

UCH-FC
Biotecnología
F 954e
C-1

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

ESTUDIOS GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS EN LA CIANOBACTERIA
***Cylindrospermopsis raciborskii*, PRODUCTORA DE TOXINAS DEL VENENO**
PARALIZANTE DE MARISCO (VPM)

Memoria de Título
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Loreto Fernanda Fuenzalida Inostroza

Diciembre, 2005
Santiago-Chile

Director de Memoria de Título: Dra. Mónica Vásquez Pérez



**“ESTUDIOS GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS EN LA
CIANOBACTERIA *Cylindrospermopsis raciborskii*,
PRODUCTORA DE TOXINAS DEL VENENO
PARALIZANTE DE MARISCO (VPM)”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

LORETO FERNANDA FUENZALIDA INOSTROZA.

Dra. Mónica Vásquez Pérez
Director de Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidente Comisión

Dr. Nicolás Guiliani
Corrector

Santiago de Chile, Diciembre de 2005



“Llegué a la Universidad de Chile en el año 1998. Como todo nuevo alumno, con mucho susto y con las ganas de comenzar una nueva experiencia. Hoy, en esta última etapa en la Facultad de Ciencias, me doy cuenta de que lo que aprendí y descubrí fue mucho más allá que una carrera universitaria, fue una experiencia de vida y un grupo de personas que jamás olvidaré”

EDICATORIA

*“A mis padres, hermanos y, de manera especial,
a Francisco”*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Mónica Vásquez, por sus conocimientos entregados y apoyo, por enseñarme a ser fuerte en los malos momentos, a disfrutar de los buenos momentos y a sacar de ellos lo que me haga ser mejor persona. Profe, muchas gracias por todo, nunca olvidaré que “un resultado es un resultado” y que las dificultades nos hacen más fuertes.

Sin duda, no hubiese llegado hasta aquí sin la ayuda de mis padres, Francisco y Selma. Muchas gracias por su esfuerzo, dedicación y apoyo, por entender que “biotecnología”, a pesar de que parece algo un poco extraño y de nombre complicado, tiene una gran importancia y que la ciencia es un misterio que poco a poco se va resolviendo. Creo que desde ahora van a ver los frutos de su gran esfuerzo y espero no defraudarlos. Mi esfuerzo de todos estos años es por Ustedes y para Ustedes. También quiero agradecer a mis lindos hermanos: Francisco, Carolina, Rocío y Fernanda, por su compañía y cariño durante todo este proceso universitario, por alegrarse con mis triunfos y apoyarme en los malos momentos, muchas gracias queridos “hermanos”. Agradezco a mi abuelita Adela por su sabiduría con la que ha sabido ayudarme en todo momento y a mi tía Eugenia por su cariño y preocupación También a mis tías M^a Ligia y Maríanela, por su preocupación y el enorme cariño que me dieron, aunque están lejos sé que están conmigo y les prometo que el estudio que realice de ahora en adelante contribuirá a salud por la que tanto lucharon. Sin esta maravillosa familia no hubiese llegado a cumplir esta meta.

Durante el desarrollo de mi tesis conocí a personas maravillosas: Claudia, Ursula, Gastón, Erika, Jessica, Karina y Katya que me ayudaron incondicionalmente y me acompañaron largas horas de espera en el laboratorio, regresos a casa, conversaciones de la vida y del más allá. A todos Ustedes muchísimas gracias.

Agradezco al Dr. Víctor Cifuentes y al Dr. Nestor Lagos por facilitarme los equipos necesarios para el desarrollo de los experimentos de PFGE y HPLC. No puedo dejar de agradecer a Salvador y a Rodrigo, dos personas sin las cuales no podría tener los resultados que les presento en esta tesis.

Creo que una de las mejores cosas de mi paso por la universidad, son las personas que aquí conocí. Por eso quiero agradecer a todos los amigos que hice en la Facultad de Ciencias, nunca olvidaré las largas horas de estudio y fiestas compartidas y por supuesto su compañía en penas y alegrías. Los momentos vividos son inolvidables y les agradezco a todos Ustedes por eso.

Finalmente, quiero agradecer a una de las personas que más me apoyó y me entregó su cariño: Francisco. Amor, muchas gracias por todo, llegaste en el momento más indicado a mi vida y te doy muchas gracias por eso. Creo a nadie le queda duda que la persona con más paciencia en el mundo eres tú. Gracias también a tu familia, por ser tan cariñosos y preocupados. Siento que dentro de todo lo bueno que pude aprender y conocer en la U, lejos eres lo mejor que llegó a mi vida. Gracias por todo tu amor y apoyo. Te amo y te amaré para siempre....

Estas tesis fue financiada gracias a los proyectos DI- U. de Chile-Iniciación, Fundación Andes C-13680/5 y DI-U. de Chile/ CSMAR 02/5-2DI- U. de Chile.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	10
MATERIALES Y METODOS	12
1. Cepa y condiciones de cultivo	12
2. Obtención de un cultivo clonal a partir de <i>C. raciborskii</i> SPC338.....	12
2.1 Preparación de un cultivo clonal.....	12
2.2 Extracción y análisis de restricción del gen 16S rRNA (Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA) de una cepa clonal de <i>C.</i> <i>raciborskii</i>	13
2.2.1 Eliminación de bacterias acompañantes del cultivo de <i>C. raciborskii</i>	13
2.2.2 Tinción de bacterias con naranja de acridina y recuento mediante microscopía de epifluorescencia.....	14
2.2.3. Extracción de DNA genómico.....	14

2.2.4. Amplificación y análisis de restricción del gen 16S rRNA (Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA) de la cepa clonal de <i>C. raciborskii</i>	15
3 Caracterización genotípica del cultivo clonal de <i>C. raciborskii</i>	17
3.1. Análisis de la región espaciadora (ITS) entre los genes 16S y 23S rDNA del cultivo clonal <i>C. raciborskii</i> D9	17
3.2. Estimación del tamaño genómico de <i>C. raciborskii</i> mediante Electroforesis por campo pulsado (PFGE).	18
3.2.1. Electroforesis por Campo Pulsado	18
3.2.2 Preparación de estándares de DNA para PFGE.....	19
3.2.3 Preparación de moldes de agarosa de <i>C. raciborskii</i> para análisis por PFGE.	20
3.2.4. Evaluación de la calidad de los moldes de agarosa	22
3.2.5 Digestión del DNA cromosomal de <i>C. raciborskii</i> embebido en moldes de agarosa.	23
3.2.6. Condiciones de corrida para PFGE de DNA cromosomal sin digerir	24
3.2.7. Extracción desde agarosa del DNA cromosomal luego del PFGE y posterior amplificación por PCR.	24
3.2.8. Condiciones de corrida para PFGE de DNA digerido.....	25
4. Caracterización fisiológica de <i>C. raciborskii</i>	25
4.1. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y la razón de la concentración de nitrógeno y fósforo en el crecimiento y niveles intra y extracelular de STX en <i>C. raciborskii</i>	25

4.1.1 Evaluación del crecimiento mediante cuantificación espectroscópica de clorofila <i>a</i>	26
4.1.2. Obtención y tratamiento de las muestras de cultivo de <i>C. raciborskii</i> para el análisis de toxinas por HPLC.	27
4.1.3. HPLC-FLD y derivatización postcolumna para la detección de toxinas en las muestras de cultivo de <i>C. raciborskii</i> D9.....	28
4.2. Efecto de urea y NH ₄ Cl como fuente de nitrógeno en el crecimiento de <i>C. raciborskii</i>	29
4.2.1. Detección de la producción de ureasa en cianobacterias y microbiota acompañante.	31
4.2.2. Análisis de la producción de ureasa en bacterias acompañantes.....	32
RESULTADOS	34
1. Obtención de un cultivo clonal a partir de <i>C. raciborskii</i> SPC338.....	34
1.1. Aislamiento, clonalidad y evaluación de la axenidad del aislado.	34
1.2. Extracción de DNA genómico de <i>C. raciborskii</i> D9 y verificación de clonalidad del cultivo mediante ARDRA.....	35
2. <i>Caracterización genotípica de C. raciborskii</i> D9	37
2.1 Análisis de la región espaciadora (ITS) entre los genes 16S y 23S rDNA del cultivo clonal de <i>C. raciborskii</i>	37
2.2. Análisis mediante PFGE de <i>C. raciborskii</i> D9.....	38
2.2.1. Evaluación de la integridad del DNA en los moldes de agarosa usando dos protocolos de preparación y lisis.....	38
2.2.2.1. Identificación de la procedencia del DNA observado en el PFGE.....	39

3. Caracterización fisiológica de <i>C. raciborskii</i>	44
3.1. Efecto del tipo de fuente de nitrógeno y de la razón de las concentraciones de nitrógeno y fósforo en el crecimiento y niveles intra y extracelular de STX producidos por <i>C. raciborskii</i> D9.	44
3.2. Efecto de urea y NH ₄ Cl como fuente de nitrógeno en el crecimiento de <i>C.</i> <i>raciborskii</i>	47
3.3. Producción de ureasa en el cultivo de <i>C. raciborskii</i> D9.....	48
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES.....	62
REFERENCIAS.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas y concentraciones utilizadas en la digestión del DNA cromosomal de <i>C. raciborskii</i> D9.....	23
Tabla 2. Condiciones de corrida para PFGE de DNA cromosomal sin digerir.	24
Tabla 3. Condiciones de corrida para PFGE de DNA cromosomal digerido.	25
Tabla 4. Razones de nitrógeno y fósforo utilizados en el medio de cultivo de <i>C. raciborskii</i> D9.....	26
Tabla 5. Concentraciones de NH ₄ Cl utilizadas como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de <i>C. raciborskii</i> D9.....	29
Tabla 6. Concentración de NaCl en el medio de cultivo de <i>C. raciborskii</i>	30
Tabla 7. Concentraciones de urea utilizadas como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de <i>C. raciborskii</i> D9.....	30
Tabla 8. Ensayo de agar ureasa en <i>C. raciborskii</i> D9 con y sin microbiota acompañante.	32
Tabla 9. Tamaño de los fragmentos de restricción generados con la enzima <i>Mlu</i> I en el genoma de <i>C. raciborskii</i> D9.	43

INDICE DE FIGURAS



Figura 1. Estructura de la saxitoxina (STX) y sus análogos.....	2
Figura 2. Microscopía de epifluorescencia de un cultivo no axénico de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	5
Figura 3. Diferentes sistemas de electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE).....	7
Figura 4. Microscopía de epifluorescencia de cultivo de <i>C. raciborskii</i> D9 antes y después de protocolo de lavados.....	34
Figura 5. Extracción de DNA genómico de <i>C. raciborskii</i> D9 mediante Kirby Mix. .	35
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del ARDRA de <i>C. raciborskii</i> D9 con la enzima <i>EcoRI</i>	36
Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de amplificación por PCR correspondientes a los ITS de <i>C. raciborskii</i> D9.....	37
Figura 8. Electroforesis por campo pulsado de DNA genómico de <i>C. raciborskii</i> D9 preparado con diferentes protocolos.....	39
Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos ITS amplificados por PCR, desde bandas extraídas del gel de PFGE de <i>C. raciborskii</i> D9.	40
Figura 10. Electroforesis por campo pulsado de DNA cromosomal de <i>C. raciborskii</i> D9 digerido con enzimas de restricción.	42
Figura 11. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y razones de nitrógeno: fósforo en el crecimiento y producción de STX de <i>C. raciborskii</i> D9.....	44
Figura 12. Detección de STX mediante HPLC-FLD.	46
Fig. 13. Crecimiento de <i>C. raciborskii</i> D9 en diferentes concentraciones de NH ₄ Cl	

como fuente de nitrógeno.....	47
Fig. 14. Crecimiento de <i>C. raciborskii</i> D9 en diferentes concentraciones de NaCl.....	47
Fig. 15. Crecimiento de <i>C. raciborskii</i> D9 en diferentes concentraciones de urea como fuente de nitrógeno.	48
Figura 16. Ensayo Christensen-Urea-agar para detectar producción de ureasa.	49
Figura 17. Aislamiento de microbiota acompañante (dilución 1/50) de <i>C. raciborskii</i> D9 en medio Christensen-Urea-agar en placa para detectar producción de ureasa.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxiribonucleico

ARDRA: Amplificación y análisis de restricción del gen 16S rRNA (Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis)

RNA: ácido ribonucleico

CYL: cilindrospermopsina

dcSTX: decarbamoil saxitoxina

EDTA: Acido etilen-diamintetra acético

FAN: florecimientos algales nocivos

GTX: gonyautoxina

HPLC-FLD: Cromatografía Líquida de Alta Presión con Detección de Fluorescencia en Línea. (High-Performance Liquid Chromatography, with direct fluorescence detection)

ITS: región espaciadora intergénica (Intergenic Spacer)

Kb: kilo bases

LMP: agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Point)

Mb: mega bases

N: nitrógeno

Na⁺: ión sodio

NEO: neosaxitoxina

NH₄⁺: ión amonio

NRPS: péptido sintetasa no ribosomal (nonribosomal peptide synthetase)

b: bases

P: fósforo

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis por campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis)

PMSF: fenil metil sulfonil fluorhidro

rpm: revoluciones por minuto

PSP: Veneno Paralizante de Molusco (Paralytic Shellfish Poisoning)

SCB: bloqueadores de canales de sodio (sodium channel blocking)

STX: saxitoxina

UV: ultravioleta

VPM: veneno paralizante de marisco

RESUMEN

El veneno paralizante de mariscos (VPM) es producido tanto por dinoflagelados marinos, en el caso de Chile, *Alexandrium catenella*, como por cianobacterias de agua dulce. Cuando el VPM está asociado al fitoplancton puede ser acumulado por bivalvos filtradores, y así transmitida a los humanos. Estas toxinas actúan bloqueando los canales de sodio de células de mamífero, provocando la muerte generalmente por parálisis respiratoria. El VPM causa grandes pérdidas económicas en Chile y el resto del mundo, sin mencionar el gran problema de salud que ocasiona. Las toxinas que conforman el VPM son todas análogas a saxitoxina (STX). La ruta biosintética de STX es desconocida y la complejidad génica de los dinoflagelados hace de estos últimos un difícil modelo de estudio. Las cianobacterias, en cambio, poseen un genoma más pequeño y menos complejo que los dinoflagelados. *Cylindrospermopsis raciborskii* es una de las especies de cianobacterias de agua dulce capaz de producir STX y análogos. De esta cianobacteria filamentosa, fijadora de nitrógeno y originaria de regiones tropicales y subtropicales que pertenece al orden *Nostocales*, se han descrito cepas no productoras de toxinas y cepas productoras de la hepatotoxina cilindrospermopsina (CYL), y de STX. En esta Tesis, se escogió a *C. raciborskii* como modelo de estudio para realizar análisis preliminares que permitan entender cómo ocurre la biosíntesis de STX. A partir del cultivo de *C. raciborskii* SCP338 (cultivo mixto y no axénico) se obtuvo un cultivo unialgal, llamado D9, el cual no llegó a ser axénico. La proporción relativa de bacterias acompañantes en un concentrado de células de *C. raciborskii* D9, se logró reducir mediante un protocolo de lavados. Utilizando preparaciones de este tipo, se optimizó un

procedimiento que permitió obtener un DNA genómico íntegro para poder estimar su tamaño mediante digestión con enzimas de restricción de corte poco frecuente y electroforesis de campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE). La optimización de las condiciones de electroforesis requirió numerosos ensayos variando los parámetros de pulsos, tiempos de corrida, concentración de agarosa, etc. Los resultados mostraron que *C. raciborskii* D9 tiene un cromosoma estimado de 1,7 a 2,0 Mb aproximadamente. No fue posible detectar elementos extracromosomales en los rangos de tamaños analizados. La obtención de un DNA genómico íntegro es el primer paso para realizar los futuros análisis genómicos de *C. raciborskii* D9.

En el aspecto fisiológico, y con la perspectiva de pesquisar condiciones de máxima y mínima producción de toxinas, se analizó el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno (nitrato de sodio o urea) y la variación en las razones de nitrógeno : fósforo (84: 6 mg/l; 84: 0,06 mg/l; 0,84: 6 mg/l; 0,84: 0,06 mg/l) en el crecimiento y niveles intra y extra-celular de STX producidos por *C. raciborskii* D9. El crecimiento fue determinado mediante cuantificación de clorofila *a* y la concentración de STX fue estimada mediante cromatografía líquida de alta resolución y detección de fluorescencia en línea (HPLC-FLD). Los resultados indicaron que la limitación de nitrógeno (0,84 mg/l) no permiten el crecimiento de *C. raciborskii* D9 en ambas fuentes de nitrógeno usadas. La alta razón de nitrógeno adicionado como urea, no permite el crecimiento. El nitrato de sodio resultó ser la mejor fuente de nitrógeno, ya que permite un buen crecimiento de *C. raciborskii* D9 y por esto, las mediciones de toxina se realizaron en este medio. El crecimiento en baja razón N:P (1:0,07) permite alcanzar niveles de crecimiento mayores que con alta razón N:P (1:0,0007) solamente en la fase estacionaria

de crecimiento. Se detectó mayor cantidad de toxina en medio con bajo fósforo (N:P de 1:0,0007), que en medio con alto fósforo (N:P de 1:0,07). Tanto en nitrógeno como urea, la toxina fue acumulada en la fracción celular y la mayor detección de toxina coincide con el momento de mayor crecimiento de *C. raciborskii* D9. Al final de la fase de muerte celular (día 45) no se detectó toxina en la fracción celular, y muy poca en sobrenadante, indicando una posible biotransformación o simplemente degradación de la toxina. *C. raciborskii* D9 no es capaz de crecer en medio con altas concentraciones de urea (mayor a 1,5 mM) como fuente de nitrógeno, y alcanza un mayor crecimiento en medio con nitrato de sodio que con cloruro de amonio. Experimentos posteriores indicaron que posiblemente el ión cloruro no fue el factor limitante en el crecimiento en medio con cloruro de amonio.

En resumen, considerando el tamaño aproximado de *C. raciborskii* D9, la obtención de DNA adecuado para análisis moleculares y un método confiable de estimación del crecimiento, se plantea que esta cianobacteria es un modelo simple para estudios genómicos que permitan determinar los genes involucrados en la síntesis de toxinas paralizantes.

ABSTRACT

Paralytical Shellfish Poisoning (PSP) toxins are produced by both marine dinoflagellates (in Chile mostly *Alexandrium catenella*) and freshwater cyanobacteria. When PSP toxins are associated with phytoplankton they can be accumulated by filter feeding bivalves, and subsequently conveyed to humans. PSP toxins act by blocking sodium channels in mammalian cells, inducing generally death by respiratory paralysis. In addition to great health problem associated, the PSP toxins cause an enormous economical impact in Chile and the rest of the world. Toxins that comprise the PSP are all analogs of saxitoxin (STX). The biosynthetic pathway of STX is unknown and the genetic complexity of the dinoflagellates makes them a difficult model to study. Cyanobacteria, however, have a smaller genome and it is less complex than that of the dinoflagellates. *Cylindrospermopsis raciborskii* is one of the species of freshwater cyanobacteria able to produce STX and its analogs. These filamentous cyanobacteria belong to the Order Nostocales, are able to fix nitrogen and are found in tropical and subtropical regions. Non-toxin producing strains, strains producing the hepatotoxin cylindrospermopsine (CYL), and strains producing STX have been described. In this Thesis, *C. raciborskii* was selected as a model to analyze how the biosynthesis of STX occurs. Starting from the *C. raciborskii* SCP338 culture (that was mixed and nonaxenic) a unialgal culture was obtained, named D9. This culture was not axenic. The proportion of bacteria associated to *C. raciborskii* D9 in a concentrate of these cells was substantially reduced by a wash protocol. Using this kind of preparations, a procedure

was optimized to obtain integral genomic DNA. This DNA was suitable for digestion with restriction enzymes with infrequent targets estimation of the genome size by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE). Optimization of the electrophoresis conditions required several tests with variation of pulses, run times, agarose concentration. The results showed that *C. raciborskii* D9 had a chromosome in a range of 1,7 to 2,0 Mb approximately. It was not possible to detect any extra chromosomal elements in the size range analyzed. The attainment of an integral genomic DNA is the first step to make the future genomic analyses of *C. raciborskii* D9.

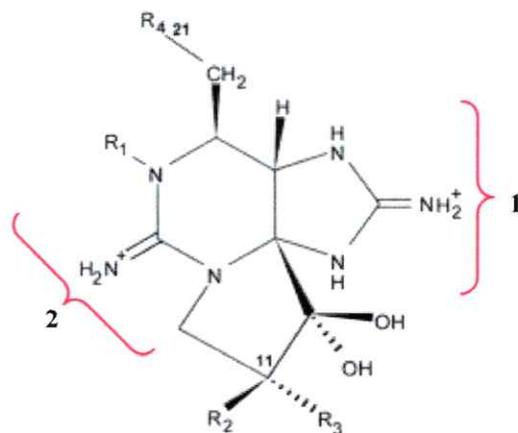
In the physiological aspect, and with the perspective to define conditions of maximum and minimum toxin production, we analyzed the effects of different nitrogen sources (sodium nitrate vs. urea) and of different nitrogen: phosphorus ratios (84: 6 mg/l; 84: 0,06 mg/l ; 0,84: 6 mg/l ; 0,84: 0,06 mg/l) on growth and intra- and extracellular levels of STX produced. Growth was determined by chlorophyll *a* quantification and the STX concentration was obtained by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence on Line Detection (HPLC-FLD). Nitrogen limitation (0,84 mg/l) did not allow growth of *C. raciborskii* D9 in both nitrogen sources used. Higher nitrogen ratio add as urea, did not allow growth. Sodium nitrate was the best nitrogen source, since it allowed good growth of *C. raciborskii* D9; for this reason, the measurements of toxin production were realized in this media. Growth with a low N:P ratio (1:0,07) allowed higher growth than with a high N:P ratio (1:0,0007), only in the stationary phase. Was detected higher amounts of toxin in the medium with low phosphorus (N:P 1:0,0007), than the produced in the medium with high phosphorus (N:P 1:0,07). As much in sodium nitrate as urea, the toxins was accumulated in the cellular

fraction and the highest toxin detection corresponded with the moment of higher growth. At the end of the death-phase (day 45) toxin was not detected in the cellular fraction and very little amounts were found in the supernatant, indicating a possible biotransformation or simple toxin degradation. *C. raciborskii* D9 was not able to grow in media with high concentrations of urea (higher than 1,5 mM) as nitrogen source, and reached higher growth in media with sodium nitrate than with ammonium chloride. Further experiments indicated that possibly the chloride ion was not the growth limiting factor when the media contained ammonium chloride as a nitrogen source.

In summary, considering the estimated size of *C. raciborskii* D9 genome, the DNA preparation for molecular analyses and the reliable method of estimation of growth, we propose that this cyanobacterium is a good, simple model for genomic studies that will help to identify the genes involved in the synthesis of the paralyzing toxin.

1. INTRODUCCION

El Veneno Paralizante de Mariscos (VPM) está compuesto por un grupo de toxinas que bloquean los canales de sodio en mamíferos. A la fecha se han descrito 26 tipos diferentes de toxinas del VPM, todos análogos a la saxitoxina (STX), una de las más potentes. Las toxinas del VPM son hidrofílicas, de bajo peso molecular (bajo los 500 Da) formadas por un esqueleto básico de 3, 4, 6-trialquil tetrahidropurina. Se clasifican en tres grandes grupos: i) carbamatos que incluyen a la STX, neosaxitoxina (NEO) y las gonyautoxinas (GTX1, 2, 3 y 4); ii) N-sulfocarbamoil toxinas que constan de GTX5 y las C toxinas y iii) las decarbamoil toxinas (Lagos, 1998) (Fig. 1). Estas moléculas son una clase de alcaloides neurotóxicos que comprenden diferentes isoformas y con variadas toxicidades (Strichartz, 1981). La STX es capaz de unirse a la membrana nerviosa con gran afinidad (Catterall, 1980). La unión se realiza del lado extracelular de la membrana plasmática y provoca la oclusión de la entrada del poro del canal de Na^+ , donde la carga positiva del grupo guanidinio de las VPM interactúa con la carga negativa del grupo carboxilo del monte del canal (Cetèle y Catterall, 2000). La STX y sus análogos al bloquear los canales de sodio de las células neuronales y musculares de mamífero, impiden la transmisión del impulso nervioso y generan una parálisis muscular (Gallacher y col., 1992). Por lo tanto, la causa de muerte por intoxicación con VPM es el paro respiratorio.



Toxins	R1	R2	R3	R4
Carbamate				
STX	H	H	H	CONH ₂
NEO	OH	H	H	CONH ₂
GTX 1	OH	H	OSO ₃	CONH ₂
GTX 2	H	H	OSO ₃	CONH ₂
GTX 3	H	OSO ₃	H	CONH ₂
GTX 4	OH	OSO ₃	H	CONH ₂
N-Sulfocarbamoyl				
GTX 5	H	H	H	CONHSO ₃
C1	H	H	OSO ₃	CONHSO ₃
C2	OH	OSO ₃	H	CONHSO ₃
C3	OH	H	OSO ₃	CONHSO ₃
C4	OH	OSO ₃	H	CONHSO ₃
Decarbamoyl				
dcGTX2	H	H	OSO ₃	H
dcGTX3	H	OSO ₃	H	H

Fig. 1. Estructura de la saxitoxina (STX) y sus análogos. Los motivos guanidínicos se muestran resaltados con una llave. R1, R2, R3 y R4 son los sustituyentes de la estructura básica de la STX.

Cuando el VPM está presente en el plancton es concentrado por bivalvos filtradores (de donde deriva su nombre) tales como choritos, cholgas, almejas y ostras, principales recursos explotados en nuestro país. Este fenómeno genera un fuerte impacto económico en Chile, causando pérdidas entre US\$ 10 y 50 millones anuales. También tienen un impacto social, ya que afecta a numerosas comunidades de pescadores artesanales y mariscadores del Sur de Chile. Por lo tanto, los problemas de salud y las implicaciones económicas de los Florecimientos Algae Nocivos (FAN), conocidos

popularmente como “marea roja”, son enormes. En las últimas décadas se ha detectado niveles tóxicos de VPM en las regiones XI y XII de Chile, asociados a florecimientos de especies tóxicas de dinoflagelados (Vélez y col., 2001). En el año 2002 la contaminación se extendió a la X región, declarándose en esa oportunidad 4 comunas de Chiloé como área de catástrofe. En las regiones de Aysén y Magallanes entre 1972 y 2000 se registraron 387 intoxicaciones por VPM, incluyendo 26 casos fatales (Guzman y col., 2002).

Las toxinas del VPM pueden ser producidas por dinoflagelados, cianobacterias (algas verde-azules) y por bacterias marinas heterótrofas, aunque en este último caso la evidencia aún no es definitiva. Dentro de los dinoflagelados hay tres géneros que se asocian a VPM: *Alexandrium* sp., *Pyrodinium* sp. y *Gymnodinium* sp. (Hallegraeff, 1993), los cuales se distribuyen ampliamente en el mundo. Los dinoflagelados son organismos eucariontes, difícilmente axénicos, cuyo tamaño genómico está en el rango de 3.000 a 215.000 Mb (Spector, 1984). En comparación, el tamaño del genoma de diferentes especies de cianobacterias se encuentra entre 1,8 Mb y 13,6 Mb (Strehl y col., 1999).

Dentro de las cianobacterias se reconocen cinco especies productoras de VPM: *Aphanizomenon flos-aquae* (Mahmood y Carmichael., 1986), *Lyngbya wollei* (Onodera y col., 1997), *Anabaena circinalis* (Humpage y col., 1994), *Cylindrospermopsis raciborskii* (Lagos y col., 1999) y *Planktothrix* sp. (Pomati y col., 2000). En ambientes de agua dulce, las toxinas del VPM están casi exclusivamente asociadas a cianobacterias, y la aparición de aumentos masivos de dichas bacterias se han incrementado en los últimos años (Kaas y Henriksen, 2000; Pereira y col., 2000; Pomati

y col., 2000). Las cianobacterias son procariontes pertenecientes al dominio Eubacteria; a la fecha se han descrito alrededor de 1000 especies que componen este linaje. Estos organismos fotoautotróficos, poseen la habilidad de sintetizar clorofila *a* además de otros pigmentos como ficocianina y ficoeritrina. Las especies que poseen células diferenciadas denominadas heterocistos, son capaces de fijar nitrógeno y es una característica que divide a las cianobacterias en distintos géneros. En cambio las vacuolas de gas (que le aportan la capacidad de flotar) se extienden a lo largo de diferentes géneros (Oliver y Ganf, 2000). Las cianobacterias se clasifican, según su morfología, como unicelulares y filamentosas pudiendo ambas encontrarse en forma de colonia o aisladas. Ellas representan una potencial fuente de metabolitos secundarios, como por ejemplo: antibióticos, supresores tumorales y toxinas. Estas toxinas tienen una variada estructura química: alcaloides, compuestos policetónicos y péptidos no ribosomales. Las ciano-toxinas pueden ser clasificadas de acuerdo a su blanco de acción en tres grupos: hepatotoxinas, dermatotoxinas y neurotoxinas (Falconer y col., 1996). A esta última categoría corresponde la STX.

Hasta el momento no se ha podido dilucidar la ruta de síntesis de la STX. Sin embargo, se han realizado aproximaciones a ésta por síntesis química y por experimentos en los cuales se usaron precursores marcados radioactivamente. Interesantemente, para el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* y la cianobacteria *Aphanizomenon flos-aquae*, se obtuvieron resultados similares. En ambos organismos, STX se sintetiza a partir de tres moléculas de arginina, una molécula de metionina y una molécula de acetato (Shimizu, 1986). Esta evidencia sugiere que pueden compartir rutas metabólicas y también genes responsables de la síntesis de STX y sus análogos.

Cianobacterias productoras de STX

Entre las cianobacterias productoras de STX y sus análogos la única encontrada en Sudamérica corresponde a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Fig.2), aislada en Brasil desde la reserva de Billing (Lagos y col., 1999). *C. raciborskii* es una cianobacteria filamentosa perteneciente al orden Nostocales, fija nitrógeno y se caracteriza por tener vacuolas de gas y por la forma y dimensiones de sus heterocistos terminales, células vegetativas y tricomas. Se encuentra en hábitats de agua dulce temperada y típicamente produce la hepatotoxina cilindrospermopsina. De hecho, la cepa brasileña es la única cepa descrita como productora de STX.

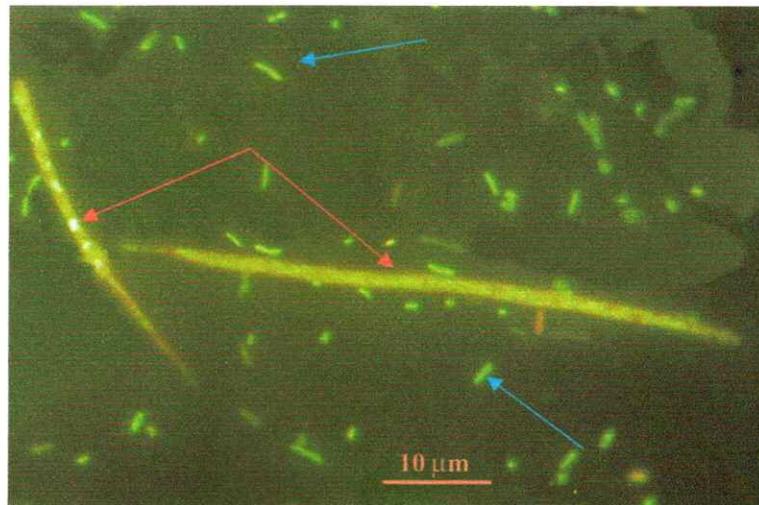


Fig 2. Microscopía de epifluorescencia de un cultivo no axénico de *Cylindrospermopsis raciborskii*. En la fotografía se observan filamentos verdes correspondientes a *C. raciborskii* (flechas naranjas) y bacterias acompañantes de tipo cocobacilo (flechas celestes).

La elevada concentración de nutrientes exógenos ha sido considerado el factor más significativo para promover el desarrollo masivo de cianobacterias. Aproximadamente la mitad de los florecimientos masivos son tóxicos (Sivonen y col., 1990). Debido a su impacto para la salud humana y animal, se ha tratado de precisar los factores que controlan la toxicidad de las cianobacterias. A pesar de que hay muchos estudios sobre la farmacología y química de las toxinas, muy poco se conoce en relación al metabolismo de las toxinas bloqueadoras de los canales de sodio (Sodium Channel Blocking, SCB). Hay escasos estudios sobre aspectos tan importantes como condiciones en las cuales se estimule o reprima la producción de STX y sus análogos en cianobacterias, las proporciones de cada una de ellas a nivel intra y extracelular, así como el papel de las SCB en el microorganismo que las produce. Además, no hay estudios genómicos en cianobacterias productoras de STX. La ausencia de cultivos axénicos representa un gran inconveniente para realizar este tipo de estudios.

Estudio genómico mediante electroforesis por campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Los pocos estudios genómicos mediante electroforesis por campo pulsado (PFGE) que hay en cianobacterias, corresponden a aquellas pertenecientes al género *Synechocystis* (Churin y col., 1995) y *Prochlorococcus* (Strehl y col., 1999) que no producen toxinas. Además, estas cianobacterias no son filamentosas, como lo es *Cylindrospermopsis raciborskii*. Consiguientemente, no existen protocolos apropiados para realizar un PFGE en dicha cianobacteria, especialmente en lo que se refiere a la preparación de la muestra, por lo que es necesario desarrollar y optimizar protocolos.

El PFGE separa moléculas de DNA embebidas en matrices de agarosa sometiéndolas a campos eléctricos que se alternan en dos direcciones (Mathew y col., 1988). Cuando el primer campo eléctrico se aplica al gel, las moléculas se alargan en la dirección del campo y migran en el gel. El primer campo eléctrico se suprime y un segundo campo, formando un ángulo con el primero, se activa. El DNA debe cambiar su conformación y reorientarse antes de que pueda migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación es muy sensible del tamaño de la molécula. Moléculas más grandes toman más tiempo en realinearse después de cambiar el campo que moléculas más pequeños. El tiempo que se mantiene activo cada campo se ha denominado pulso y su duración es una función del tamaño de las moléculas que se desean separar. Este método se considera frecuentemente como el "estándar dorado" de los métodos de tipificación molecular. El PFGE permite separar moléculas de DNA que tienen un tamaño desde 20 Kb hasta 10 Mb. Para la electroforesis en gel por campo pulsado, los aislamientos bacterianos se hacen crecer en algún medio sólido o líquido y luego se combinan con agarosa fundida y se colocan en pequeños moldes. De esta manera se obtienen insertos de agarosa que contienen bacterias completas. Las bacterias embebidas en la agarosa se someten a lisis *in situ* y luego el DNA libre e inmobilizado en la matriz de agarosa se corta con una enzima de restricción que tenga baja frecuencia de corte en el genoma estudiado. Dependiendo de la geometría del electrodo, la homogeneidad y el método de reorientación de los campos eléctricos existen varios sistemas de electroforesis en gel por campo pulsado (Fig.3).

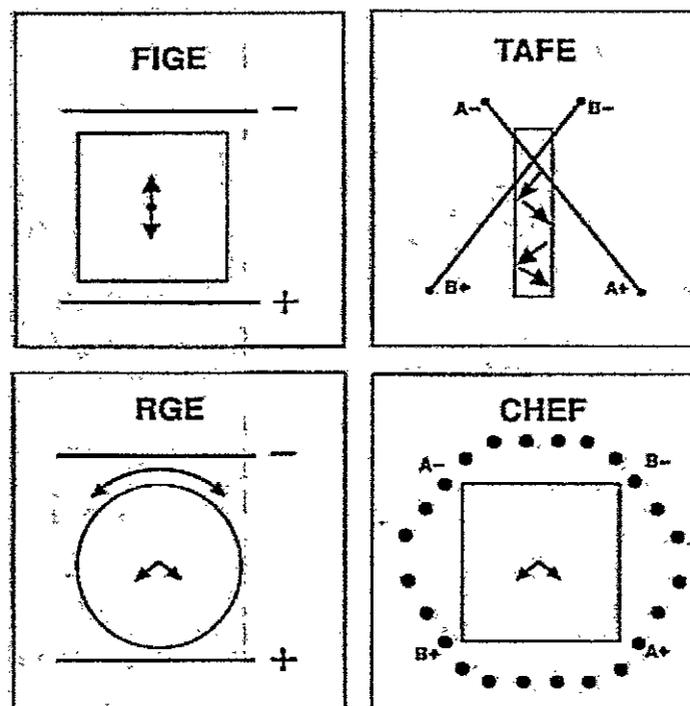


Fig. 3. Diferentes sistemas de electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE).

Los diferentes sistemas descansan sobre el mismo fenómeno de separación, esto es, someter a las moléculas de ADN a por lo menos dos campos eléctricos que se alternan. El tamaño límite máximo que puede ser resuelto por esos sistemas parece ser el mismo.

En este estudio se empleó un sistema de electroforesis en gel por campo pulsado que corresponde al tipo CHEF (Siglas del inglés de Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis), que se caracteriza por obtener líneas rectas empleando para tal fin campos homogéneos. En este sistema, veinticuatro electrodos se disponen en un arreglo hexagonal (Fig. 3). El voltaje de la fuente de poder se divide en esos electrodos

de tal forma que el gradiente de voltaje que se produce es constante a lo largo de todo el gel. El ángulo de reorientación de los campos puede variar entre 60 y 120.

El conocimiento de aspectos básicos de la fisiología y del genoma de *Cylindrospermopsis raciborskii* resultan fundamentales para establecer, por una parte, los factores que influyen en la producción de las toxinas del VPM, y por otra, definir las características génicas de esta especie e iniciar su caracterización genómica con el propósito de identificar los genes responsables de la ruta de biosíntesis de STX.

Por lo tanto, considerando los antecedentes expuestos anteriormente, en donde se indican las ventajas de las cianobacterias respecto de los dinoflagelados, tales como la menor complejidad genómica y que ambos organismos comparten precursores de la síntesis de STX, en este trabajo se plantea que: ***Cylindrospermopsis. raciborskii* D9 es un buen organismo modelo para estudiar aspectos génicos y fisiológicos que contribuyan al entendimiento de la biosíntesis de STX y sus análogos.**

OBJETIVOS

General

Caracterizar genotípica y fisiológicamente a la cianobacteria productora de toxinas paralizantes *Cylindrospermopsis raciborskii* D9.

Específicos

1. Obtener una cepa clonal desde el cultivo mixto de *C. raciborskii* SPC338.
2. Obtener DNA de un cultivo clonal de *C. raciborskii* libre de material génico proveniente de bacterias acompañantes.
3. Determinar las condiciones óptimas para obtener DNA genómico íntegro embebido en moldes de agarosa.
4. Establecer condiciones de electroforesis por campo pulsado necesarias para obtener una buena definición de bandas, tanto de DNA genómico íntegro como de los fragmentos de restricción.
5. Estimar el tamaño genómico aproximado y presencia de elementos extracromosomales en *C. raciborskii* D9.
6. Evaluar el crecimiento de un clon de *C. raciborskii* D9 en diferentes fuentes de nitrógeno (nitrato y urea) y el efecto de la razón entre las concentraciones de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo, sobre el crecimiento y los niveles intra y extracelular de STX de esta bacteria.

7. Dependiendo de los resultados del objetivo anterior, se evaluará el efecto en el crecimiento de *C. raciborskii* D9 en fuentes alternativas de nitrógeno (por ejemplo cloruro de amonio).

MATERIALES Y METODOS

1. Cepa y condiciones de cultivo

C. raciborskii SPC 338 fue aislada en Brasil desde la reserva de Billing (Lagos y col., 1999) y donadas a la Dra. Mónica Vásquez desde dicho lugar por la Dra. María Teresa de Paiva a petición del Dr. Pedro Zagatto, quien fue el primero en describir la presencia de este tipo de especies en Brasil (Lagos y col., 1999).

C. raciborskii SPC 338, el cual no es un cultivo clonal y que corresponde a por lo menos 2 cepas de *C. raciborskii* (Vásquez y col, datos no publicados), fue crecida en 200 ml de medio MLA (MgSO₄·7H₂O 49,4 mg/l; NaNO₃ 170 mg/l; K₂HPO₄ 34,8 mg/l; H₃BO₃ 2,47 mg/l; vitamina B₁₂ 0,05 µg/l; tiamina HCl 0,1 mg/l; biotina 0,05 µg/l; NaEDTA 4,36 mg/l; FeCl₃·6H₂O 1,58 mg/l; CuSO₄·5H₂O 0,01 mg/l; ZnSO₄·7H₂O 22 µg/l; CoCl₂·6H₂O 0,01 mg/l; NaMoO₄·2H₂O 0,006 mg/l; NaHCO₃ 169 mg/l; CaCl₂·2H₂O 29,4 mg/l) descrito por CSIRO Marine Research para cianobacterias. El cultivo se preparó en matraces de vidrio de 1 l bajo ciclos de 12 h: 12 h oscuridad-luz blanca (40 µE 1/m⁻² · s⁻¹) a 28 °C aproximadamente usando como inóculo un décimo de volumen de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento (25 días).

2. Obtención de un cultivo clonal a partir de *C. raciborskii* SPC338.

2.1 Preparación de un cultivo clonal.

En trabajos anteriores se aisló un cultivo clonal desde *C. raciborskii* 338 (cultivo mixto) llamado *C. raciborskii* C10 (Castro y col., 2004), sin embargo este clon se perdió. Por esta razón, a partir del cultivo de *C. raciborskii* SPC 338 se aislaron tricomas

para obtener un nuevo clon. Este procedimiento se realizó bajo el microscopio, tomando al azar células individuales que fueron puestas en placas de 96 pocillos con 200 μ l de MLA fresco. Se verificó bajo microscopio que cada uno de estos pocillos presentara sólo un tricoma, haciendo un seguimiento de varios días. Luego, cuando este tricoma presentó un crecimiento a simple vista (ovillo verde), se trasladó a un tubo de cultivo, que contenía 5 ml de medio MLA fresco. Se incubó hasta que el cultivo estuviese bien desarrollado y finalmente estas células se subcultivaron en matraces de vidrio de 1 l en 200 ml de medio MLA con dilución 1:10, en las mismas condiciones de iluminación descritas para el cultivo SPC 338.

2.2 Extracción y análisis de restricción del gen 16S rRNA (Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA) de una cepa clonal de *C. raciborskii*.

2.2.1 Eliminación de bacterias acompañantes del cultivo de *C. raciborskii*.

Debido a que el cultivo de *C. raciborskii* SPC 338 no es axénico y los cultivos clonales obtenidos en la etapa anterior tampoco lo son (Castro y col., 2004), se realizó un protocolo de lavados para eliminar la mayor cantidad de bacterias acompañantes. *C. raciborskii* puede alcanzar un tamaño de 10-100 μ m de largo, mientras que las bacterias acompañantes tienen un tamaño de 1 μ m aproximadamente. Por esta razón, se tomaron 200 ml de cultivo clonal en fase exponencial de crecimiento (15 días, momento en el cual las células presentan un intenso color verde) y se filtró mediante una membrana de 3 μ m de poro y posteriormente se lavó con 1 l de agua destilada estéril. Luego las células fueron retiradas del filtro y resuspendidas en 1 ml de agua destilada estéril.

2.2.2 Tinción de bacterias con naranja de acridina y recuento mediante microscopía de epifluorescencia.

La dilución de 1 µl de concentrado, obtenido en la etapa de lavado de *C. raciborskii* D9, en 1 ml de agua destilada estéril fue filtrada en una unidad de filtración de vidrio y una membrana de policarbonato teñida con Negro de Sudan, de acuerdo a lo descrito por Hobbie (1977). Los filtros se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon® con un filtro azul en el rango de excitación de 450 a 490 nm y de emisión desde los 500 nm hacia el espectro visible.

2.2.3. Extracción de DNA genómico.

Para la extracción de DNA genómico de *C. raciborskii* se utilizó el protocolo de Kirby Mix descrito para *Streptomyces* sp. (Kieser y col., 2004) con algunas modificaciones. Células ya lavadas, como se describió anteriormente, fueron resuspendidas en 1,5 ml de tampón TE25Suc (25 mM Tris base pH 8, 25 mM EDTA, 0,3 M Sacarosa) y repartidas en dos tubos de 2 ml a los cuales se le agregó solución de lisozima hasta una concentración final de 2 mg/ml. Posteriormente se incubó por 10 min a 37°. Luego se agregó 480 µl de Kirby Mix (2 % SDS, 12 % sodio 4-aminosalicilato, 0,1M Tris-HCl pH 8, 6 % v/v Fenol pH 8,0 equilibrado) y se agitó suavemente por 5 min. Se agregó 480 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) agitando por 15 seg en agitación suave. Luego se centrifugó por 10 min a 5000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo con 360 µl de fenol/ cloroformo/alcohol isoamílico y 72 µl de Acetato de Sodio 3 M. Se agitó suavemente y se centrifugó por 10 min a 5000 rpm. Se

separó la fase acuosa y se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol frío, dejando precipitar por 30 min a -20° . Posteriormente se centrifugó a 13100 rpm por 30 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con 0,6 volúmenes de etanol 70 % centrifugando 5 min a 13000 rpm. Luego se eliminó el sobrenadante, se dejó secar al aire y se rehidrató en 150 μ l de TE 1X. Para eliminar el RNA, se agregó RNasa (concentración final de 40 μ g/ml) y se incubó a 37°C por 2 h. A continuación, se hizo una re-extracción con 150 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó por 10 min a 5000 rpm. A la fase acuosa obtenida se le agregó 100 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó por 10 min a 5000 rpm. A la fase acuosa obtenida se le agregó 0,6 volúmenes de isopropanol dejando precipitar a -20°C toda la noche. Luego, se centrifugó a 13100 rpm por 30 min a 4°C . Al precipitado se le agregó etanol 70 % y se centrifugó nuevamente a 13100 rpm por 30 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 100 μ l de agua MilliQ estéril. Para chequear la calidad del DNA genómico y cuantificarlo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa en las siguientes condiciones: 2 μ l de muestra, 2 μ l de marcador de peso molecular (DNA de Lambda/*Hind*III), agarosa al 1 % en TBE 1X (p/v), 50 V por 3 h y tinción con bromuro de etidio 0,5 μ g/ml por media hora. Luego se estimó la cantidad de ADN extraído, cuantificando con respecto al estándar de concentración conocida ADN de Lambda/*Hind*III.

2.2.4. Amplificación y análisis de restricción del gen 16S rRNA (Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA) de la cepa clonal de *C. raciborskii*.

Se amplificó el 16S rDNA del DNA genómico purificado anteriormente, mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) usando una dilución 1:5 de DNA genómico. Se usaron los partidores 27F (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' y 1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') descritos para bacterias en general (Lane y col., 1985). La reacción de amplificación se realizó usando la enzima *Taq* DNA Polimerasa (Gibco™ BRL, Eggenstein, Germany) y el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de 95°C 6 min., 58°C 6 min. y 72°C 1,5 min.; un segundo ciclo de 95°C 1,5 min., 58°C 3 min. y 72°C 1,5 min; 30 ciclos a 95°C 1,5 min., 58°C 1,5 min. y 72°C 1,5 min.; un ciclo final a 95°C 1,5 min., 58°C 1,5 min y 72°C 5 min. El producto del PCR, fue digerido con la enzima de restricción *Eco*RI en un volumen de reacción de 30 µl, usando por cada µg de DNA 6 unidades de enzima e incubando a 37°C por 2 h. Los productos de digestión fueron observados en electroforesis en gel de agarosa al 2 % en TBE 1X (p/v), 70 V por 90 min y tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30 min.

3 Caracterización genotípica del cultivo clonal de *C. raciborskii*.

3.1. Análisis de la región espaciadora (ITS) entre los genes 16S y 23S rDNA del cultivo clonal *C. raciborskii* D9

Se realizó la amplificación de la región intergénica entre los genes 16S y 23S rRNA mediante PCR de una dilución 1/10 del DNA obtenido del cultivo clonal de *C. raciborskii*. Se utilizaron dos pares de partidores: 322F (5'-TGTACACACCGCCCGTC-3') - 340R (5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3') específicos para cianobacterias (Iteman y col., 2000) y L1 (5'-CAAGGCATCCACGT-3') - G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') (Jensen y col., 1993) como específicos para bacterias heterótrofas. La reacción de amplificación se realizó usando la enzima *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen). Para los partidores 322F y 340R se utilizó el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de 95°C 6 min, 54°C 3 min y 72°C 1,5 min; un segundo ciclo de 95°C 1,5 min, 50°C 3 min y 72°C 1,5 min; 28 ciclos a 95°C 1,5 min, 54°C 1,5 min y 72°C 1,5 min; un ciclo final a 95°C 1,5 min, 54°C 1,5 min y 72°C 5 min. Para los partidores G1-L1 el programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo inicial de 95°C 3 min, 50°C 3 min y 72°C 1,5 min; un segundo ciclo de 95°C 1,5 min, 50°C 3 min y 72°C 1,5 min; 28 ciclos a 95°C 1,5 min, 50°C 1,5 min y 72°C 1,5 min; un ciclo final a 95°C 1,5 min, 50°C 1,5 min y 72°C 5 min. La electroforesis fue realizada en gel de poliacrilamida al 7,5 %, 150 V, 1 h 15 min y tinción con nitrato de plata (Espejo y Escanilla, 1993). En el caso de los partidores G1-L1 las bandas obtenidas en la amplificación fueron secuenciadas. Para esto se cargó 15 µl del producto de PCR en un gel de poliacrilamida al 7,5 % a 150 V por 1 h. Luego se tiñó durante 15 min con

Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml) y se cortaron las bandas observadas bajo transiluminador UV. Las bandas extraídas del gel fueron puestas en tubos de 0,5 ml con 20 µl de agua (filtrada por 0,2 µm y esterilizada en autoclave) e incubadas durante toda la noche a 4°C. Luego, se tomó 1 µl de cada eluido y se amplificó siguiendo el protocolo descrito anteriormente para los partidores G1-L1. El producto de PCR de cada banda fue cargado en un gel de agarosa LMP al 1,6 % en TAE 1X. La electroforesis se realizó durante 5 h a 65 V. Luego, se cortó cada banda y se realizó la extracción del DNA desde la agarosa mediante Wizard® PCR Preps (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se amplificó nuevamente cada banda con partidores G1-L1 utilizando 1 µl de una dilución 1/10 del DNA obtenido. El producto PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5 % a 150 V por 1h y teñido con nitrato de plata para verificar que cada banda se encontrara pura. Finalmente, cada producto obtenido en la etapa de purificación por Wizard fue secuenciado en secuenciador automático Modelo Applied Biosystem 373^a.

3.2. Estimación del tamaño genómico de *C. raciborskii* mediante Electroforesis por campo pulsado (PFGE).

3.2.1. Electroforesis por Campo Pulsado

El PFGE fue realizado utilizando un sistema CHEF II (contour-clamped homogeneous field electrophoresis) BIORAD. Este equipo tiene un ángulo fijo de 120°.

3.2.2 Preparación de estándares de DNA para PFGE

a) *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 fue facilitada por el Dr. Víctor Cifuentes, Director del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Para preparar los moldes de agarosa se siguió el protocolo descrito por Schwartz y Cantor (1984) con algunas modificaciones. El protocolo se describe a continuación: 50 µl de la cepa, almacenada a -70 °C, fueron cultivados en placa con medio YPD (Extracto de Levadura 1 %, Peptona 2 %, Glucosa 2 %) con 1,5 % de agarosa incubada a 30°C por 24 h. Luego, de la placa se tomó una colonia con la que se inocularon 50 ml de medio YPD, incubando a 30°C con agitación durante 24 h, hasta D.O de 0,5. Para colectar las células, los 50 ml fueron centrifugados a 7000 rpm por 10 min y las células recuperadas fueron resuspendidas en 10 ml de EDTA (50 mM pH 8,0). Esta suspensión fue centrifugada a 7000 rpm por 10 min y las células obtenidas fueron resuspendida en EDTA 50 mM pH 8,0 hasta completar 500 µl. Luego a estos 500 µl se le agregaron 2,5 µl de zymoliasa de un stock 2mg/ml y se mezclaron con 1,5 ml de agarosa LMP al 1 % en EDTA 125 mM equilibrada a 42 °C. La mezcla fue rápidamente llevada a moldes, los que se dejaron gelificar a 4°C por 10 min. Una vez listos los moldes, estos fueron sumergidos en 3 ml de LET (EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris 1,5 gr/l, B-mercaptoetanol 75 ml/l) con 0,6 mg/ml de zymoliasa e incubados durante 16 h a 37°C. Luego se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 ml de EDTA 50 mM pH 8,0 agitando suavemente. Este paso se repitió una vez más. Luego se eliminó el EDTA y los moldes fueron incubados a 50°C por 24 h en 3 ml de tampón NDS (EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris 1,5 g/l, N-butilsarcosina 1 %) con 0,5 mg/ml de Proteinasa K (Invitrogen). A

continuación se realizaron una serie de lavados para eliminar los restos de proteína que quedaron en el bloque: se eliminó la solución de NDS y se lavó dos veces con 5 ml de TE 1X (EDTA 1mM, Tris 10 mM), precalentado a 50°C, incubando a 50°C por 30 min cada vez. Luego, se lavó una vez más con 5 ml de TE 1X precalentado a 50 °C, sin incubación. A continuación se incubó dos veces con 5 ml de TE 1X a temperatura ambiente por 30 min cada vez. Luego se agregó 5 ml de TE 1X a temperatura ambiente, sin incubar. Finalmente, los moldes se guardaron en 3 ml de EDTA 50 mM a 4°C hasta el momento de usar.

b) Lambda y Lambda/*Hind*III

En este caso se utilizó DNA de λ (Promega, 515 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se tomaron 1,5 μl de DNA y se mezclaron con 100 μl de agarosa al 2% en TE25Suc. De esta misma manera 38 μl de una dilución 1:10 de DNA de λ /*Hind*III (Gibco 550 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) se mezclaron con 60 μl de agarosa al 2 % en TE25Suc. Ambas preparaciones fueron puestas en moldes y solidificadas durante 10 min a 4°C. Finalmente los moldes se guardaron en 3 ml de EDTA 50 mM a 4°C hasta el momento de usar.

3.2.3 Preparación de moldes de agarosa de *C. raciborskii* D9 para análisis por PFGE.

Se probaron dos protocolos (A y B) para preparar los moldes. En ambos casos, se usaron 200 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento (15 días), los que fueron filtrados y lavados con 1 l de agua MilliQ estéril a través de una membrana de 3 μm .

El Protocolo A fue descrito por Alduina y col. (2002) para *Streptomyces*, al cual se le realizaron modificaciones. Las células fueron retiradas del filtro con 1 l de agua MilliQ estéril y centrifugadas a máxima velocidad durante 10 min. Luego, se eliminó el sobrenadante y el concentrado de células obtenido fue lavado dos veces con Sacarosa 0,3 M mediante centrifugación por 1 min a 5000 rpm. A continuación, las células fueron resuspendidas con hasta 2 ml de TE25Suc por cada 1 g de células. Esta suspensión fue mezclada con agarosa LMP al 1 % en TE25Suc (precalentada a 45°C) en proporción de 0,9 ml de agarosa LMP por cada 0,3 ml de suspensión celular. Rápidamente la mezcla fue llevada a moldes y solidificadas a 4°C por 10 min. Una vez ya gelificados, los moldes fueron puestos en un tubo Falcon de 50 ml (con 10 ml de tampón TE25Suc que contenía 2 mg de lisozima e incubados durante 3 h a 37°C. A continuación los moldes fueron transferidos a un tubo Falcon nuevo e incubados con 10 ml de solución de NDS (1 % n-lauroylsarcosin, 0,5 M EDTA, 10 mM tris base pH 9) con 2 mg/ml de Proteínasa K (Invitrogen), el cual fue precalentado por 1 h a 50°C. Se incubó durante 40 h a 50°C. Luego se inactivó la Proteínasa K con PMSF (Fenil Metil Sulfonilo) en tampón TE25Suc. Para 10 ml de TE25Suc se agregó 10 µl l de PMSF 0,1 M. Finalmente los moldes fueron lavados 3 veces, una hora cada lavado en tampón TE25Suc a 4°C para luego ser mantenidos en TE25Suc a 4°C. Todas las soluciones utilizadas en las incubaciones fueron previamente filtradas por 0,22 µm y esterilizadas por autoclave, a excepción del tampón TE25Suc que sólo fue filtrado.

El Protocolo B, descrito por Berry (2003) también fue descrito para *Streptomyces*. A diferencia del Protocolo A, se agregó 50 ml de EDTA 50 mM en el lavado. Las células, después de los lavados respectivos, fueron retiradas del filtro con 1

ml de agua MilliQ y centrifugadas a 14000 rpm por 20 seg. El precipitado obtenido fue resuspendido en 250 μ l de tampón 2X STE (1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH 8,0, 10 mM Tris pH 8,0) y mezcladas con 0,5 ml de agarosa LMP al 2 % (p/v) en 0,5X TBE (89 mM Tris, 89 mM Acido bórico, 2 mM EDTA). La mezcla fue colocada inmediatamente en moldes y refrigeradas a 4° por 10 minutos. Los moldes obtenidos fueron colocados en tubos Falcon de 50 ml que contenían 5 ml de solución de lisis fresca (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,1 M EDTA, 1 % sarkosil, 1mg de Lisozima por ml) e incubadas por 3 horas a 37 °C. Luego, los moldes fueron deproteinizados en 5 ml de tampón ESP (1 % de sarkosil, 0,5 M EDTA) al que se le agregó 1mg/ml de Proteinasa K (Invitrogen), previamente lavados con 10 ml de tampón ESP, e incubados a 55 °C toda la noche. Luego se reemplazó por tampón fresco ESP con Proteinasa K y se incubó por 1 hora a 55 °C. Para inactivar la Proteinasa K, los moldes fueron incubados en 1 ml por molde de TE25Suc con 5 μ l de PMSF 0,1 M a 4°C por 1 hora y posteriormente lavados 3 veces, 1 hora cada lavado, en TE25Suc a 4°C. Finalmente los moldes fueron almacenados en EDTA 50 mM a 4°C hasta ser usados.

3.2.4. Evaluación de la calidad de los moldes de agarosa

La evaluación de la calidad de los moldes consistió en dos etapas. Primero se verificó si las células se lisaron; esto se hizo observando los moldes de agarosa, los cuales debían estar transparentes si la lisis fue efectiva. Segundo, se comprobó que el DNA había permanecido intacto hasta este momento, para lo cual se realizó una electroforesis convencional en gel de agarosa al 0.6 %, 50 V durante 4 horas y media en TBE 1X. De haber degradación del DNA, al teñir con Bromuro de Etidio se debería

observar en el carril una intensa fluorescencia, si por el contrario no se detecta gran fluorescencia en el carril pero si en el pocillo, esto sugiere que el DNA esta íntegro.

3.2.5 Digestión del DNA cromosomal de *C. raciborskii* D9 embebido en moldes de agarosa.

Para generar los macrofragmentos de restricción se probaron enzimas con diferentes sitios de reconocimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Enzimas y concentraciones utilizadas en la digestión del DNA cromosomal de *C. raciborskii*.

Enzima	Secuencia de reconocimiento	Unidades de enzima/molde de agarosa
<i>Not</i> I	GC↓GGCC	30 U
<i>Mlu</i> I	A↓CGCGT	15 U
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G	20 U
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC	20 U
<i>Bsu</i> RI	GG↓CC	50 U

Previo a las digestiones para eliminar restos de pigmentos, proteinasa K y PMSF los moldes fueron lavados 3 veces en tampón TE 1X a temperatura ambiente, cada lavado con duración de 1 h. Posteriormente los moldes fueron equilibrados en tubos Eppendorf de 1,5 ml durante 1 hora en 500 µl de tampón de la enzima correspondiente (según recomienda el fabricante) a temperatura ambiente y luego incubados por 16 horas

a 37°C en tampón fresco con las unidades de enzima previamente señaladas (Tabla 1), en un volumen final de 250 µl.

3.2.6. Condiciones de corrida para PFGE de DNA cromosomal sin digerir

Se ensayaron dos condiciones diferentes de corrida electroforética para obtener la mejor separación de los estándares y del DNA cromosomal de *C. raciborskii* D9 (Tabla 2). Para evitar la posible degradación del DNA producto de la corrida, se suplementó el tampón de corrida con tiourea 50 µM (Sigma) (Corkill y col., 2000).

Tabla 2. Condiciones de corrida para PFGE de DNA cromosomal sin digerir.

	Tiempo	Buffer	Agarosa	T°	Voltage	Pulso
Protocolo S1	48 h	TBE 0.5X	0.9 %	14°C	160 V	90 -90 seg
Protocolo S2	16 h	TBE 0.5X	0.9 %	14°C	200 V	50 -90 seg

El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en tampón TBE 0.5X por 30 min.

3.2.7. Extracción desde agarosa del DNA cromosomal luego del PFGE y posterior amplificación por PCR.

Luego de realizar el PFGE del DNA cromosomal de *C. raciborskii* D9, se cortó el segmento del gel en el cual se observó el DNA con mayor integridad. También se cortó un segmento correspondiente a la parte central del carril de corrida, donde no se aprecian bandas pero si una sombra que indica posible degradación del DNA. El DNA se extrajo centrifugando los fragmentos sobre lana de vidrio estéril durante 30 seg a 10000-g. El DNA eluido fue amplificado directamente sin purificación adicional, con los partidores

322F-340R y G1-L1 (ambos partidores para los dos sitios seleccionados del gel) según lo descrito previamente.

3.2.8. Condiciones de corrida para PFGE de DNA digerido.

Se ensayaron 2 diferentes condiciones de corrida electroforética (Protocolo D1 y protocolo D2) para lograr la mejor separación de los fragmentos obtenidos durante la digestión con enzimas de restricción. Se suplementó el tampón de corrida con 50 μ M de TioUrea (Sigma)

Se ensayaron las condiciones descritas en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de corrida para PFGE de DNA cromosomal digerido.

	Tiempo	Buffer	Agarosa	T°	Voltage	Pulso
Protocolo D1	20 h	TBE 0.5X	1.0 %	14°C	160 V	50 -90 seg
Protocolo D2	16 h	TBE 0.5X	1.2 %	14°C	200 V	50 -90 seg

Luego, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) en tampón TBE 0.5X por 30 min.

4. Caracterización fisiológica de *C. raciborskii* D9

4.1. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y la razón de nitrógeno y fósforo en el crecimiento y niveles intra y extracelular de STX en *C. raciborskii*.

Los rangos de concentraciones de nitrógeno y fósforo empleados (Tabla 4) fueron seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos por Vézic y col. (2002). Se utilizó como medio de cultivo base MLA, preparado sin fuente de nitrógeno (NaNO_3) y fósforo (K_2HPO_4). Luego, se combinó nitrógeno aportado como NaNO_3 (Nitrato de

Sodio) ó H_2NCONH_2 (urea) y fósforo (K_2HPO_4) en diferentes razones según lo que se describe en Tabla 4.

Tabla 4. Razones de nitrógeno y fósforo utilizados en el medio de cultivo de *C. raciborskii*.

Medio	N (mg/l)	P (mg/l)	N:P
Alto N-alto P	84	6	1:0,07
Alto N-bajoP	84	0,06	1:0,0007
Bajo N-alto P	0,84	6	1:7
Bajo N-bajo P	0,84	0,06	1:0,07

N = nitrógeno, P = fósforo, N:P = razón nitrógeno fósforo.

4.1.1 Evaluación del crecimiento mediante cuantificación espectroscópica de clorofila *a*.

Para evaluar el crecimiento, se cuantificó espectrofotométricamente la Clorofila *a* a 665 nm. La determinación se realizó cada 3 días, durante 27 días. Luego, se realizó una última toma de datos el día 45. Para cuantificar la clorofila *a* se utilizó el protocolo descrito por Yentsch y Menzel (1963) con algunas modificaciones. Para cada medio, se tomó 1 ml de cultivo (agitando el matraz antes de tomar cada muestra, para lograr homogeneidad) el cual fue centrifugado en tubo eppendorf de 2 ml a 14000 rpm por 15 min. Se reemplazó 900 μl de sobrenadante por 900 μl de acetona 100 % logrando una concentración final de acetona al 90 % v/v. Los tubos fueron incubados toda la noche a 4°. Luego fueron centrifugados a 14000 rpm por 15 min. Luego, el sobrenadante fue medido (en un máximo de hasta 4 días después) en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1601 UV-visible, haciendo un barrido desde 600 a 800 nm. Todos los experimentos

para cuantificar clorofila *a* fueron realizados en triplicado desde el mismo matraz, para verificar la técnica.

4.1.2. Obtención y tratamiento de las muestras de cultivo de *C. raciborskii* para el análisis de toxinas por HPLC.

La toma de muestra se realizó cada 3 días, centrifugando 5 ml de *C. raciborskii* a 13100·g durante 15 min. De esta manera se obtuvo la fracción celular y el sobrenadante por separado. Las fracciones celulares obtenidas fueron liofilizadas en Speed-Vac (SC210A, SA-VANT). Cuando fue visible una fase de color blancuzco, debido a un alto contenido de proteínas, se repitió el procedimiento de separar la fase acuosa y luego se prosiguió con la liofilización hasta sequedad total y luego las muestras se secaron en estufa a 60°C hasta obtener peso constante. Finalmente, los precipitados fueron pesados en balanza analítica. Para la extracción de toxinas de la fracción celular y sobrenadante de *C. raciborskii* D9 se siguió el protocolo descrito por Lagos y col. (1999) con las modificaciones que se describen a continuación. A cada precipitado de cultivo, liofilizado y obtenido como se describió anteriormente, se le agregó 500 µl de ácido acético 0,05 M (pH 5) homogenizando el precipitado. Se sonicó durante 15 min agitando periódicamente. Luego, fueron agregados 2 volúmenes de metanol/cloroformo (1:1, v/v) y se sonicó entre 5 a 10 min agitando periódicamente, para luego centrifugar a 12500·g durante 10 min y extraer la fase acuosa (que contiene las toxinas). A la fase orgánica se le volvió a agregar 250 µl de ácido acético 0,05 M para una re-extracción. Finalmente, se juntaron ambas fases acuosas y se liofilizaron en Speed-Vack. Cuando fue visible una

fase de color blanquizco, por un alto contenido de proteínas, se repitió la extracción con metanol: cloroformo y luego se prosiguió con la liofilización hasta sequedad total. El liofilizado final se resuspendió en 250 µl de ácido acético 50 mM.

Los sobrenadantes se filtraron mediante 0,22 µm. A cada muestra se le agregó 100 µl de HCl 0,25 N para mantener la estabilidad de la toxina, y se liofilizaron en SpeedVac. Para la extracción ácida, el liofilizado obtenido de cada muestra fue resuspendido en 250 µl de ácido acético 0,05 M, agitado por vortex y sonicados en forma alternada durante 30 min. Después de centrifugar durante 5 min a 11.000 rpm se recuperó la fase acuosa, ésta se traspasó a un nuevo tubo y se guardó a 4°C hasta el momento de uso. Las muestras fueron tomadas en triplicado desde el mismo matraz de cada medio de cultivo analizado.

4.1.3. HPLC-FLD y derivatización postcolumna para la detección de toxinas en las muestras de cultivo de *C. raciborskii* D9.

Se siguió el protocolo descrito por Oshima (1995), con las modificaciones descritas por Lagos (1998). Todos los reactivos químicos y solventes utilizados fueron de grado HPLC o analítico. La adquisición y procesamiento de datos se llevó a cabo con el software CLASS-CR10 o con un integrador Hitachi D-2500. La fase móvil consistió en ácido 1-heptanosulfónico 2 mM en tampón fosfato de amonio 30 mM (pH 7,1) más acetonitrilo 3 % volumen para las toxinas del grupo STX. Las condiciones de cromatografía utilizadas fueron:

-Tampón para STX = 7 ml/ min

5µ

-Columna C8 = 15 cm largo, 4,6 mm diámetro.

-Estándares utilizados = STX.

-Tiempo de elución de estándar de STX = 16 min.

-Volumen de muestra inyectado = 20 μ l.

Las concentraciones de STX en las muestras fueron calculadas por comparación del área del pico correspondiente a STX, en el extracto de la muestra proveniente del cultivo de cianobacteria con respecto al de la solución estándar. Las muestras fueron tomadas en triplicado, desde el mismo matraz de cada medio de cultivo analizado.

4.2. Efecto de diferentes concentraciones de NH_4Cl y de urea como fuente de nitrógeno en el crecimiento de *C. raciborskii* D9.

La fuente primaria de nitrógeno (NaNO_3) en medio MLA fue reemplazada por distintas concentraciones de NH_4Cl (Tabla 5). Estos medio fueron inoculados con diluciones 1/10 de *C. raciborskii* D9.

Tabla 5. Concentraciones de NH_4Cl utilizadas como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de *C. raciborskii* D9.

NH_4Cl [mM]
3
6
12
20
100

Luego, se analizó el efecto de diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo. Para esto, se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl , de acuerdo a lo

descrito en la Tabla 6, a medio base MLA. Se inocularon diluciones 1/10 de *C. raciborskii* D9.

Tabla 6. Concentración de NaCl adicionadas al medio de cultivo de *C. raciborskii* D9.

NaCl (gr/l)	Cl (gr/l)
1	0,6
2	1,2
3	1,8
4	2,4
5	3
7	3,6

Luego, se creció a *C. raciborskii* D9 en diferentes concentraciones de urea, reemplazando la fuente de nitrógeno (NaNO_3) del medio MLA por diferentes concentraciones de urea las que se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones de urea utilizadas como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de *C. raciborskii* D9.

Urea [mM]
1,5
3
6
10
50

El seguimiento del crecimiento de *C. raciborskii* para NH_4Cl , NaCl y urea se realizó mediante cuantificación espectroscópica de clorofila *a* como se describió anteriormente.

Los análisis estadísticos para los ensayos de cuantificación de clorofila *a* y toxina, fueron desarrollados usando la prueba de Kruskal-Wallis (análisis no paramétrico) con el programa Systat 11 (Systat Software, Inc. 2004). Esta prueba es una generalización de la prueba de U de Man-Whitney para *k* grupos independientes, no exigiendo el supuesto de normalidad ni el de homogeneidad de varianzas (Doménech y Riba, 1987).

4.2.1. Detección de la producción de ureasa en cianobacterias y microbiota acompañante.

Se filtró 10 ml de cultivo clonal de *C. raciborskii* mediante filtro con un tamaño de poro de 3 μm . El filtrado obtenido contenía a las bacterias acompañantes. Luego, se procedió a lavar las células de *C. raciborskii* adheridas al filtro con 500 ml de agua destilada estéril para eliminar las bacterias acompañantes de las cianobacterias. Se realizaron diversos tratamientos a las muestras como se describe en la Tabla 8.

Tabla 8. Ensayo de agar ureasa en muestras de *C. raciborskii* D9 con y sin microbiota acompañante.

Tubo	Inóculo
1	<i>C. raciborskii</i> D9 sin filtrar
2	<i>C. raciborskii</i> D9 filtradas
3	<i>C. raciborskii</i> D9 filtradas y sonicadas
4	Células acompañantes
5	Control positivo (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)
6	Control negativo

Se inocularon 20 µl de cada preparado en tubos que contenían medio Christensen-Urea-agar (Christensen, 1946). Se incubó durante 5 días con los ciclos de luz y temperatura descritos anteriormente para los cultivos de cianobacterias. *V. parahaemolyticus* fue preparado según lo descrito por León (2005). Luego, la visualización de la producción de ureasa se observó gracias a la presencia de un indicador de pH, el rojo fenol, cuyo color cambia por cambio de pH a través de la aparición de un color rojo (del indicador rojo fenol) (pH 6,8-8,4), púrpura (pH<8,4). El no viraje de color y por lo tanto la permanencia de color amarillo del medio indicó ausencia de ureasa.

4.2.2. Análisis de la producción de Ureasa en bacterias acompañantes.

Se obtuvo un filtrado de la microbiota asociada a *C. raciborskii* como se describió en el punto anterior. Luego, 100 µl sin diluir, diluciones 1:50 y 1:100 de este filtrado se distribuyeron homogéneamente en placas de Petri separadas, con medio Christensen-Urea-agar (Christensen, 1946). Se incubó durante 5 días con los ciclos de luz y temperatura descritos anteriormente para los cultivos de cianobacterias. Luego, la

visualización de la producción de ureasa se observó como se indicó previamente. Las colonias de color rosado que crecieron en la placa, fueron reaisladas en medio Christensen-Urea-agar e incubadas en las mismas condiciones descritas anteriormente.

RESULTADOS

1. Obtención de un cultivo clonal a partir de *C. raciborskii* SPC338.

1.1. Aislamiento, clonalidad y evaluación de la axenidad del aislado.

Siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos, se obtuvo un cultivo proveniente de una sola célula nombrado como *C. raciborskii* D9. Previo a cualquier análisis molecular, se realizó el protocolo de lavados para obtener un concentrado de *C. raciborskii* D9 con una reducida carga de bacterias acompañantes (Fig. 4).

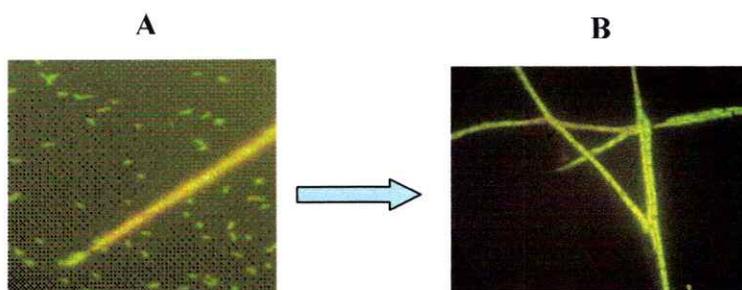


Fig. 4. Microscopía de epifluorescencia de cultivo de *C. raciborskii* D9 antes y después de protocolo de lavados. A) *C. raciborskii* D9 sin lavar y B) *C. raciborskii* D9 lavadas.

La determinación del número de bacterias contaminantes en este concentrado, se realizó mediante microscopía de epifluorescencia. El protocolo de lavado aplicado logró eliminar la mayoría de las bacterias acompañantes (de tipo bacilo y cocobacilo) dejando, aproximadamente 1000 bacterias contaminantes por ml de concentrado de células de *C. raciborskii* D9 (0,1 g de cianobacterias aproximadamente). En un cultivo de *C. raciborskii* D9 de 15 días de crecimiento (no filtrado), la cantidad de bacterias

acompañantes puede superar las 3×10^8 cél/ml. Por lo tanto, el protocolo de lavado del cultivo disminuyó el número de contaminantes 6 a 7 órdenes de magnitud.

1.2. Extracción de DNA genómico de *C. raciborskii* D9 y verificación de clonalidad del cultivo mediante ARDRA.

Este protocolo (materiales y métodos) dió un buen resultado ya que se logró eliminar las nucleasas y pigmentos, obteniéndose un DNA genómico íntegro, con una concentración aproximada de 100 ng/ μ l (Fig. 5).

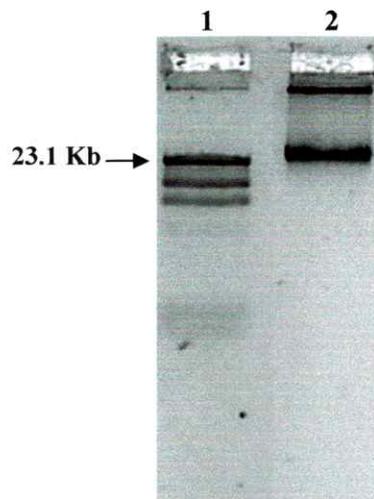


Fig.5. Extracción de DNA genómico de *C. raciborskii* D9 mediante Kirby Mix. Carriles: 1, marcador de peso molecular DNA de λ /*Hind*III; 2, DNA de *C. raciborskii* D9. La electroforesis fue realizada en gel de agarosa al 1 % en TBE 1X (p/v), 50 V por 3 h y tinción con bromuro de etidio 0,5 μ g/ml.

El análisis mediante ARDRA, es una herramienta útil para diferenciar entre cepas. En trabajos anteriores (Vásquez y col, datos no publicados) el patrón obtenido por ARDRA y digestión con *Eco* RI para la cepa clonal *C. raciborskii* C10, proveniente de *C. raciborskii* SPC338, estaba formado por dos bandas: una de 600 b y la otra de 700 b aproximadamente; mediante secuenciación se comprobó que estos fragmentos

correspondían a secuencias de cianobacteria. El análisis mediante ARDRA nos permite por lo tanto, demostrar la procedencia del DNA genómico extraído desde un cultivo no axénico y además si este DNA corresponde a una cepa clonal de *C. raciborskii*. El análisis ARDRA (Fig. 6), evidenció que el cultivo de *C. raciborskii* D9 era un cultivo clonal y que el DNA obtenido era perteneciente a *C. raciborskii* D9 y no a las bacterias acompañantes, ya que el patrón de digestión obtenido corresponde al mismo encontrado para la cepa clonal *C. raciborskii* C10. Además, se comprobó la buena calidad del DNA obtenido en la extracción mediante Kirby Mix.

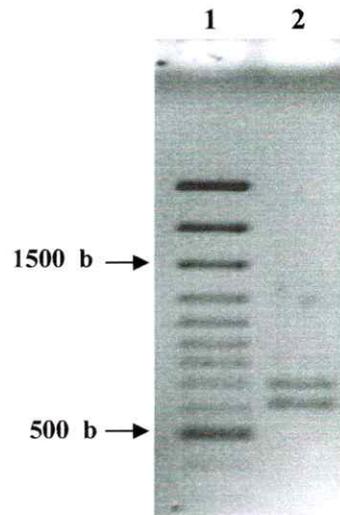


Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa del ARDRA de *C. raciborskii* D9 con la enzima *EcoRI*. Carriles: 1, Marcador 100 b Boerhinger™; 2, DNA de *C. raciborskii* D9. La electroforesis fue realizada en gel de agarosa al 2 % en TBE 1X (p/v), 70 V por 90 min y tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30 min.

2. Caracterización genotípica de *C. raciborskii* D9

2.1 Análisis de la región espaciadora (ITS) entre los genes 16S y 23S rDNA del cultivo clonal de *C. raciborskii*.

La amplificación con los partidores 322F-340R, la cual es específica para cianobacterias, dió dos productos de amplificación, uno aproximadamente de 600 b y otro de 400 b (Fig. 7A). Estos amplificados tienen un tamaño idéntico a los observados anteriormente para *C. raciborskii* C10 (Vásquez, datos no publicados). La amplificación con los partidores G1-L1 dio como resultado 5 amplificones entre 600 y 800 b (Fig. 7B).

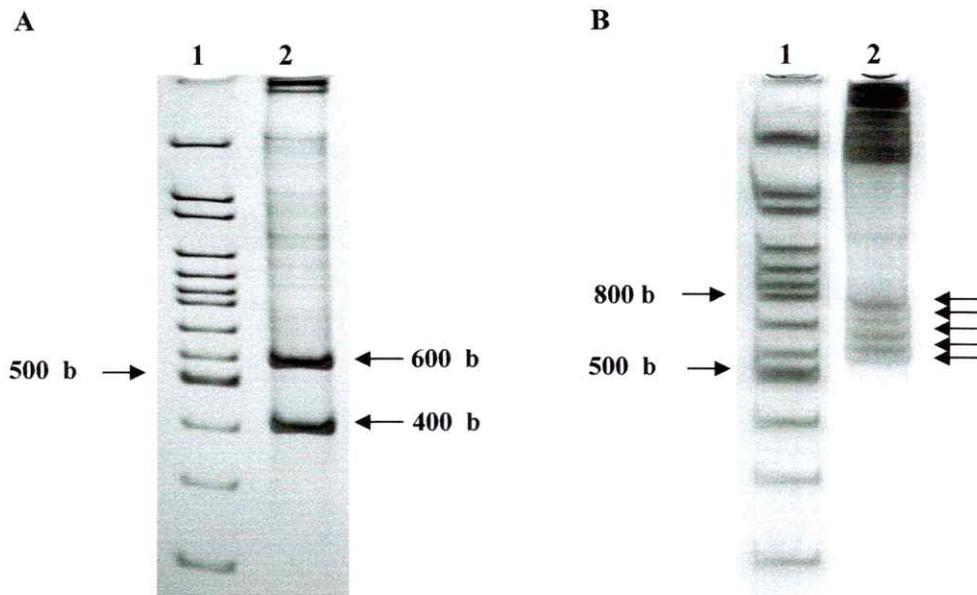


Fig 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de amplificación por PCR correspondientes a los ITS de *C. raciborskii* D9. (A) Amplificación con partidores 322R-340F específicos para cianobacterias. (B) Amplificación con partidores G1-L1 para bacterias heterótrofas. Carriles: 1, marcador 100 bp plus Fermentas™; 2, DNA cromosomal de *C. raciborskii* D9. La electroforesis fue realizada en gel de poliacrilamida al 7,5 %, 150 V, 1 h 15 min y tinción con nitrato de plata

Las bandas amplificadas mediante los partidores G1-L1 fueron extraídas del gel de poliacrilamida para posteriormente secuenciarlas. Sin embargo, sólo fue posible separar 4 de las 5 bandas. La secuencia de cada una de ellas fue alineada con la base de datos de PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) para ver si correspondían a secuencias de cianobacterias. No obstante, ninguna de las secuencias fue relacionada al género *Cyanobacteria*, sino que al género *Vibrio*.

2.2. Análisis mediante PFGE de *C. raciborskii* D9

2.2.1. Evaluación de la integridad del DNA en los moldes de agarosa usando dos protocolos de preparación y lisis.

Se utilizaron los protocolos descritos en materiales y métodos y nombrados como A y B. En ambos protocolos, al finalizar la etapa de lisis, los moldes de agarosa se encontraban transparentes, sugiriendo que las células embebidas en los bloques fueron exitosamente lisadas. Los bloques obtenidos en ambos protocolos, al ser teñidos con bromuro de etidio, presentaron un brillo intenso similar en ambos casos. Sin embargo, al momento de realizar la electroforesis para chequear la integridad del DNA, el bloque preparado con el protocolo A presentó un DNA muy degradado (Fig. 8 A). Por el contrario, el molde preparando con el protocolo B presentó un DNA íntegro (Fig. 8 B). En relación a los protocolos de corrida electroforética para DNA sin digerir, ambos protocolos (S1 y S2) resultaron ser eficientes, ya que el estándar (*Saccharomyces cerevisiae*) se separó claramente en ambos casos (Fig. 8 A y B).

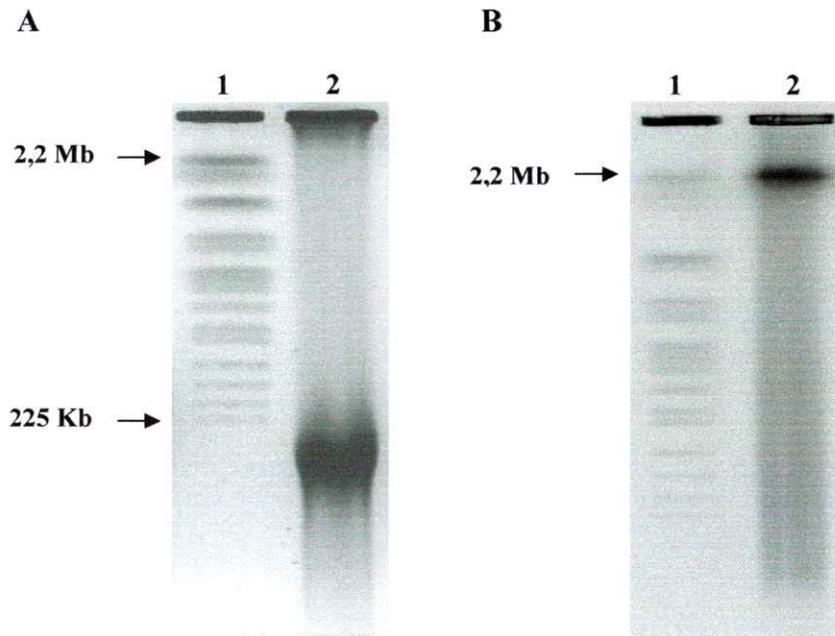


Fig.8. Electroforesis por campo pulsado de DNA genómico de *C. raciborskii* D9 preparado con diferentes protocolos. A) Protocolo de moldes A. Condiciones de corrida electroforética: agarosa al 0,9 %, TBE 0,5X, 200 V, pulsos de 90-90 seg, 48 h a 14°C. B) Protocolo de moldes B. Condiciones de corrida electroforética: agarosa 0,9 %, TBE 0,5X, 200 V, pulsos de 50-90 seg, 16 h a 14°C. En ambos casos se usó tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en tampón TBE 0.5X. Carriles: 1, DNA genómico de *Sacharomyces cerevisiae*; 2, DNA cromosomal de *C. raciborskii* D9.

Como se observa en la figura 8B, el DNA de *C. raciborskii* D9 comigra con el cromosoma de mayor tamaño de *S. cerevisiae*, lo que hace suponer que tiene un tamaño aproximado de 2,2 Mb y no se observan plasmidios en el rango de tamaño analizado (2,2 Mb – 6,6 Kb). Aunque el protocolo B fue mejor que el protocolo A, se observa una mancha a lo largo del carril, lo que probablemente corresponde a DNA degradado.

2.2.2.1. Identificación de la procedencia del DNA observado en el PFGE.

Para continuar, fue necesario verificar que el DNA que se observaba en el PFGE correspondía a *C. raciborskii* y no a las bacterias acompañantes. La amplificación de los

ITS entre los genes 16S y 23S rDNA del DNA extraído de la banda correspondiente al DNA cromosomal de *C. raciborskii* D9, amplificó sólo con los partidores específicos para cianobacterias 322F-340R (Fig. 9A) y no con los partidores G1-L1 (Fig. 9B) específicos para bacterias heterótrofas. El DNA extraído desde el centro del carril también amplificó con los partidores 322F-340R lo que indica una degradación del DNA de *C. raciborskii* D9. Sin embargo, DNA de bacterias acompañantes no fue detectado.

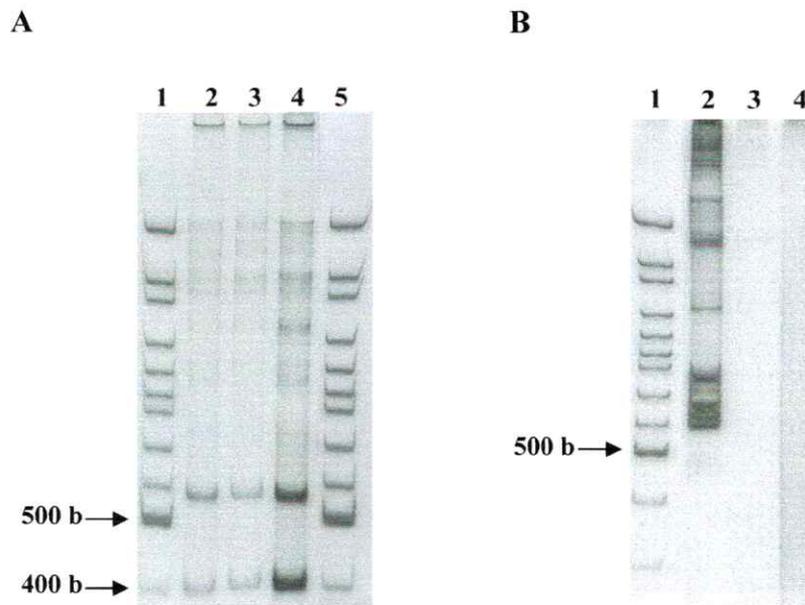


Fig 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos ITS amplificados por PCR, desde bandas extraídas del gel de PFGE de *C. raciborskii* D9. (A) Amplificación con partidores 322R-340F específicos para cianobacteria. Carriles: 1 y 5, marcador 100 bp plus FermentasTM; 2, DNA extraído desde la banda correspondiente al cromosoma de *C. raciborskii* D9; 3, DNA extraído desde el centro del carril; 4, DNA de *C. raciborskii* D9 extraído desde cultivo. (B) Amplificación con partidores G1-L1 para bacterias en general. Carriles: 1, marcador 100 bp plus FermentasTM; 2, DNA de *C. raciborskii* D9 extraído desde cultivo; 3, DNA extraído desde la banda correspondiente al cromosoma de *C. raciborskii* D9; 4, DNA extraído desde el centro del carril. Condiciones de corrida electroforética: gel de poliacrilamida al 7,5 % a 150 V por 1 h y tinción con nitrato de plata.

Luego de comprobar que el DNA visualizado por PFGE era exclusivamente de *C. raciborskii* D9, se prosiguió a obtener un cálculo más exacto del tamaño genómico de *C. raciborskii* D9. Se realizó la digestión del genoma con endonucleasas de restricción, donde se requería cortar el DNA en fragmentos discretos. Se probaron dos protocolos de corrida para DNA digerido. El protocolo 2 para corrida electroforética de DNA digerido, fue el más satisfactorio, ya que logró bandas más definidas (en el caso de la enzima *MluI*) que el protocolo 1 (datos no mostrados), posiblemente debido a que la agarosa del gel se utilizó más concentrada.

La primera enzima ensayada fue *NotI*, sin embargo esta enzima no produjo cortes en el genoma (Fig. 10A), incluso al utilizar un exceso de enzima (el doble de lo recomendado por el fabricante). Como se observa en la figura 10B, se utilizaron diferentes enzimas (todas con sitios de reconocimientos ricos en G-C) y ninguna produjo cortes en el genoma de *C. raciborskii* D9.

Al contrario de lo ocurrido con las enzimas anteriores, se obtuvo una buena digestión con la enzima *MluI*, generando alrededor de a 16 fragmentos entre 9,4 y 228 Kb (Fig. 10C).

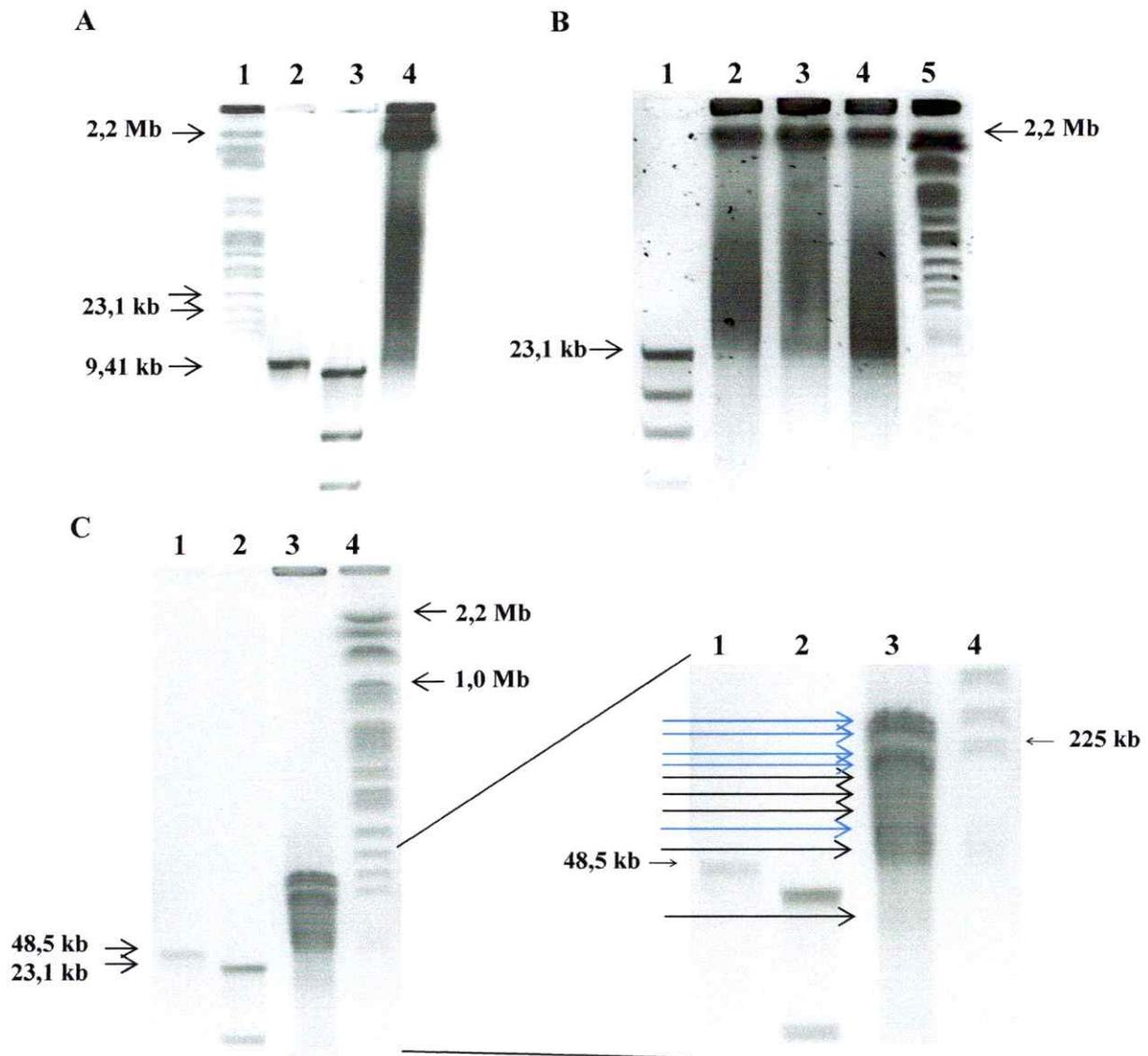


Fig 10. Electroforesis por campo pulsado de DNA cromosomal de *C. raciborskii* D9 tratado con diferentes enzimas de restricción. (A) Tratamiento con enzima *NotI*. Carriles: 1, DNA cromosomal de *Saccharomyces cerevisiae*; 2, DNA de lambda; 3, DNA de lambda/*HindIII*; 4, DNA de *C. raciborskii* D9 (B) Tratamiento con enzimas *BsuRI*, *PstI* y *BamHI*. Carriles: 1, DNA de lambda/*HindIII*; 2, DNA de *C. raciborskii* D9 tratado con *BsuRI*; 3, DNA de *C. raciborskii* D9 tratado con *PstI*; 4, DNA de *C. raciborskii* D9 tratado con *BamHI*. (C) Digestión con enzima *MluI*. Carriles: 1, DNA de lambda; 2, DNA de lambda/*HindIII*; 3, DNA de *C. raciborskii* D9; 4, DNA cromosomal de *Saccharomyces cerevisiae*. Las flechas azules indican bandas consideradas como dobles y flechas negras indican bandas consideradas como únicas. Condiciones de corridas electroforéticas: agarosa 1,2 %, TBE 0,5X, 200 V, pulsos de 50-90 seg, 16 h a 14°C, tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en tampón TBE 0,5X.

A partir de los estándares utilizados (*S. cerevisiae* y fago λ cortado con *Hind*III) se calcularon los tamaños de las bandas obtenidas para *C. raciborskii* D9. Los fragmentos más grandes fueron calculados con la ecuación obtenida para *S. cerevisiae* ($Y = -1167,2 \text{ LN}(X) + 2642,8$; $R^2=0,995$) y los más pequeños con la ecuación de fago λ /*Hind*III ($Y = -47,089 \text{ LN}(X) + 98,437$; $R^2=0,945$). En ambas ecuaciones se reemplazó X por los valores de migración (cm) de las bandas obtenidas en el PFGE. El tamaño genómico aproximado de *C. raciborskii* D9 fue de 1,7 Mb (Tabla 9).

Tabla 9. Tamaño de los fragmentos de restricción generados con la enzima *Mlu*I en el genoma de *C. raciborskii* D9.

Nº fragmento	Tamaño (kb)
1	261
2	261
3	175
4	175
5	159
6	159
7	70
8	70
9	65
10	62
11	57
12	55
13	55
14	50
15	19
TOTAL	1693

3. Caracterización fisiológica de *C. raciborskii*

3.1. Efecto del tipo de fuente de nitrógeno y de la razón de nitrógeno y fósforo en el crecimiento y niveles intra y extracelular de STX producidos por *C. raciborskii* D9.

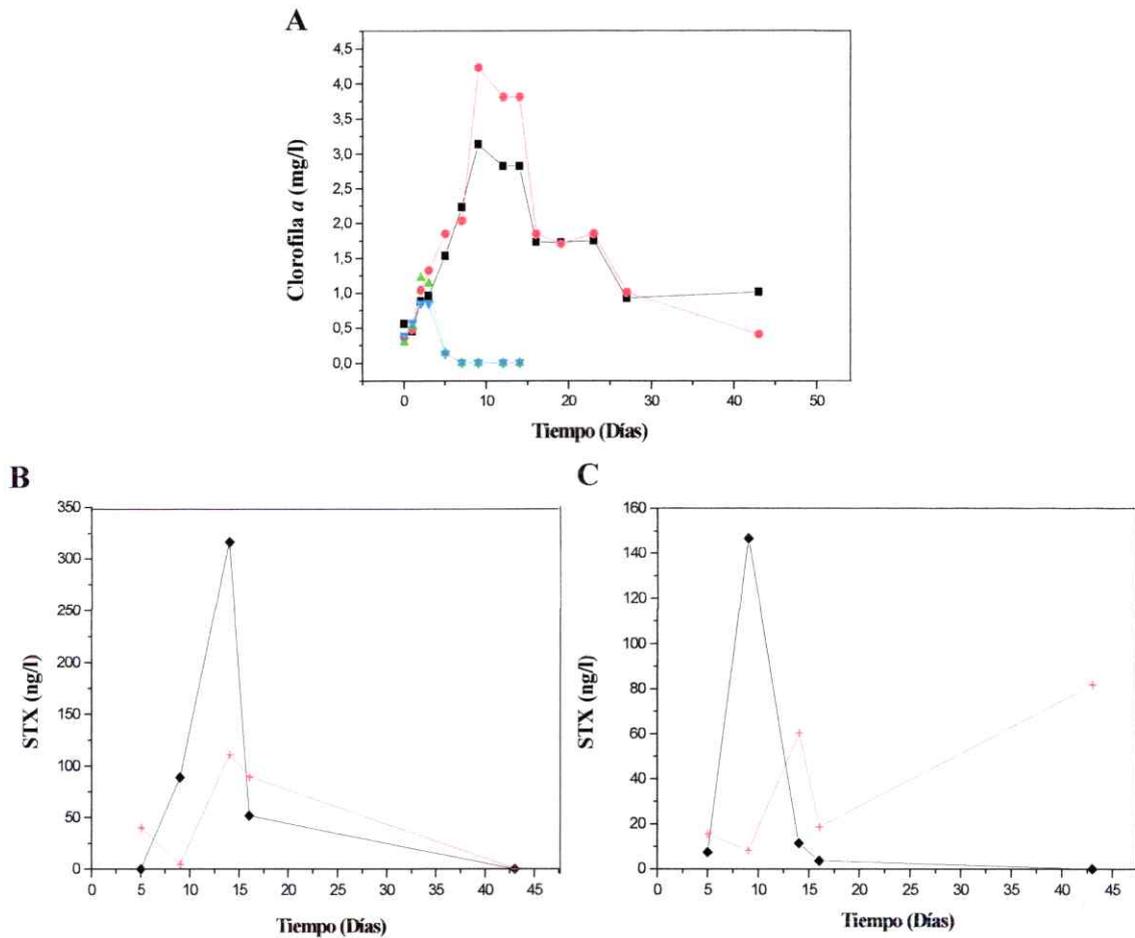


Fig. 11. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y razones de nitrógeno: fósforo en el crecimiento y producción de STX de *C. raciborskii* D9. (A) Curva de crecimiento de *C. raciborskii* D9 en diferentes medios de cultivo. (B) Determinación de STX intracelular y extracelular en medio con razón N:P 84:6 mg/l (1:0,07). (C) Detección de STX intracelular y extracelular en medio con razón N:P 84:0,06 mg/l (1:0,0007). ♦ NaNO₃ 84 mg N: 0,06 mg P (1:0,0007); ■ NaNO₃ 84 mg N: 6 mg P (1:0,07); ▲ urea 84 mg N: 6 mg P (1:0,07); ▼ urea 84 mg N: 0,06 mg P (1:0,0007); + STX extracelular, * STX intracelular.

C. raciborskii D9 puede crecer en medio con NaNO_3 como fuente de nitrógeno. Sin embargo, la condición de bajo nitrógeno ensayada (0,84 mg/l) no permitió el crecimiento de *C. raciborskii* D9 (datos no mostrados). En el caso de los medios con urea como fuente de nitrógeno, sólo creció hasta el día 3 y luego presentó una rápida clorosis y posterior lisis celular (Fig.10A). Por esta razón, los niveles de STX sólo fueron medidos en medio con NaNO_3 como fuente de nitrógeno y en las razones N:P de 84:6 mg/l (1:0,07) y 84:0,06 mg/l (1:0,0007).

Las curvas de crecimiento de *C. raciborskii* D9 en las razones N:P 1:0,07 y 1:0,0007 presentaron una tendencia similar en las tres etapas distinguibles de crecimiento, es decir, los días 0 y 9 (fase de crecimiento exponencial), los días 10-15 (fase estacionaria) y después del día 16 en donde comienza la fase de muerte. Sin embargo, se observa un mayor crecimiento (33%) entre los días de crecimiento 9 y 14 en medio con alto fósforo (N:P de 1:0,07) que en medio con bajo fósforo (N:P de 1:0,0007) según lo indicado por la prueba Kruskal-Wallis, $p = 0,049$ y $gl = 1$. A pesar de que hubo mayor crecimiento en medio con alto fósforo, la detección de STX tendió a ser mayor (el doble) en medio con bajo fósforo (N:P de 1:0,0007) que en medio con alto fósforo (N:P de 1:0,07). La mayor detección de STX, en ambos medios experimentados (alto y bajo fósforo, N:P de 1:0,07 y de 1:0,0007 respectivamente), se produce cuando el crecimiento del cultivo es máximo (Fig. 11), es decir entre los días 9 y 14 (fin del crecimiento exponencial y mitad de la fase estacionaria). Como se observa en la Figura 10, existe una tendencia biológica a concentrar la toxina en la fracción celular, sin embargo el análisis estadístico indica que no hay diferencias en la concentración de STX intra y extracelular en medio con alto fósforo (N:P 1:0,07) según lo indicado por la

prueba Kruskal-Wallis, $p=0,827$ $gl=1$. En el caso de la detección de STX en medio con bajo fósforo (1:0,0007), también se observa una tendencia biológica a concentrar la toxina en la fracción celular entre los días de mayor crecimiento. Sin embargo, este resultado tampoco fue estadísticamente significativo según lo indicado por la prueba Kruskal-Wallis, $p=0,175$ $gl=1$. En la Fig. 12 se muestra el cromatograma del estándar de STX utilizado y la determinación de STX intracelular de *C. raciborskii* D9 crecida en medio con alto nitrógeno y alto fósforo.

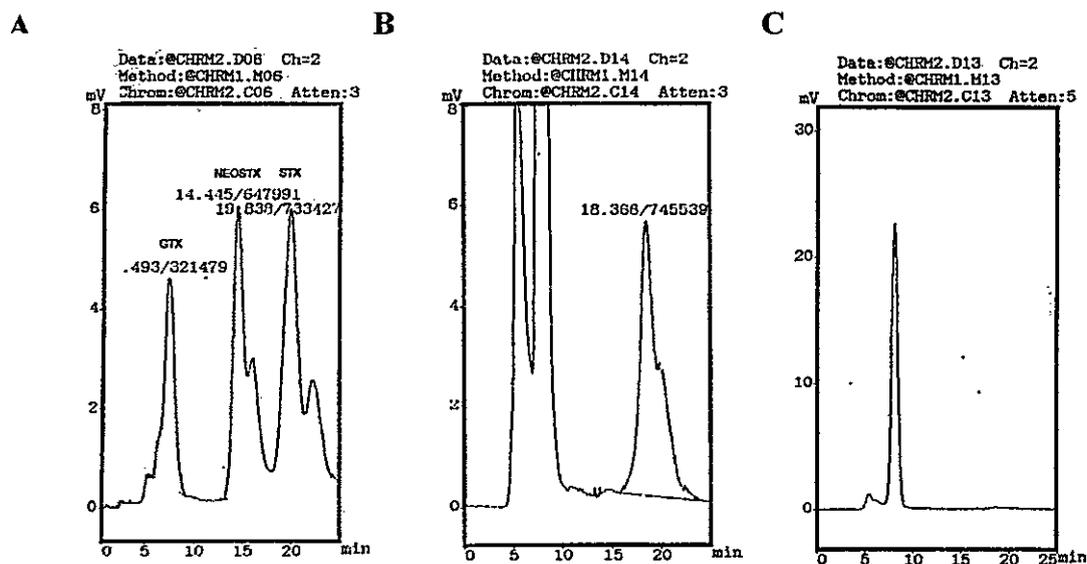


Fig. 12. Detección de STX mediante HPLC-FLD. (A) Cromatograma de un estándar de STX. (B) Cromatograma de la extracción de toxina de la fracción celular del cultivo de *C. raciborskii* D9 al día 9 de crecimiento en medio con razón N:P 1:0,07 (C) Cromatograma de la extracción de toxina de la fracción celular de *C. raciborskii* D9 al día 43 de crecimiento en medio con con razón N:P 1:0,07.

3.2. Efecto de NH_4Cl y urea y como fuente de nitrógeno en el crecimiento de *C. raciborskii*.

El crecimiento en medio con NH_4Cl como única fuente de nitrógeno (Fig. 13), sólo permite el crecimiento de *C. raciborskii* D9 hasta una concentración de 3 mM según lo indicado por la prueba Kruskal-Wallis, $p= 0,013$ $gI= 4$. Mayores concentraciones provocaron la muerte celular.

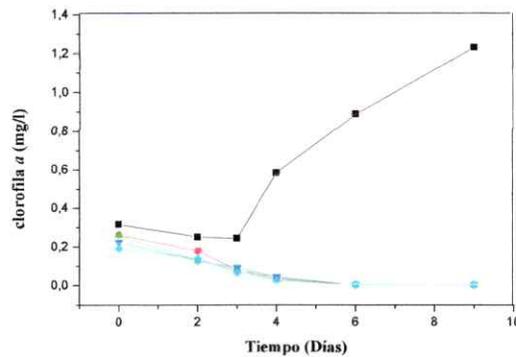


Fig. 13. Crecimiento de *C. raciborskii* D9 en diferentes concentraciones de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Concentraciones: (■) 3 mM, (●) 6 mM, (▲) 12 mM, (▼) 20 mM, (◆) 100 mM.

Para verificar si el crecimiento de *C. raciborskii* D9 con NH_4Cl era afectado por el cloruro puesto en el medio, se creció la cepa en medio MLA con diferentes concentraciones de NaCl (Fig. 14).

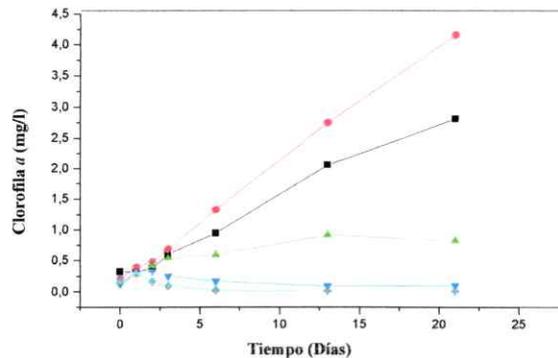


Fig. 14. Crecimiento de *C. raciborskii* D9 en diferentes concentraciones de NaCl . Concentraciones: (■) MLA, (●) 1 g/l, (▲) 2 g/l, (▼) 3 g/l, (◆) 4 g/l, (+) 5 g/l, (○) 7 g/l.

C. raciborskii D9 creció hasta una concentración de 1 gr/l de NaCl según lo indicado por la prueba Kruskal-Wallis, $p=0,001$ $gl=6$ (que contiene 0,6 gr de Cl⁻), la cual es mayor que en medio con 6 mM de NH₄Cl (que contiene 0,1 gr/l de Cl⁻), condición en la que presentaron una inhibición del crecimiento (Fig. 13). Por lo tanto, es posible que el cloruro no sea el causante de la muerte celular en medio con NH₄Cl. La producción de amonio podría ser una posible causa de la muerte celular.

De acuerdo a lo que se muestra en la figura 15, *C. raciborskii* D9 no puede crecer en concentraciones sobre 1,5 mM de urea, según lo indicado por la prueba Kruskal-Wallis, $p=0,049$ $gl=1$.

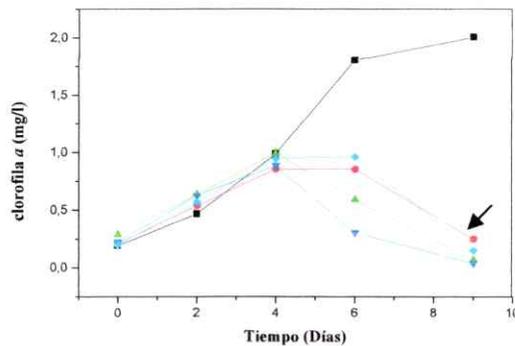


Fig. 15. Crecimiento de *C. raciborskii* D9 en diferentes concentraciones de urea como fuente de nitrógeno. Concentraciones: (■) 1,5 mM, (●) 3 mM, (▲) 6 mM, (◆) 10 mM, (▼) 50 mM. (La flecha indica la concentración de urea utilizada como alta fuente de nitrógeno en fig. 11)

3.3. Producción de ureasa en el cultivo de *C. raciborskii* D9.

Se analizó la producción de ureasa en el cultivo con el propósito de determinar si era originada por las cianobacterias y/o por la microbiota acompañante. Para esto, se

inocularon tubos con medio Christensen-Urea-agar como se describe en materiales y métodos (Tabla 6).

Todos los inóculos presentaron viraje de color naranja a fucsia (Fig. 16), sin embargo, estos fueron apareciendo en diferentes tiempos durante 5 días.

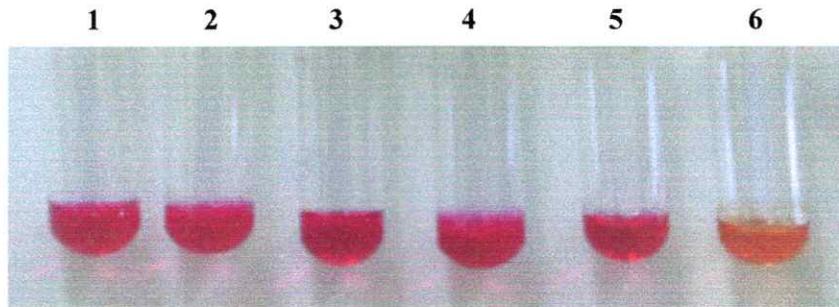


Fig. 16. Ensayo Christensen-Urea-agar para detectar producción de ureasa. Tubos: 1, *C. raciborskii* D9 sin filtrar; 2, *C. raciborskii* D9 filtradas; 3, *C. raciborskii* D9 filtradas y sonicadas; 4, filtrado de bacterias acompañantes; 5, Control positivo (*V. parahaemoliticus* RIMD 2210856); 6, Control del medio.

Según este resultado, es posible que tanto *C. raciborskii* D9 como las bacterias acompañantes produzcan ureasa. Debido a que el viraje de color en el tubo con filtrado de células acompañantes puede estar dado por ureasa liberada al medio por las cianobacterias y/o por las bacterias acompañantes, se inoculó el filtrado en placas agar Christensen para detectar colonias de bacterias acompañantes productoras de ureasa. Como se observa en la figura 16, las bacterias que acompañan a *C. raciborskii* D9 producen ureasa.

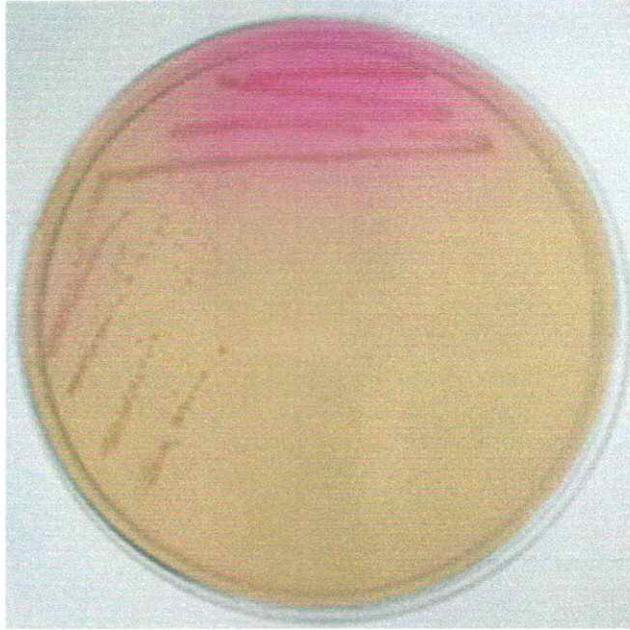


Fig. 16. Aislamiento de microbiota acompañante (dilución 1/50) de *C. raciborskii* D9 en medio Christensen-Urea-agar en placa para detectar producción de ureasa.

DISCUSIÓN

El análisis mediante ARDRA del clon *C. raciborskii* D9 y del clon C10 (Castro y col., 2004), obtenidos ambos a partir del mismo cultivo mixto (*C. raciborskii* SPC338) indicó que ambos clones son idénticos. Por esta razón, los datos obtenidos para *C. raciborskii* D9 pueden ser extrapolados a *C. raciborskii* C10 y viceversa.

Debido a que el cultivo de *C. raciborskii* D9 no es axénico, al igual que el clon C10, se aplicó el mismo protocolo ya descrito (Castro y col., 2004) para eliminar las bacterias que acompañan al cultivo *C. raciborskii* D9, con el propósito de obtener un cultivo adecuado para los análisis moleculares. Dada la morfología de *C. raciborskii* (células filamentosas de más de 100 μm de largo), forman una red que en el momento de filtrar atrapan con facilidad las bacterias acompañantes y no permiten eliminarlas completamente. Además, las bacterias acompañantes pueden formar aglomerados que no pasan por el filtro y que con mayor facilidad quedan atrapadas entre las cianobacterias. Sin embargo, la cantidad de bacterias contaminantes que quedan después del procedimiento de lavado (1000 bacterias acompañantes aproximadamente por ml de concentrado de *C. raciborskii*) garantiza que el DNA visibles por PFGE corresponde a DNA de *C. raciborskii* D9 (Fig. 7A y B).

Está descrito que las cianobacterias producen una gran cantidad de nucleasas (Soper y Reddy, 1994) que hacen muy difícil la obtención de DNA genómico intacto. Además, el DNA que se obtiene tiene una gran cantidad de iones metálicos que interfieren con los análisis moleculares posteriores, como la amplificación por PCR y digestión de DNA. Al igual que *C. raciborskii*, *Streptomyces* sp. es una bacteria

filamentosa (alcanza hasta 100 μm de largo) a la que se le han descrito numerosas nucleasas (Aparicio y col., 1988; Cal y col., 1996; Nicieza y col., 1999) que degradan completamente el DNA de dicha especie. El protocolo Kirby Mix (Kieser y col., 2004) descrito en materiales y métodos utilizado para la extracción de DNA de *Streptomyces* sp. protege el DNA de la actividad nucleolítica, por lo que se utilizó esta metodología para la extracción de DNA de *C. raciborskii* D9. Este protocolo resultó ser una buena forma de obtener DNA íntegro desde *C. raciborskii* D9 (Fig. 5).

La electroforesis por campo pulsado es una técnica utilizada ampliamente para estimar el tamaño genómico de bacterias y se han descrito protocolos muy bien estandarizados, como es el caso de *V. parahaemolyticus* (Chowdhury y col., 2000). Sin embargo, en el caso de las cianobacterias existen muy pocos protocolos para PFGE y de éstos ninguno es para aquellas que son filamentosas. Por esta razón, fue necesario implementar un protocolo adecuado. El Protocolo A produjo moldes de agarosa con DNA completamente degradado. Este protocolo consideró el lavado de las células de *C. raciborskii* D9 con Sacarosa 0,3 M lo que probablemente hace que este tipo de células se rompan (posiblemente por diferencia de osmolaridades) y liberen una gran cantidad de nucleasas que degradan el DNA. También, puede ocurrir una degradación producto de la agitación que es necesario hacer, en ambos protocolos, en el momento de mezclar los filamentos con la agarosa LMP. Es posible que esta agitación provoque un rompimiento mecánico de las células y por lo tanto la liberación anticipada de las nucleasas, además de un daño directo en el DNA producto de la agitación. A pesar de que usando el Protocolo B se observa una pequeña degradación del DNA de *C. raciborskii* D9, como

se muestra en la Fig. 8B, esta degradación es mucho menor que la producida utilizando el Protocolo A. Entre las modificaciones realizadas al Protocolo B para proteger la integridad del DNA, puede haber sido muy importante la incorporación de EDTA 50 mM en el momento de realizar el lavado para eliminar la microflora acompañante. El EDTA actúa quelando metales, los que son imprescindibles para que las nucleasas puedan actuar. Debido al éxito del Protocolo B, los moldes de agarosa para desarrollar el PFGE fueron realizados con este protocolo.

El PFGE usando el Protocolo B, permitió observar que *C. raciborskii* D9 presenta un solo cromosoma de aproximadamente 2 Kb (Fig. 8B). Sin embargo, en el cálculo del tamaño genómico utilizando la enzima de restricción *MluI*, dio un tamaño un poco menor al anterior, 1,7 Mb aproximadamente (Tabla 9). Una posible causa de este hecho, es que al no obtener una óptima separación en el PFGE de las bandas producidas con la digestión con la enzima *MluI*, es probable que haya bandas que no fueron consideradas en el cálculo del tamaño genómico. Por esta razón, es necesario mejorar las condiciones de corrida electroforética, incluyendo un bloque al comienzo con pulsos de tiempos más cortos para separar las bandas más pequeñas y luego un bloque con pulsos más largos para separar las bandas más grandes. También se pudo observar que *C. raciborskii* D9 no presenta elementos extracromosomales en el rango de tamaño analizado.

En general, se ha descrito que el DNA de diferentes especies de cianobacterias puede ser digerido por la enzima de restricción *NotI*, como ocurre en el caso de *Synechocystis* sp (Churin y col., 1995) y *Prochlorococcus marinus* (Strehl y col., 1999). Sin embargo, en el caso de *C. raciborskii* D9 dicha enzima no produjo cortes en su

genoma en las condiciones ensayadas. En numerosos casos, se ha encontrado el fenómeno de metilación en cianobacterias (Scharnagl y col., 1998; Soper y Reddy, 1994), más aún en el caso de las cianobacterias filamentosas (Padhy y col., 1988). Se ha descrito que especies de cianobacterias pertenecientes específicamente al género *Nostoc*, son altamente metiladas (Jäger y Potts, 1988); posiblemente por esta razón la enzima *NotI* y varias otras enzimas ensayadas no produjeran cortes en el genoma de *C. raciborskii* D9. Sin embargo, estas enzimas reconocen secuencias con alto contenido de GC, por lo tanto, también es posible que el contenido de GC en el genoma de *C. raciborskii* D9 sea muy bajo y por esto no se produzcan cortes con dichas enzima.

El tamaño genómico de los dinoflagelados es aproximadamente 100 veces más grande que el del humano y se encuentra en el rango de 3000-215000 Kb (Hackett y col., 2004). En comparación, el tamaño del genoma de diferentes especies de cianobacterias se encuentra entre 1,8 Mb y 13,6 Mb (Strehl y col., 1999). El tamaño de *C. raciborskii* D9 estimado en esta tesis mediante PFGE estaría dentro de los más pequeños encontrados hasta ahora para cianobacterias. Debido a que se estima que la STX es producida por un grupo de genes tipo péptido sintetasa con una extensión probable de 40-50 Kb (M.Vásquez, datos no publicados), el tamaño genómico aproximado de *C. raciborskii* D9 (suponiendo un tamaño genómico de 2 Mb) permite predecir que 260 clones de una genoteca en cosmidos sería un número necesario para poder representar el genoma completo de la bacteria y continuar con el estudio de la ruta biosintética de STX.

Para realizar los estudios fisiológicos de *C. raciborskii* se necesitó definir un método confiable para evaluar el crecimiento de la bacteria. Por las características

morfológicas de *C. raciborskii* (filamentosas y con vacuolas de gas que les permiten flotar) es muy difícil calcular la concentración de ellas mediante densidad óptica. Una forma alternativa para determinar el crecimiento en forma indirecta, es la cuantificación de clorofila *a* (Yentsch y Menzel, 1963). Este pigmento sólo está presente en bacterias que realizan fotosíntesis. De esta manera, se pudo asegurar que el crecimiento evaluado cuantificando clorofila *a* sólo corresponde a las cianobacterias y no a la microbiota acompañante.

Los estudios fisiológicos estuvieron enfocados a la evaluación del efecto del nitrógeno y fósforo (nutrientes esenciales para el crecimiento bacteriano) sobre el crecimiento y la producción de toxinas. El fósforo es la base de innumerables biomoléculas: el fósforo es un componente esencial de la membrana lipídica, carbohidratos complejos como lipopolisacáridos y ácidos nucleicos (Wanner, 1996). De esta manera, el metabolismo del fósforo involucra numerosas vías metabólicas. Se ha descrito que el nitrógeno puede jugar un papel significativo en la producción de microcistina y anatoxina-*a* en especies de *Anabaena* y *Aphanizomenon* (Rapala y col., 1993, 1997) y sobre toxinas de dinoflagelados marinos (Anderson y col., 1990a). El nitrógeno es una parte integral de la estructura química de STX, puesto que ésta contiene un 33% de nitrógeno en su peso molecular (Anderson y col., 1990b). En el caso de los medios con baja fuente de nitrógeno (aportados como NaNO_3 y como urea), *C. raciborskii* D9 no fue capaz de crecer. Sólo creció en altas concentraciones de nitrógeno aportado como NaNO_3 . Al igual que *C. raciborskii* D9, cepas tóxicas de *Mycrocystis* no fueron capaces de crecer en medio con bajo nitrógeno. Sin embargo, cepas no tóxicas de *Mycrocystis* fueron capaces de crecer en bajo nitrógeno, dando cuenta de que la

demanda de nitrógeno puede variar dentro de bacterias pertenecientes a la misma especie (Vézie y col., 2002). Según estos resultados, se ha planteado que especies tóxicas requieren mayor cantidad de nitrógeno que especies no tóxicas (Vézie y col., 2002) debido al gran gasto que realizan en la producción de toxinas, que posiblemente se realizaría mediante complejos multienzimáticos (Dittmann y col., 1997; Neilan y col., 1999; Nishizawa y col., 2000). Una baja razón N:P produce un mayor crecimiento de *C. raciborskii* D9 y una alta razón N:P produce un menor crecimiento. Análogamente, Nascimento y Azevedo (1999) reportaron que una alta concentración de Clorofila *a* en *Synechocystis aquatilis f. salina* (indicativo de una mayor biomasa) fue observada en cultivos crecidos en medio ASM-1 con baja razón N:P. A pesar de esto, se pueden observar algunos paralelos dentro de la misma especie. Para el caso de *C. raciborskii* Woloszynska (Saker y col., 1999), a pesar de que esta cepa presenta un bajo crecimiento en mínimas concentraciones de nitrógeno, presenta una alta producción de toxina. Más aún, cuando fue cultivada en altas concentraciones de nitrógeno, esta cepa presentó una alta tasa de crecimiento y una baja producción de toxina. Estas diferencias entre cepas de la misma especie, nos da cuenta del amplio rango de características que pueden tener las cianobacterias, ya que condiciones que son favorables para algunas son perjudiciales para otras.

La mayor detección de STX en *C. raciborskii* D9, se asocia al período en el cual se encontró un mayor crecimiento en cada medio estudiado y se halló una tendencia a acumular la toxina en la fracción intracelular. En medio con bajo fósforo (N:P 1:0,0007) hubo una tendencia a producir más toxina que en medio con alto fósforo (N:P 1:0,07). Según los análisis estadísticos, las diferencias antes mencionadas no son

significativamente distinta. Sin embargo, debido a que las réplicas tomadas en cada análisis fueron hechas a partir de la misma muestra, es necesario realizar un aumento en el número de muestras para realizar un análisis estadístico adecuado.

Análogamente a la tendencia de acumular toxinas en la fracción intracelular, esto también se ha observado en otras cianobacterias como es el caso de *Mycrocystis aeruginosa*. En *Mycrocystis* la mayor concentración intracelular de toxina fue detectada bajo condiciones favorables de crecimiento (Watanabe y Oishi., 1985). Además, en esta misma bacteria se ha observado que la producción de microcistina se encuentra acoplada a su ciclo celular, con un máximo de producción en la fase de crecimiento logarítmica tardía y la fase estacionaria temprana (Ohtake y col., 1989; Van Der Westhuizen y Eloff, 1983, 1985).

En la fase de muerte (día 45) de *C. raciborskii* D9, en el medio con razón N:P 1:0,0007, se detecta un alto contenido de STX en el sobrenadante, probablemente por efecto de lisis celular. A pesar de esto, esta no alcanza a representar el total de la STX producida. Adicionalmente, en el medio con razón N:P 1:0,07 en el día 45, donde ya casi no se detecta la presencia de células de *C. raciborskii* D9, no se encuentra toxina en la fracción celular ni en el sobrenadante. En resumen, estos resultados sugieren que la STX se esta biotransformando (puede ocurrir a nivel intracelular o extracelular) o simplemente inactivando en el medio extracelular. Estos resultados coinciden con lo descrito para el clon *C. raciborskii* C10 (Castro y col., 2004), donde se sugiere la biotransformación de STX a los epímeros GTX2 y GTX3.

Los ensayos para cuantificar toxinas por HPLC se realizaron usando cultivos de *C. raciborskii* D9 sin lavar, es decir con presencia de la microbiota acompañante. Sin

embargo, trabajos previos con cepas axénicas y no axénicas, sugieren que la coexistencia de bacterias acompañantes en el dinoflagelado *Alexandrium* sp. (Dantezer y Levin, 1997), ni en la cianobacteria *O. agardhii* (Sivonen, 1990) inducen la producción de toxina. Según estos estudios, los niveles de toxina en cultivos axénicos fueron similares a los encontrados en cultivos no axénicos.

Como fuente alternativa de crecimiento se utilizó el NH_4Cl , determinándose crecimiento a un máximo de 3mM. Como se vio en los experimentos posteriores con NaCl , el cloruro adicionado al medio con NH_4Cl posiblemente no fue el causante de la muerte celular (Fig. 13 y fig. 14). Curiosamente, *C. raciborskii* D9 presenta una mayor resistencia a NaCl que la otra cepa productora de la STX, *C. raciborskii* T3 (Pomati y col., 2004). La cepa *C. raciborskii* D9 manifiesta una concentración inhibitoria del crecimiento de 17 mM de NaCl mientras que la cepa T3 de 10 mM. Debido a que STX actúa bloqueando canales de Na^+ voltaje dependientes, los cuales han sido putativamente identificados en cianobacterias (Pomati y col., 2004), estos autores sugieren que esta toxina juega un rol importante en la mantención de la homeostasis celular y en la regulación de los niveles intracelulares de sodio y potasio en esta cianobacteria.

Los estudios llevados a cabo en esta tesis, no revelan cual es el principal factor responsable del incremento de la producción de toxina en *C. raciborskii* D9. Sin embargo, con ellos se muestra la complejidad de la regulación de la producción de toxina por condiciones ambientales.

Con respecto a la microbiota acompañante, como se encontró en los análisis de secuencias, posiblemente son pertenecientes al género *Vibrio*. Consistentemente con estos resultados, Islam (1991) detectó la presencia de *Vibrio cholerae* en el mucílago de

la cianobacteria *Anabaena* sp. Se ha encontrado que muchas especies de cianobacterias, marinas y de agua dulce, pueden usar urea como única fuente de nitrógeno (Flores y Herrero, 1994). La urea es transportada al interior de las cianobacterias y en ellas es metabolizada, mediante la enzima ureasa, a una molécula de CO₂ y dos moléculas de amonio resultando en un aumento del pH intracelular (Mobley y col., 1995). La enzima ureasa ha sido aislada desde algunas especies de cianobacterias (Argall y col., 1992). Cuando se utilizó urea como fuente de nitrógeno, *C. raciborskii* D9 no fue capaz de crecer en dicho medio observándose la lisis celular sobre 1,5 mM de urea. En el año 1998, Sakamoto y col., demostraron que la cepa *Synechococcus* sp. PCC 7002 en presencia de 50 mM de urea presenta una rápida clorosis y muerte celular en fase estacionaria, producto de la formación de peróxidos tóxicos que desencadenan un daño oxidativo en las células. En el caso de *C. raciborskii* D9, se observó la misma forma de muerte del cultivo celular descrita para la cepa *Synechococcus* sp. PCC 7002, cuando *C. raciborskii* D9 fue crecida en medio con urea (3 mM) como única fuente de nitrógeno. Cuando se verificó si existía una concentración límite de urea para el crecimiento de *C. raciborskii* D9 (Fig. 15), se comprobó que sólo podía crecer en concentraciones bajas de urea (hasta 1,5 mM).

Debido a que los cultivos de *C. raciborskii* D9 no son axénicos y debido a esto, existe la posibilidad de una sobre producción de ureasa, se trató de establecer si las cianobacterias, la microflora acompañante o ambas producían ureasa. No obstante, no fue posible comprobar ni descartar que *C. raciborskii* D9 produjera dicha enzima. En el ensayo para detectar la presencia de ureasa (Fig. 16), en todas las muestras analizadas hubo reacción positiva para la presencia de dicha enzima. El tubo que contenía sólo

células acompañantes, no cambió de color inmediatamente sino que a los 3 días. Es posible que la ureasa haya sido producida por las bacterias acompañantes y no fuese la traída con el medio filtrado. Como se demuestra en la Figura 17, la microbiota acompañante presente en el cultivo de *C. raciborskii* D9 produce ureasa. Esta microbiota, observada mediante epifluorescencia, presenta altas tasas de crecimiento (datos no mostrados). De esta manera, y más aún sin descartar la posibilidad que *C. raciborskii* D9 produzca ureasa, es posible que ocurra un aumento desmedido del pH producto del aumento de amonio (forma altamente tóxica, producida por la degradación de la urea mediante la ureasa) y de radicales libres en el medio de cultivo y que esto afecte directamente el crecimiento de *C. raciborskii* D9 en medio con urea como única fuente de nitrógeno. Al igual que lo encontrado para *C. raciborskii* D9, se ha descrito que la cepa no axénica de *C. raciborskii* Woloszynska (productora de cilindrospermopsina), no puede crecer en medio con urea como única fuente de nitrógeno (Saker y col., 1999).

En esta Tesis se consiguió optimizar los diferentes protocolos indispensables para realizar el análisis genómico en *C. raciborskii* D9, tales como: evaluación del crecimiento, la extracción de DNA y preparación de DNA para PFGE. Con esta base es posible continuar con el análisis genómico de *C. raciborskii* D9 y definir si existen rutas de biosíntesis similares entre cianobacterias y dinoflagelados.

Finalmente, muchas preguntas quedan por resolver con respecto a la fisiología de la producción de la STX y más aún, de la función que cumple dicha toxina en la cianobacteria y en el ambiente. A pesar de esto, el rumbo del esclarecimiento de estas incógnitas cada vez se ve más cercano, con la esperanza de algún día llegar a tener una

mejor convivencia con estas bacterias, que sin duda nos acompañarán por mucho tiempo más.

CONCLUSIONES

- ✓ El protocolo de lavados aplicado al cultivo de *C. raciborskii* D9, permite obtener un concentrado de células de dicha cianobacteria con una reducida carga de bacterias acompañantes, lo que garantiza que los estudios moleculares realizados posteriores a los lavados sean el resultados de los análisis realizados sobre el DNA de la cianobacteria y no de las bacterias acompañantes.

- ✓ El tamaño genómico estimado para *C. raciborskii* D9 (1,7 - 2 Mb aproximadamente), indica que esta cianobacteria es un modelo simple para estudiar la ruta biosintética de STX y sus análogos debido a su menor complejidad genómica, comparada con otros modelos, tales como los dinoflagelados.

- ✓ Diferentes razones de nitrógeno (aportado como nitrato de sodio) y fósforo, exhiben una distinta producción de la STX. Por esto, estas condiciones serían buenas candidatas para realizar futuros estudios proteómicos, con el fin de encontrar proteínas relacionadas a la síntesis de la STX.

REFERENCIAS

1. Alduina, R., De Grazia, S., Dolce, L., Salerno, P., Sosio, M., Donadio, S. y Puglia, A. 2002. Artificial chromosome libraries of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Planobispora rosea*. FEMS Microbiol. Lett. **218**: 181-186.
2. Anderson, D. M., Kulis D. M., Sullivan J. J. y Hall, S. 1990b. Toxins composition in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. Toxicon. **28**: 885-893.
3. Anderson, D. M., Kulis D. M, Sullivan, J. J., Hall S. y Lee, C. 1990a. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. Marine Biol. **104**: 511-524.
4. Aparicio, J. F, De los Reyes-Gavilan, C. G., Barbes, C., Hardisson, C. y Sanchez, J. 1988, A non-specific deoxyribonuclease with restriction function in *Streptomyces glaucescens*. J. Gen. Microbiol. **134**:2345-51.
5. Argall, M. E., Smith, G. D., Stamford, N. P., Youens, B. N. 1992. Purification and properties of urease from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. Biochem. Int. **27**: 1027-36.
6. Cal, S., Nicieza, R. G., Connolly, B. A. y Sanchez, J. 1996. Interaction of the periplasmic dG-selective *Streptomyces antibioticus* nuclease with oligodeoxynucleotide substrates. Biochem. **20**:10828-36.
7. Castro, D., Vera D., Lagos N., García C. y Vásquez, M. 2004. The effect of the temperatura on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. Toxicon. **44**: 483-489.
8. Catteral, W.A. 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **20**: 15-43.
9. Cestéle, S. y Catterall, W. A. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie. **82**: 883-892.
10. Chistensen, W.B. 1946. Urea decomposition as means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J. Bacteriol. **52**: 461-466.
11. Churin, Y., Shalak, I. N., Borner, T. y Shestakov, S. V. 1995. Physical and genetic map of the chromosome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J. Bacteriol. **177**: 3337-3343.
12. Corkill, J.E., Robert Graham, Charles Anthony Hart y Simon Stubbs. 2000. Pulsed-Field gel electroforesis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. J. Clin. Microbiol. **38**: 2791-2792.
13. Dantzer, W. R. y Levin, R. E. 1997. Bacterial influence on the production of paralytic shellfish toxins by dinoflagellate algae. J. Appl. Microbiol. **83**: 464-469.
14. Dittmann, M. M., Rozing, G. P., Ross, G., Adam, T., Unger, K. K. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Mol. Microbiol. **26**: 779-87.

15. Doménech, J.M. y Riba, M.D. 1987. Una síntesis de los métodos estadísticos bivariantes. Barcelona: Herder.
16. Espejo, R.T. y Escanilla, D. 1993. Detection of HIV1 DNA by simple procedure of polymerase chain reaction, using "primer-dimer" formation as an internal control of amplification. *Research Virol.* **144**: 93-102.
17. Falconer, I.R. 1996. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycol.* **36**: 6-11.
18. Flores, E. y Herrero, A. 1994. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. *En: Bryant D.A (ed.). The molecular Biology of Cianobacteria pp. 487-517. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.*
19. Gallacher, S., y Birkberk T. H. 1992. A tissue culture assay for the direct detection of sodium channel blocking toxins in bacterial culture supernates. *FEMS Microbiol. Lett.* **92**: 101-108.
20. Guzman, L., Pacheco, H., Pizarro, G. y Alarcón, C. 2002. Alexandrium catenella y veneno paralizante de los mariscos en Chile. *En: Sar EA, M. E. Ferrario & B. Reguera (Eds.). Floraciones algales nocivas en el cono sur americano: 235-255. Instituto Español de Oceanografía, Vigo, Spain.*
21. Hackett, J. D., Anderson, D., Erdner, D. y Bhattachary, D. 2004. Dinoflagellates: A remarkable evolutionary experiment. *American J. Bot.* **91**:1523-1534.
22. Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**: 79-99.
23. Hobbie, J.E. 1977. Use of nucleopopre filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1225-1228.
24. Humpage, A. R., Rositano, J., Bretag, A. H., Brown, R., Baker, P. D., Nicholson B. C., y Steffensen, D. A. 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian blue-green algal (cyanobacterial) blooms. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* **45**: 761-771.
25. Islam, M. S. 1991. Toxigenicity and toxin genes of *Vibrio cholerae* 01 isolated from an artificial aquatic environment. *World Microbiol. Biotechnol.* **7**:269-271.
26. Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsae, N. y Herdman, M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16SrRNA-23SrRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiol.* **146**: 1275-1286.
27. Jager K y Potts M. 1988. Distinct fractions of genomic DNA from cyanobacterium *Nostoc commune* that differ in the degree of methylation. *Gene.* **74**:197-201.
28. Jensen, M.A., Webster, J.A y Straus N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. and Environ. Microbiol.* **9**: 945-952.
29. Kaas, H. y Henriksen, P. 2000. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish Lakes. *Water Res.* **34**: 2089-2097.
30. Kieser, T., Bibb, J., Buttner, M., Chater, K., David A. 2004. Practical *Streptomyces* Genetics Hopwood John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, England
31. Lagos, N. 1998. Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. *Biol. Res.* **31**: 375-386.

32. Lagos, N. 2003. Paralytic shellfish poisoning phycotoxins occurrence in South America. *Comm. Toxicol.* **9**:175-193.
33. Lagos, N., Onedera, H., Zagatto, P., Adrinolo, D., Azevedo, S. y Oshima, Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon.* **37**: 1359-1373.
34. Lane, D.J., Pace, B. y Olsen, G.J. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.* **20**: 6955-6959.
35. León, U. 2005. Diversidad genética generada en una población clonal de *Vibrio parahaemolyticus* causante de los brotes de diarrea ocurridos en Chile en 1998 y 2004. Memoria de Título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago. Chile.
36. Mahmood, N. A. y Carmichael, W. W. 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon.* **24**: 175-186.
37. Mathew, M.K., Smith, C.L. y Cantor, C.R. 1988. High Resolution Separation and Accurate Size Determination in Pulsed Field Gel Electrophoresis of DNA. 1. DNA Size Standards and the Effect of Agarose and Temperature. *Biochem.* **27**: 9204-9210.
38. Mobley H.L. y Hausinger R.P. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* **59**:451-80.
39. Neilan B.A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, A., Schaub, V., Sivonen, K. y Börner T. 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J. Bact.* **181**: 4089-4097.
40. Nicieza R. G., Huergo J., Connolly B.A. y Sanchez J. 1999. Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation, *J. Biol. Chem.* **274**: 20366– 20375.
41. Nishizawa, T., Ueda K., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Ochi, K. y Shirai, M. 2000. *J. Biochem.* **127**: 779-789.
42. Ohtake, A., Shirai, M., Aida, T., Mori, N., Harada, K., Matsuura, K., Masaharu, S. y Nakano. 1989. M. Toxicity of Microcystis species isolated from natural blooms and purification of the toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3202-3207.
43. Oliver, R. L. y Ganf, G. G. 2000. Freshwater blooms. *En: Whitton B.A. y Potts M. (eds), The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.* pp: 149-193. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
44. Onodera, H., Satake, M., Oshima, Y., Yasumoto, T y Carmichael, W. W. 1997. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Nat. Toxins.* **5**: 146-151.
45. Oshima, Y. 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatography method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Intern.* **78**: 528-532.
46. Padhy, R. N., Hottat, F., Coene, M. y Hoet, P. 1988. Restriction analysis and quantitative estimation of methylated bases of filamentous and unicellular cyanobacterial DNAs. *J. Bacteriol.* **170**: 1934-1939.
47. Pereira, P., Onodera, H., Adrinolo, D., Franca, S., Araújo, F., Lagos, N. y Oshima, Y. 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium

- Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargirl reservoir, Portugal. *Toxicon*. **38**: 1689-1702.
48. Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B. y Neilan, B. 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiol.* **150**: 455-461.
 49. Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C., Giovannardi, S., Onedera, H., Oshima, H. y Neilan, B. 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. Fp1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.* **36**: 553-562.
 50. Rapala, J., Sivonen, D. K., Luukkainen, R. y Niñémela, S. I. 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* at different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains, a laboratory study. *J. Appl. Phycol.* **5**: 581-591.
 51. Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C. y Niñémela, S. I. 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2206-2212.
 52. Sakamoto, T., Delgaizo, V. y Bryant, D. 1998. Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2361-2366.
 53. Saker, M. L., Neilan, B. A. y Griffiths, D. J. 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *J. Phycol.* **35**: 599-606.
 54. Scharnagl, M., Richtner, S. y Hagemann, M. 1998. The cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 expresses a DNA methyltransferase specific for the recognition sequence of the restriction endonuclease *PvuI*. *J. Bacteriol.* **180**: 4116-4122.
 55. Schwartz, D. C. y Cantor CH. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. **37**: 67-75.
 56. Shimizu, Y. 1986. Toxigenesis and biosynthesis of saxitoxin analogues. *Pure. Appl. Chem.* **58**: 257-262.
 57. Sivonen, K. 1990 Effects of light, temperatura, nitrate, orthophosphate and bacteria on growth and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2658-2666.
 58. Sivonen, K. y Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. pp 41-111. *In* I. Chorus and J. Bartram (ed), *Toxic cyanobacteria in water*. E & FN Spon Publishers, London, United Kingdom.
 59. Sivonen, K., Niemelä, S.I., Niemi, R.M., Lepistö, L., Luoma, T.H y Räsänen, L.A. 1990. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiol.* **190**: 267-275.
 60. Soper, B. W. y Reddy, K. J. 1994. Identification of a nuclease and host restriction-modification in the unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacterium *Cyanothece* sp. *J. Bacteriol.* **176**: 5565-5570.
 61. Spector, D.L. 1984. Dinoflagellate nuclei. *En: Spector DL (Ed.). Dinoflagellates*. p.p:107-47. Academic Press: New York.

62. Stein, J., Marsh, T., Wu, K., Shizuya, H. y De Long, E. 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine Archaeon. *J. Bacteriol.* **178**: 591-599.
63. Strehl, B., Holtzendorff, J., Partensky, F. y Hess, W. 1999. A small and compact genome in the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA (Leu)^{UAA} and a single copy of the rRNA operon. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**: 261-266.
64. Strichartz, G. 1981. Relative potencies of several derivatives of saxitoxin: electrophysiological and toxin binding studies. *Biophys J.* **33**:209-216.
65. Van der Westhuizen, A. J. y Eloff, J. N. 1983. Effect of culture age and pH of culture medium on the growth and toxicity of the blue green alga *Microcystis aeruginosa*. *Zeit Pflanzenphysiol.* **110**:157-163.
66. Van der Westhuizen, A. J. y Eloff, J. N. 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta.* **163**: 55-59.
67. Vélez, P., Sierralta, J., Alcayaga C., Fonseca M., Loyola H., Johns D.C., Tomaselli G., Marbán E. y Suárez-Isla B.A. 2001. A functional assay for paralytic shellfish toxins that uses recombinant sodium channels. *Toxicon.* **39**:929-35.
68. Velzeboer, R., Baker, P. y Rositanos, J. 2001. Saxitoxins associated with the growth of the cyanobacterium *Anabaena circinalis* (Nostocales, Cyanophyta) under varying sources and concentrations of nitrogen. *Phycologia.* **40**: 305-312.
69. Vézic, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen J. y Sivonen, K. 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strain and on intracellular microcystin concentration. *Microb. Ecol.* **43**: 433-454.
70. Wanner, B. L. 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *En: Neidhardt, F. C., Curtiss, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. And Umberger, H. E. (eds.), Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.* Pp: 1357-1381. Washington, D. C.
71. Watanabe, M. F. y Oishi, S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1342-1344.
72. Yentsch, C. S., y Menzel D. W. 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.* **10**: 221-231.