. Aubriot, A. Fabre, V. Amaral, M. González-Piana, A. Giani, C. C. Figueredo, L. Vidal, C. Kruk, & S. Bonilla. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* **10**: 644–653.
- Plata-Díaz, Y. 2001. Distribución horizontal, biomasa y productividad primaria de la comunidad fitoplanctónica de la ciénaga de Chucurí (Santander, Colombia). Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander, Colombia.
- Reynolds, C. S. 1993. Scales of disturbance and their role in plankton ecology. *Hydrobiologia* **249**: 157–171.

- Reynolds, C. S. 1994. The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia* **289**: 9–21.
- Rucker, J., E. I. Tingwey, C. Wiedner, C. M. Anu, & B. Nixdorf. 2009. Impact of the inoculum size on the population of Nostocales cyanobacteria in a temperate lake. *J. Plankton Res.* **31**: 1151–1159.
- Saker, M. L., & B. A. Neilan. 2001. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales) from Northern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1839–1844.
- Saker, M. L., B. A. Neilan, & D. J. Griffiths. 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *J. Phycol.* **35**: 599–606.
- Sant'Anna, C. L., M. T. de P. Azevedo, V. R. Werner, C. R. Dogo, F. R. Rios, & L. R. de Carvalho. 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* **126**: 251–265.
- Schagerl, M., & B. Müller. 2006. Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. *J. Plant Physiol.* **163**: 709–16.
- Scheffer, M., & E. H. Nes. 2007. Shallow lakes theory revisited: various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth and lake size. *Hydrobiologia* **584**: 455–466.
- Schubert, H., M. Rodney, & S. Sagert. 1995. In situ measurement of state transition in cyanobacterial blooms : kinetics and extent of the state change in relation to underwater light and vertical mixing. **128**: 99–108.
- Schwaderer, A. S., K. Yoshiyama, P. de Tezanos Pinto, N. G. Swenson, C. A. Klausmeier, & E. Litchman. 2011. Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **56**: 589–598.
- Shafik, H. M., S. Herodek, M. Presing, & L. Vörös. 2001. Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba raju. *Arch. für Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* **140**: 75–93.
- Shafik, H. M., L. Vörös, P. Spróber, M. Présing, & A. W. Kovács. 2003. Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures. *Hydrobiologia* **506-509**: 163–167.

- Sinha, R., L. a Pearson, T. W. Davis, M. a Burford, P. T. Orr, & B. a Neilan. 2012. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones--is climate change responsible? *Water Res.* **46**: 1408–19.
- Sinha, R., L. A. Pearson, T. W. Davis, J. Muenchhoff, R. Pratama, A. Jex, M. A. Burford, & B. A. Neilan. 2014. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC Genomics* **15**: 83.
- Smith, V. H., & D. W. Schindler. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends Ecol. Evol.* **24**: 201–7.
- Soares, M., M. de A Rocha, M. Marinho, S. Azevedo, C. Branco, & V. Huszar. 2009. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquat. Microb. Ecol.* **57**: 137–149.
- Soares, M. C. S., V. L. M. Huszar, M. N. Miranda, M. M. Mello, F. Roland, & M. Lürling. 2013. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia* **717**: 1–12.
- Stanier, R. Y., R. Kunisawa, M. Mandel, & G. Cohen-Bazire. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **35**: 171–205.
- Stevenson, B. S., M. T. Suflita, B. W. Stamps, E. R. B. Moore, C. N. Johnson, & P. A. Lawson. 2011. *Hoeflea anabaenae* sp. nov., an epiphytic symbiont that attaches to the heterocysts of a strain of *Anabaena*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 2439–44.
- Stevenson, B. S., & J. B. Waterbury. 2006. Isolation and identification of an epibiotic bacterium associated with heterocystous *Anabaena* cells. *Biol. Bull.* **210**: 73–7.
- Stewart, I., P. J. Schluter, & G. R. Shaw. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environ. Health* **5**: 7.
- Stomp, M., M. a van Dijk, H. M. J. van Overzee, M. T. Wortel, C. a M. Sigon, M. Egas, H. Hoogveld, H. J. Gons, & J. Huisman. 2008. The timescale of phenotypic plasticity and its impact on competition in fluctuating environments. *Am. Nat.* **172**: 169–85.
- Stucken, K., U. John, A. Cembella, A. a Murillo, K. Soto-Liebe, J. J. Fuentes-Valdés, M. Friedel, A. M. Plominsky, M. Vásquez, & G. Glöckner. 2010. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS One* **5**: e9235.

- Stucken, K., A. Murillo, K. Soto-Liebe, J. J. Fuentes-Valdés, M. Méndez, & M. Vásquez. 2009. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**: 37–48.
- Sukenik, A., O. Hadas, A. Kaplan, A. Quesada, H. S. Marine, & R. M. Morgan-kiss. 2012. Invasion of Nostocales (Cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes - physiological, regional, and global driving forces. *Front. Microbiol.* **3**: 86.
- Vandergucht, D. M., J. M. Sereda, J.-M. Davies, & J. J. Hudson. 2013. A comparison of phosphorus deficiency indicators with steady state phosphate in lakes. *Water Res.* **47**: 1816–26.
- Vidal, L., & C. Kruk. 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34° 53' S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Panam. J. Aquat. Sci.* **3**: 142–151.
- Vinyard, D. J., J. Gimpel, G. M. Ananyev, M. A. Cornejo, S. S. Golden, S. P. Mayfield, & G. C. Dismukes. 2013. Natural variants of photosystem II subunit D1 tune photochemical fitness to solar intensity. *J. Biol. Chem.* **288**: 5451–62.
- Ward, D. M., M. M. Bateson, M. J. Ferris, M. Kühl, A. Wieland, A. Koeppel, & F. M. Cohan. 2006. Cyanobacterial ecotypes in the microbial mat community of Mushroom Spring (Yellowstone National Park, Wyoming) as species-like units linking microbial community composition, structure and function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**: 1997–2008.
- Whitton, B. A., & M. Potts. 2002. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space, B.A. Whitton and M. Potts [eds.]. Springer Netherlands.
- De Wit, R., & T. Bouvier. 2006. “Everything is everywhere, but, the environment selects”; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ. Microbiol.* **8**: 755–8.
- Wood, S. A., & D. J. Stirling. 2003. First identification of the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **37**: 821–828.
- Wu, J.-H., M.-H. Hsu, C.-H. Hung, I.-C. Tseng, & T.-F. Lin. 2010. Development of a hierarchical oligonucleotide primer extension assay for the qualitative and quantitative analysis of *Cylindrospermopsis raciborskii* subspecies in freshwater. *Microbes Environ.* **25**: 103–110.

- Wu, Z., J. Shi, P. Xiao, Y. Liu, & R. Li. 2011. Phylogenetic analysis of two cyanobacterial genera *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* based on multi-gene sequences. *Harmful Algae* **10**: 419–425.
- Wu, Z., J. Shi, & S. Yang. 2013. The effect of pyrogallol acid on growth, oxidative stress, and gene expression in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Ecotoxicology* **22**: 271–8.
- Yilmaz, M., & E. J. Phlips. 2011a. Diversity of and selection acting on cylindrospermopsin *cyrB* gene adenylation domain sequences in Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 2502–7.
- Yilmaz, M., & E. J. Phlips. 2011b. Toxicity and genetic diversity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Florida, USA. *Lake Reserv. Manag.* **27**: 235–244.
- Yilmaz, M., E. J. Phlips, N. J. Szabo, & S. Badylak. 2008. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon* **51**: 130–9.
- Zalocar de Domitrovic, Y., Vi. M. Asselborn, & S. L. Casco. 1998. Variaciones espaciales y temporales del fitoplancton en un lago subtropical de Argentina. *Rev. Bras. Biol.* **58**: 359–382.

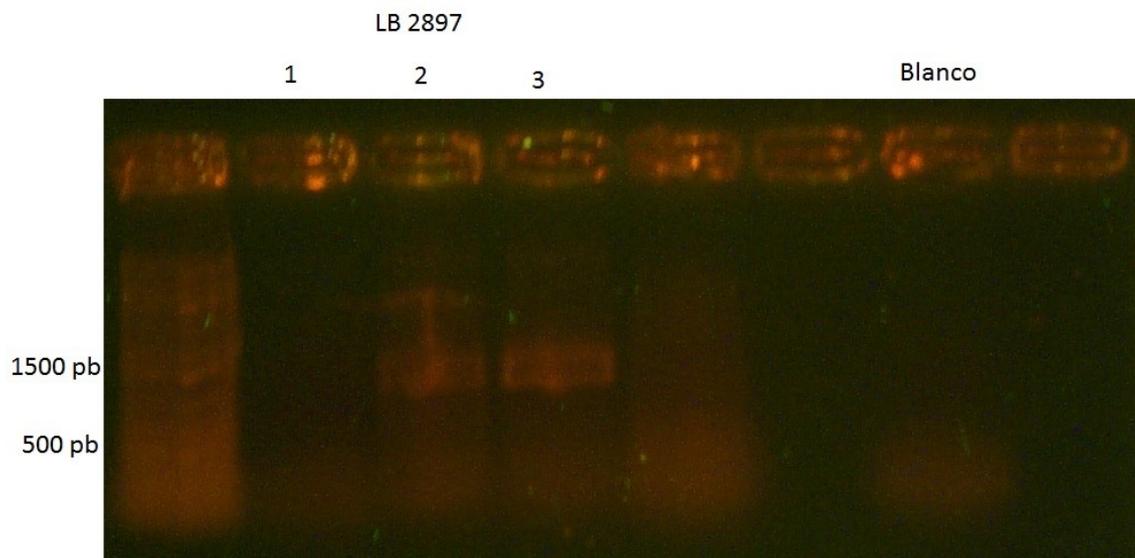
## 10 ANEXO

### 10.1 Búsqueda preliminar de genes *cyr* en la cepa LB 2897

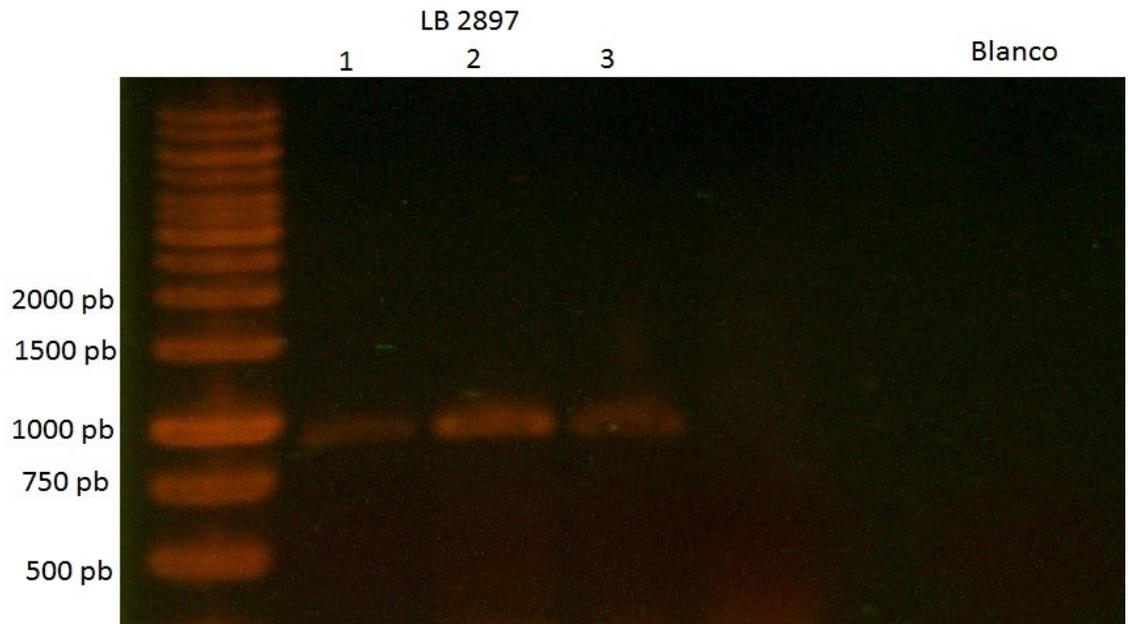
La reacción de PCR fue realizada en un volumen de 25  $\mu$ L conteniendo PCR Buffer 1 $\times$  (Invitrogen), 1 UA *Taq*-polimerasa (Invitrogen), 0.4 mM de cada dNTP (Invitrogen), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pM de cada primer y 2  $\mu$ L de muestra. Agua de PCR fue usada como control negativo. La reacción consistió de un ciclo inicial de 5 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 48°C y 1 min a 72°C, y un ciclo final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa 0.9% durante tiempos variables, a 90 V. El gel se tiñó por inmersión en una solución de Gelred durante 25 min con agitación. Se tomaron fotos del gel en un transiluminador ultravioleta. El contraste y el color de las fotos fueron ajustados con el programa ImageJ. Los primers usados fueron CYLATF y CYLATR (1105 pb) para el gen *cyrA*, y A205PKF y A205PKR (558 pb) para *cyrC*. No se obtuvieron resultados al amplificar *cyrB* mediante los primers CPSF y CPSR. Los geles se vieron poco definidos, probablemente a un error en la preparación de buffer de corrida. De las 3 extracciones, solo dos amplificaron el gen *cyrA* (Fig. I y II), mientras que *cyrC* mostró claramente una banda que no se corresponde con el tamaño esperado de amplicón (Fig. III), por lo que podría haber contaminación o confusión entre primers.



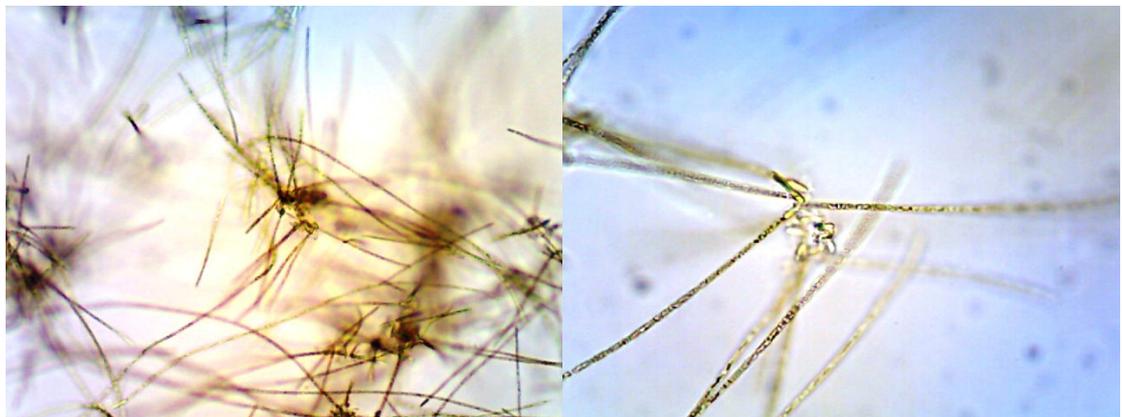
**Figura I.** Fragmento de gel de agarosa 0.9% teñido con Gelred mostrando productos de amplificación por PCR del gen *cyrA* (823 pb) de tres extracciones de ADN paralelas de la cepa LB2897. Se muestra también el marcador (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen) degradado. Agua para PCR fue usada como control negativo (Blanco).



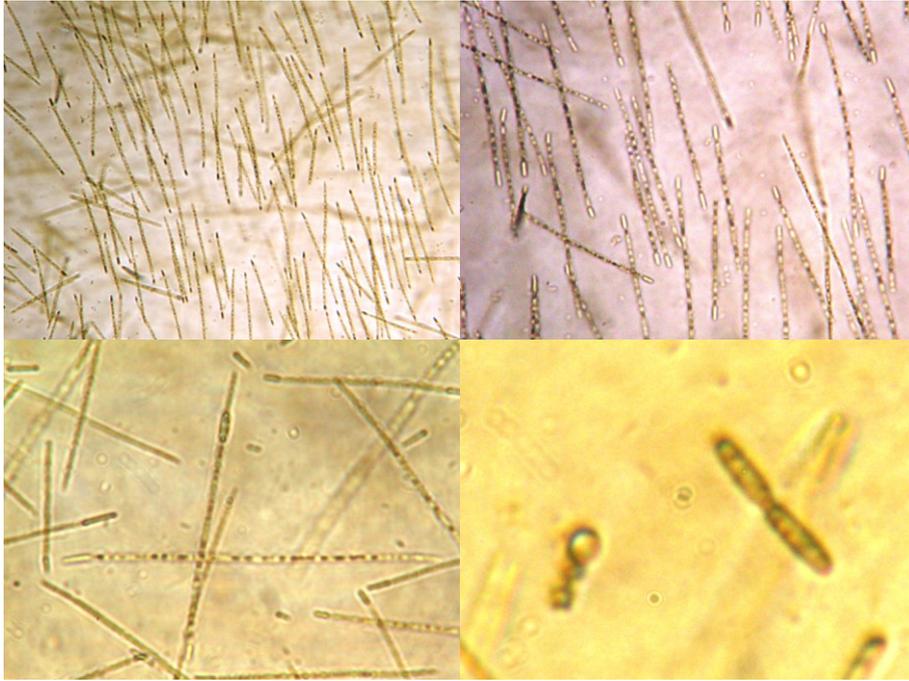
**Figura II.** Fragmento de gel de agarosa 0.9% teñido con Gelred mostrando productos de amplificación por PCR del gen *cyrA* (823 pb) de tres extracciones de ADN paralelas de la cepa LB2897. Se muestra también el marcador (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen). Agua para PCR fue usada como control negativo (Blanco).



**Figura III.** Fragmento de gel de agarosa 0.9% teñido con Gelred mostrando productos de amplificación por PCR del gen *cyrC* (558 pb) de tres extracciones de ADN paralelas de la cepa LB2897. Se muestra también el marcador (1 kb DNA ladder, Invitrogen). Agua para PCR fue usada como control negativo (Blanco).



**Figura IV.** Microfotografía de cultivos de la cepa LB 2897. Se ven los filamentos largos, levemente curvados, y la unión entre los filamentos por sus heterocitos. Aumentos: izquierda 100x, derecha 400x.



**Figura V.** Microfotografías de cultivos de la cepa MVCC35. Se ven los filamentos cortos y rectos, un filamento con un acinete en formación, y dos acinetes unidos. Aumentos: arriba izquierda 100x, arriba derecha 200x, abajo izquierda 400x, abajo derecha 1000x.

o