

UCH-FC  
Biotecnología  
VHT3  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



**CARACTERIZACION FENOTIPICA Y GENOTIPICA DE LA CIANOBACTERIA**

**PRODUCTORA DE SAXITOXINA *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales)**

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

Diana Lorena Vera Macaya

Diciembre, 2006 Santiago, Chile

Director de Tesis: Dra. Mónica Vásquez Pérez



FACULTAD DE CIENCIAS-UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

Se informa a la Escuela de Ciencias de la Facultad de Ciencias que la Memoria de Título presentada por la candidata:

**VERA MACAYA DIANA LORENA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de la Memoria rendido el día 15, de Diciembre de 2006.

**Director de Memoria de Título:**

Dra. Mónica Vásquez Pérez



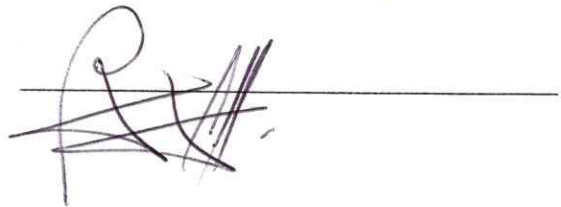
**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Nicolás Guilliani

**Presidente de Comisión**



Dr. Marcelo Baeza Cancino



## Diana Lorena Vera Macaya



Nació el 18 de abril de 1978, en la ciudad de Neuquén, República de Argentina. Hija de Manuel Sergio Vera Diaz y María Mafalda Macaya Mejías, hermana de Pablo Vera Macaya. Cursó sus estudios primarios y secundarios en el Colegio Bautista, destacándose al obtener el galardón de Abanderada y Primera Escolta en los años 1990 y 1994.

Participó de las Olimpiadas Argentinas de Biología durante los años 1993 y 1994, obteniendo el primer lugar Provincial y los 8vos y 10mos lugares nacionales.

Ingresó a la Universidad de Chile por cupo extranjero en el año 1996 y cursó la Carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, licenciándose en el año 2001 (estuvo en Argentina durante el año 1997 por circunstancias personales).

Realizó su Memoria de Título en el Laboratorio de Biotecnología del INTA de la Universidad de Chile bajo la Tutoría de la Dra. Luz Mónica Vásquez Pérez.

Actualmente y desde el año 2003 se desempeña como docente y desde el 2005 pertenece al grupo de Fitopatología del INTA Alto Valle (Río Negro, Argentina).



## Agradecimientos

A mis **papis**, Mari y Nolo, a mi **hermano** Pablo quienes me acompañaron en este camino “largo y zigzagueante” ¡gracias por apoyarme y confiar en mí! Ustedes fueron la motivación diaria que me dio el empujoncito para terminar. Me permitieron llevarles a casa un pedacito del Chile que dejaron hace ya 30 años. Y gracias Tía **Juani**!

A mis **amigos y amigas**:

- Los que quedaron allá detrás de la cordillera y que permanecen en mi corazón y en mi memoria ¡gracias por las mateadas en casa, las tardes/noches de estudio, las largas charlas, las películas que disfrutamos, las copuchas, las noches de fiesta y baile! Pato, Pablín, Bertsy, Dani Fuentes, Ale Vergara, Dios quiera volvamos a vernos.....
- A Dani Castro con quien compartimos largas jornadas de trabajo en laboratorio, risas, comentarios de moda, copuchas ¡y un paper!
- Las del alma y de la vida: Lore y Eliana ¡gracias por la complicidad, la comprensión y la compañía!. Anita Luz, estuvimos en situaciones similares juntas y salimos airosas de ellas ¡Gracias Amiga y Colega!

A mis **jefes**:

- Al Dr. Alejandro Giayetto por su valiosa compañía y guía en la etapa final de presentación de esta tesis.
- Al Dr. Marcelo Roberto por su confianza y apoyo profesional.
- A la Ing. Mirta Rossini por su apoyo y por permitirme días de ausencia por viaje.

A mi **Directora de Tesis** Dra. Mónica Vasquez.

A mi **psicóloga** Lic. Laura Osés por su parsimonioso trabajo y por dos años y medio de terapia. Laura: cada día veo frutos del trabajo que hicimos juntas ¡Muchas gracias!

A **Sergio Paulo** el hombre que me acompaña y que me ayudó en la lucha interna e íntima con la vida, con la recuperación del sentido de vivirla y disfrutarla. ¡Gracias Gersito, sos mi apoyo diario y mi cable a tierra!

## Índice de Contenido



Agradecimientos	ii
Índice de tablas	x
Índice de figuras	x
Índice de medios y soluciones	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xviii
I. Introducción	1
I.1. Antecedentes generales.	1
I.2. Cianobacterias como productoras de toxinas.	3
I.3. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , una especie productora de hepatotoxinas y toxinas paralizantes.	4
I.4. Péptido sintetetasas no ribosomales (NRPS, non ribosomal peptide synthetase) y su participación en producción de metabolitos secundarios en cianobacterias.	8
I.5. Toxinas Paralizantes.	10
I.6. Biosíntesis de STX.	12
II. Hipótesis	16
III. Objetivos	16
IV. Metodología	18
IV.1. Cultivo de <i>C. raciborskii</i> .	18

IV.1.1. Obtención del cultivo <i>C. raciborskii</i> SPC 338 y de la cepa <i>C. raciborskii</i> C10.	18
IV.1.2. Condiciones de cultivo de <i>C. raciborskii</i> SPC 338 y de la cepa <i>C. raciborskii</i> C10.	18
IV.2. Axenicidad de <i>C. raciborskii</i> .	19
IV.2.1. Tinción de bacterias con naranja de acridina y recuento mediante microscopia de epifluorescencia.	20
IV.3. Análisis de la naturaleza clonal del cultivo SPC 338.	20
IV.3.1. Protocolo de extracción de DNA genómico desde <i>C. raciborskii</i> SPC 338: método del etil-xantogenato de potasio con algunas modificaciones (Tillet y Neilan, 2000).	20
IV.3.2. Amplificación, clonamiento, y análisis de los clones mediante ARDRA (amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis) y secuenciación del gen 16S rRNA de <i>C. raciborskii</i> SPC 338.	21
IV.3.3. Generación de cultivos clonales.	24
IV.4. Caracterización genotípica del cultivo C10.	25
IV.4.1. Amplificación, clonamiento y análisis de los clones mediante ARDRA y secuenciación del gen 16S rRNA de <i>C. raciborskii</i> C10.	25



IV.4.2. Alineamiento del 16S rDNA de SPC 338 y C10 con el 16S rDNA de <i>Anacystis nidulans</i> 6301 ( <i>Synechococcus</i> sp. strain PCC 6301).	26
IV.4.3. Detección de un gen tipo Péptido Sintetasa no Ribosomal (NRPS, non ribosomal peptide synthetase) en <i>C. raciborskii</i> SPC 338.	26
IV.4.3.1. Amplificación, clonamiento, análisis de restricción y secuenciación de genes tipo NRPS.	26
IV.4.3.2. Ensayo de hibridación en membrana.	27
IV.5. Análisis filogenético de aislados de distinto origen geográfico de <i>C. raciborskii</i> mediante alineamiento del 16S rDNA.	27
IV.6. Caracterización fenotípica de <i>C. raciborskii</i> .	28
IV.6.1. Detección e identificación de toxinas SCBs en la fracción celular de cultivo de <i>C. raciborskii</i> C10 mediante HPLC- FLD y oxidación post-columna (High Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection).	28
IV.6.1.1. Obtención y tratamiento de las muestras de cultivo de <i>C. raciborskii</i> C10.	28
IV.6.1.2. Extracción ácida de toxinas de la fracción celular de un cultivo de <i>C. raciborskii</i> C10.	28

IV.6.1.3. Limpieza de las toxinas obtenidas desde <i>C. raciborskii</i> C10: utilización de columna C18 Sep-Pack.	29
IV.6.1.4. HPLC-FLD y derivatización postcolumna para la detección de toxinas en la fracción celular de <i>C. raciborskii</i> C10.	29
IV.7. Estudio de la influencia de distintas condiciones de cultivo en la síntesis de saxitoxinas por parte de SPC 338.	30
IV.7.1. Cuantificación de toxinas bloqueadoras de canales de sodio por medio de ensayo en células de neuroblastoma de ratón (N2A).	30
IV.7.1.1. Cultivo de la línea celular N2A y ensayo de cuantificación de toxinas bloqueadoras de sodio.	33
IV.7.1.1.1. Mantención línea celular N2A (ATCC CCL-131).	33
IV.7.1.1.2. Protocolo criopreservación células N2A.	34
IV.7.1.1.3. Determinación de la concentración óptima de veratridina y ouabaina a usar en el ensayo.	34
IV.7.1.1.4. Ensayo de cuantificación toxinas SCBs en células de neuroblastoma de ratón.	35
IV.7.2. Análisis de la producción de toxinas Bloqueadoras de Canales de Sodio (SCB, sodium channel blocking) por <i>C. raciborskii</i> .	38



V. Resultados.	39
V.1. Descripción del cultivo SPC 338	39
V.2. Obtención de un cultivo axénico de <i>C. raciborskii</i> con propósitos de extracción de DNA genómico.	39
V.3. Análisis de la naturaleza clonal del cultivo SPC 338.	41
V.3.1. Obtención de DNA genómico de <i>C. raciborskii</i> adecuado para su uso en análisis molecular.	41
V.3.2. Amplificación, clonamiento, análisis de restricción (amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) y secuenciación del 16S rDNA de <i>C. raciborskii</i> SPC 338.	42
V.3.3. Obtención de cultivos clonales a partir de una célula individual de <i>C. raciborskii</i> SPC 338.	44
V.4. Caracterización del aislado clonal C10: microscopia y análisis genotípico.	46
V.4.1. Microscopia óptica del cultivo C10.	46
V.4.2. Caracterización genotípica del aislado clonal C10.	46
V.4.2.1. Amplificación, clonamiento, análisis de restricción (amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) y secuenciación del 16S rDNA de <i>C. raciborskii</i> C10.	46

V.4.2.2. Análisis comparativo entre los sitios polimórficos en el 16S rDNA presentes en <i>C. raciborskii</i> C10 y en el cultivo SPC 338 y la estructura secundaria del 16S rRNA de la cianobacteria <i>Anacystis nidulans</i> 6301 ( <i>Synechococcus</i> sp. Strain PCC 6301).	48
V.4.2.3. Detección de un gen tipo Péptido Sintetasa No Ribosomal (NRPS) en <i>C. raciborskii</i> SPC338.	51
V.4.2.3.1. Amplificación, clonamiento y secuenciación de un gen tipo NRPS de <i>C. raciborskii</i> SPC338.	51
V.4.2.3.2. Ensayo de hibridación en membrana para detectar el número de locus del gen NRPS en el genoma de <i>C. raciborskii</i> SPC 338.	53
V.5. Análisis filogenético de aislados de distinto origen geográfico de <i>C. raciborskii</i> mediante alineamiento del 16S rDNA.	54
V.6. Caracterización fenotípica del aislado C10.	56
V.6.1. Detección e identificación de toxinas SCB en la fracción celular de cultivo de <i>C. raciborskii</i> C10, mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión con Derivatización Postcolumna y detección en línea por fluorescencia directa (HPLC-FLD).	56



V.7. Estudio de la influencia de distintas condiciones de cultivo en la síntesis de STX y análogos por <i>C. raciborskii</i> .	58
V.7.1. Detección de toxinas SCB en el sobrenadante de cultivo de <i>C. raciborskii</i> SPC 338, mediante el ensayo en células de Neuroblastoma de Ratón (Mouse Neuroblastoma Assay, MNA).	58
VI. Discusión y conclusiones.	61
VII. Bibliografía	75
VIII. Anexos	81



## Índice de Tablas

Tabla 1	Toxinas producidas por cianobacterias	4
Tabla 2	Medio MLA (CSIRO Marine Research™)	19
Tabla 3	Partidores	22
Tabla 4	Solución de Hank's	32
Tabla 5	Sitios polimórficos en el 16S rDNA de <i>C. raciborskii</i> SPC 338 y C10	50
Tabla 6	Detección de toxinas paralizantes mediante HPLC-FLD en la fracción celular de cultivos de <i>C. raciborskii</i> C10.	57



## Índice de Figuras

Figura 1	Microscopia óptica de filamentos de la cepa <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> C10.	5
Figura 2	Diagrama del gen que codifica para un módulo tipo I de péptido sintetasa.	9
Figura 3	Estructura de la STX y sus análogos.	12
Figura 4	Ruta biosintética teórica de la STX.	14
Figura 5	Origen químico de la estructura de STX.	15
Figura 6	Esquema placa de 96 pocillos determinación de concentración óptima de veratridina y ouabaina.	36
Figura 7	Esquema placa de 96 pocillos para ensayo de toxinas SCBs.	36

Figura 8	Extracción de DNA genómico de <i>C. raciborskii</i> por el método del xantogenato de potasio.	41
Figura 9	ARDRA de los genes 16S rRNA de <i>C. raciborskii</i> SPC 338 usando la enzima <i>TaqI</i> .	43
Figura 10	Análisis de restricción de los genes 16S rRNA amplificados (por duplicado) desde una tricoma de <i>C. raciborskii</i> .	45
Figura 11	ARDRA, usando <i>EcoRI</i> , de <i>C. raciborskii</i> C10.	47
Figura 12	Sitios polimórficos en el 16S rDNA de <i>C. raciborskii</i> SPC 338 y C10.	49
Figura 13	Amplificación de un gen tipo NRPS desde <i>C. raciborskii</i> SPC 338.	51
Figura 14	Digestión de clones PS usando la enzima <i>HaeIII</i> .	52
Figura 15	Detección de locus del gen NRPS en el genoma de <i>C. raciborskii</i> SPC 338.	54
Figura 16	Dendograma de aislados de <i>C. raciborskii</i> .	55
Figura 17	Producción de toxinas SCBs a 19 °C por <i>C. raciborskii</i> SPC 338 detectada mediante MNA.	60
Figura 18	Producción de toxinas SCBs a 25 °C por <i>C. raciborskii</i> SPC 338 detectada mediante MNA.	60

Figura 19 Amplificación de ITSs de <i>C. raciborskii</i> SPC 338 y C10 y resolución de heteroduplexes.	83
Figura 20 Información del plasmidio pGem-T Easy™(Promega).	84

### Índice de medios y soluciones

Medio MLA (CSIRO Marine Research) para cultivo de <i>C. raciborskii</i> .	19
TER	20
XS	20
Medio de cultivo Luria Bertrani (LB) para <i>E. coli</i> .	24
Medio de cultivo S.O.C para electroporación de <i>E. coli</i> .	24
Medio RPMI 1640 (para cultivo celular de línea N2A).	31
Neutral Red.	32
Citrato-etanol	32
Solución "stock" de ouabaína.	32
Solución "stock" de saxitoxina (STX )	33
Solución de Hank's.	32



## Lista de Abreviaturas

16S rDNA: gen de la subunidad pequeña del ribosoma

16S rRNA: ribosomal small subunit

23S rRNA: ribosomal big subunit

23S rDNA: gen de la subunidad grande del ribosoma

ARDRA: amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis

ATCC: american type collection culture

C10: cultivo clonal 10 de *C. raciborskii*

CYL: cilindrospermopsina

dc STX: decarbamoil saxitoxina

DNA: desoxirribonucleic acid

GTX2: gonyautoxina 2

GTX3: gonyautoxina 3

HPLC-FLD: High-Performance Liquid Chromatography, with direct fluorescence detection

ITS: intergenic spacer

K<sup>+</sup>: ion potasio

Kb: miles de bases

MNA: mouse neuroblastome assay

mM: milimolar

N2A: línea celular Neuro2A (neuroblastoma de ratón)

Na/K-ATPasa: bomba sodio potasio ATPasa

Na<sup>+</sup>: ión sodio

neoSTX: neo saxitoxina

$\text{NH}_4^+$ : ión amonio

nM: nanomolar

NRPS: non ribosomal peptide synthetase

pb: pares de bases

pH: poder hidrógeno

PKS: polyketide synthetase

PSP: paralytic shellfish poisoning

RNA: ribonucleic acid

rpm: revoluciones por minuto

SCB: sodium channel blocking

SPC 338: cultivo de *C. raciborskii* SPC 338

STX: saxitoxina

STXeq: equivalente saxitoxina

T1: cultivo de *C. raciborskii* originario de la localidad de Amparo

T2: cultivo de *C. raciborskii* originario del reservorio de agua dulce Taquacetuba

T3: cultivo de *C. raciborskii* originario del reservorio de agua dulce Taquacetuba

UV: ultravioleta

Vera: veratridina

VPM: veneno paralizante de marisco



## RESUMEN

*Cylindrospermopsis raciborskii* es una cianobacteria de agua dulce, del orden *Nostocales*, originaria de regiones tropicales y subtropicales. Se han descrito cepas productoras de cilindrospermopsina (CYL), o de Saxitoxina (STX) y análogos. Solo las cepas obtenidas desde la reserva de Billings en Sao Paulo, Brasil, producen STX y sus análogos. Los anteriores conforman lo que se conoce como toxinas PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) típicamente encontradas en los mariscos contaminados por Florecimientos de Algas Nocivas o también llamada "Marea Roja". En este caso, los productores de las toxinas PSP son dinoflagelados, en el caso de Chile, *Alexandrium catenella*. La complejidad del ciclo de vida del alga, del genoma (100 veces superior al humano) y el prácticamente nulo conocimiento de la genética de estos organismos hacen que no sean un buen modelo de estudio para entender la biosíntesis de las toxinas PSP. En esta tesis se pretendió caracterizar genética y fenotípicamente a la cianobacteria *C. raciborskii* con el propósito de utilizar esta bacteria como futuro modelo de estudio de la ruta biosintética de STX y sus análogos. Se dispuso del cultivo SPC 338 y la caracterización genética fue realizada mediante amplificación, clonamiento y secuenciación de los genes 16S rDNA y NRPS (non ribosomal peptide synthetase). El análisis de los genes 16S rDNA indicó la presencia de al menos 2 secuencias diferentes. Un análisis de tricomas individuales mostró que el cultivo SPC 338 está compuesto de dos cepas diferentes que además poseen intraheterogeneidad a nivel del gen 16S rDNA. A partir de este resultado se obtuvo un cultivo clonal, nombrado como C10. La cepa C10 tiene un 99% de identidad entre ambos genes 16S rDNA. El análisis de los clones de genes tipo NRPS reveló la presencia de 2 genes muy similares en su patrón de digestión.

Uno de los clones fue secuenciado obteniéndose una alta identidad en la secuencia aminoacídica con un módulo NRPS de la cianobacteria *Nostoc punctiforme*. El ensayo de hibridación en membrana utilizando este gen como sonda indicó la presencia de múltiples copias de NRPS en el cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* SPC 338. Sin embargo, considerando que el cultivo SPC 338 es un cultivo mixto y no clonal no fue posible atribuir en su totalidad estas copias a un solo genoma. Los genes tipo NRPS detectados en *C. raciborskii* podrían estar desempeñando un rol en la síntesis de metabolitos secundarios, como por ejemplo toxinas PSP.

El cultivo *C. raciborskii* SPC 338 y la cepa C10 fueron caracterizados fenotípicamente mediante el análisis de la producción de toxinas. Las toxinas bloqueadoras de canales de sodio (Sodium Channel Blocking, SCB) del cultivo SPC 338 se analizaron en el sobrenadante del cultivo mediante el ensayo en células de neuroblastoma de ratón (Mouse Neuroblastoma Assay, MNA) y en la cepa C10 en la fracción celular mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión con Derivatización Postcolumna y detección por fluorescencia directa (High-Performance Liquid Chromatography, with direct fluorescence detection, HPLC-FLD). La producción de toxinas SCB fue evaluada a 19 y a 25°C y se observó que en ambas temperaturas las toxinas fueron estables en el medio y existió una mayor producción a 19 °C aunque la biomasa fue 3 a 4 veces menor que a 25°C. La concentración detectada en el pellet fue 4 veces superior a la encontrada en el sobrenadante de cultivo, siendo la primera de 812,4 ng/mg y la segunda de 195 ng/mg, indicando que existe una acumulación intracelular de las toxinas. La cinética de producción de toxinas evaluada mediante HPLC-FLD permitió detectar otros análogos

de STX como GTX2, GTX3 y de STX. Las cinéticas de producción de toxinas a 19°C indicaron una posible biotransformación de STX en GTX2 y GTX3.

Los resultados obtenidos en esta tesis indicaron intraheterogeneidad a nivel del gen 16S rDNA similar a la observada entre cepas de la especie *C. raciborskii*. Se evidenció existencia además de numerosos locus NRPS que podrían estar involucrados en la síntesis de numerosos metabolitos secundarios. La identificación de algunos de las toxinas PSP más potentes en esta cepa y la estabilidad de estas en el medio de cultivo sugiere que es necesaria la detección y control de estas especies en los sistemas de agua dulce.

## ABSTRACT

*Cylindrospermopsis raciborskii* is a freshwater cyanobacterium of *Nostocales* order, from tropicals and subtropicals regions. Strains producing cylindrospermopsin (CYL) or saxitoxin (STX) and analogues have been described. Only strains from Billings reservoir, in Sao Paulo, produce STX and analogues. Saxitoxin and analogues comprise the Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins often found in shellfish contaminated during Red Tides events. In this case, dinoflagellates are the PSP toxin producers, in Chile *Alexandrium catenella*. The complexity of the dinoflagellate life cycle, genome (around 100 times bigger than human) and practically the unknown genetic of these organisms are the reasons why these organisms are not a good model for understanding the PSP toxins biosynthesis.

This thesis pretends to do the genetic and phenotypic characterization of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* with the purpose of use this bacterium as model of the saxitoxins and analogs biosynthetic pathway. The genetic characterization was performed on SPC 338 culture by amplification, cloning and sequencing of 16S rDNA and non ribosomal peptide synthetase (NRPS) genes. The 16S rDNA gene analysis showed the presence of, at least, two different sequences. Analysis of individual trichomes shows that SPC 338 culture is a mix of two different strains and besides showed an intraheterogeneity at 16S rDNA genes. A clonal culture was obtained from SPC 338, named as C10. The strain C10 has 99% of identity between 16S rDNA genes. The NRPS clones analysis showed the presence of two genes with very similar restriction pattern. One of this was sequenced showing high aminoacidic identity with cyanobacterium *Nosctoc punctiforme* NRPS module. Southern blott analysis using this

amplified gene as a probe showed multiple copies of NRPS in *Cylindrospermopsis raciborskii* SPC 338 culture. However, considering that SPC 338 is a mixed culture and not a clonal culture, it is not possible to associate all of these copies to one genome. The NRPS genes detected in *C. raciborskii* could have a role in the secondary metabolites synthesis, as for example PSP toxins.

The *C. raciborskii* SPC 338 culture and C10 strain were phenotypically characterized by toxins production analysis. The Sodium Channel Blocking (SCB) toxins of the SPC 338 culture were analysed from the culture supernatant using Mouse Neuroblastoma Assay (MNA), and in the cell fraction of the C10 strain using High-Performance Liquid Chromatography, with direct fluorescence detection (HPLC-FLD). The SCB toxins production was evaluated at 19 and 25°C detecting that toxins are stable in both temperatures and there is a major production at 19°C but in the other hand the biomass is three to four times lower than at 25°C. The concentration detected in the pellet (812,4 ng/mg) is four times bigger than in supernatant (195 ng/mg) indicating toxins intracellular accumulation. Toxins kinetic production evaluated by HPLC-FD allowed detecting STX analogues like GTX2, GTX3 and dc STX. The kinetic of toxin production at 19 °C suggests the biotransformation of STX into GTX2 and GTX3.

The results obtained in this thesis show that the level of intraheterogeneity of the 16S rDNA gene is to those observed between *C. raciborskii* strains. Furthermore, in this species exists several NRPS locus that could be implicated in secondary metabolites synthesis. The identification of some of the most potent PSP toxins in C10 strain and its

stability in culture medium suggest that control and detection of these species are necessary in the freshwater system.

## I. INTRODUCCION

### I.1. Antecedentes generales.

Los florecimientos de cianobacterias se han convertido en un problema en hábitats acuáticos alrededor del mundo, como lagos, ríos, estuarios, océanos y sistemas de almacenamiento de agua para consumo humano. Algunas especies de cianobacterias son capaces de producir toxinas y generar un florecimiento (“bloom”) por lo que resultan ser una amenaza para la salud humana y animal, el turismo y la recreación (Wilson y cols., 2000 y Carmichael y Li, 2006). Otros efectos menos nocivos de los florecimientos de cianobacterias son el aumento de la turbidez del agua, la disminución del oxígeno disponible y la emanación de olores desagradables. La causa de estos florecimientos es atribuible hoy en día a la eutroficación gradual de los cursos de agua producto de la actividad humana (Wilson y cols., 2000).

Las cianobacterias son un linaje perteneciente al dominio *eubacteria*, altamente heterogéneo y muy amplio. Hasta la fecha se han descrito alrededor de 1.000 especies que componen este linaje. Son organismos procariotes fotoautotróficos, poseen pigmentos accesorios a la clorofila (en este caso el tipo  $\alpha$ ) denominados ficocianina y ficoeritrina que le otorgan colores entre el rango del verde-oliva al rojo, característicos de este linaje. Las especies que poseen células diferenciadas denominadas heterocistos son capaces de fijar nitrógeno. En agua dulce, proliferan en aguas tibias, estancadas y de poca profundidad, como lagos y ríos eutróficos y también en aguas marinas eutróficas. Las cianobacterias se clasifican en base a las características morfológicas como cianobacterias unicelulares y filamentosas. Este linaje es reconocido por poseer una larga historia evolutiva y tanto geólogos como geoquímicos coinciden en que su origen

se extiende al menos a unos 3.500 millones de años hacia atrás, siendo incluso denominada la Era Proterozoica (entre 2.500-570 millones de años atrás) como la “Era de las Cianobacterias” por ser la era en que estas son más abundantes en el registro fósil (Schopf y Walter, 1982).

Una de las razones por las que las cianobacterias han sido capaces de colonizar hábitats diversos es su larga historia evolutiva, la que también le otorga una amplia diversidad ecológica. Pueden tolerar baja concentración de oxígeno (Stal, 2000), como también sulfuros libres (Padan y Cohen, 1982). Algunas cianobacterias son capaces de utilizar H<sub>2</sub>S (además de H<sub>2</sub>O) como dador de hidrógeno, una característica ausente incluso en algunas diatomeas capaces de tolerar concentraciones relativamente altas de H<sub>2</sub>S.

Otra propiedad que muestra la capacidad adaptativa de las cianobacterias es la facultad de algunas cepas de tolerar la radiación ultravioleta B y C, una propiedad muy importante en los tiempos tempranos de su evolución (Castenholz y Garcia-Piche, 2000). La temperatura máxima en la que se han detectado cianobacterias es 73°C, correspondiendo a *Synechococcus* en lagunas termales del oeste de Norteamérica (Ward y Castenholz., 2000). En relación a las células especializadas la presencia de heterocistos 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).

Se han descrito interacciones simbiotes entre cianobacterias y eucariontes como plantas y animales (Adams, 2000). Además las cianobacterias tienen un importante papel ecológico. Las especies marinas de los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus* dominan la fijación de carbono en los ecosistemas de océano-abierto, contribuyendo en



promedio entre el 32 y el 80% de la producción primaria de los océanos oligotróficos (Rocap y cols., 2002).

Existen también usos biotecnológicos de las cianobacterias, como es el caso de la *Arthrospira*, comúnmente denominada espirulina, que es ampliamente comercializada como un alimento nutritivo (Belay y cols., 1993). Otras especies de cianobacterias comercializadas por su uso como alimento nutritivo, corresponden a especies del género *Aphanizomenon*. (Whitton y Potts, 2000).

## **I.2. Cianobacterias como productoras de toxinas.**

Está descrito que todas las cianobacterias son capaces de producir metabolitos secundarios en grandes cantidades como antibióticos, supresores tumorales, toxinas, etc.

Las toxinas de cianobacterias son de una variada estructura química, como son los alcaloides, compuestos policetónicos y péptidos no ribosomales. Por lo tanto, esta es un área de interés para la investigación de nuevas rutas biosintéticas como así también una fuente promisoría para el desarrollo de nuevos fármacos, antibióticos, inmunosupresores y agentes antivirales.

Las toxinas de cianobacterias comprenden un amplio grupo de compuestos orgánicos cuyos efectos farmacológicos son muy diferentes entre sí. Básicamente estas toxinas pueden ser clasificadas de acuerdo a su blanco de acción en tres grupos (Tabla 1), hepatotoxinas, dermatotoxinas y neurotoxinas (Falconer, 1996). Entre las cianobacterias de agua dulce productoras de toxinas paralizantes se encuentran las especies: *Aphanizomenon flos-aquae* (Shimizu, 1996), *Cylindrospermopsis raciborskii* (Lagos y

cols., 1999), *Anabaena circinalis* (Baker y Humpage, 1994), *Lyngbia* (Carmichael y cols., 1997) y *Plankthotrix* (Pomati y cols., 2000).

Tabla 1. Toxinas producidas por cianobacterias.

Tipo de Toxina (según efecto farmacológico)	Especie	Toxina
Neurotoxina	<i>Aphanizomenon flos aquae</i>	saxitoxina y análogos (Carmichael, 1992)
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	saxitoxina y análogos (Lagos y cols., 1999)
	<i>Anabaena circinalis</i>	saxitoxina (Baker y Humpage, 1994)
	<i>Lyngbya wollei</i>	saxitoxina y análogos (Carmichael y cols., 1997)
	<i>Plankthotrix sp.</i>	saxitoxina (Pomati y cols., 2000)
	<i>Anabaena</i>	anatoxina (Mahmood y Carmichael, 1986)
	<i>Aphanizomenon</i>	anatoxina (Sivonen y Jones, 1999)
	<i>Trichodesmium</i>	alcaloide neurotóxico (Carmichael, 1992)
Hepatotoxina	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	cilindrospermopsina (Lagos y cols., 1999)
	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	cilindrospermopsina (Carmichael, 1992)
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	microcistina (Krishnamurty y cols., 1986)
	<i>Nodularia spumigena</i>	nodularina (Rinehart y cols., 1994)

### **I.3. *Cylindrospermopsis raciborskii*, una especie productora de hepatotoxinas y toxinas paralizantes.**

*Cylindrospermopsis raciborskii* (Fig. 1) es una especie de agua dulce capaz de producir toxinas. Esta especie perteneciente al orden *Nostocales*, es de tipo filamentoso y fijadora de nitrógeno.

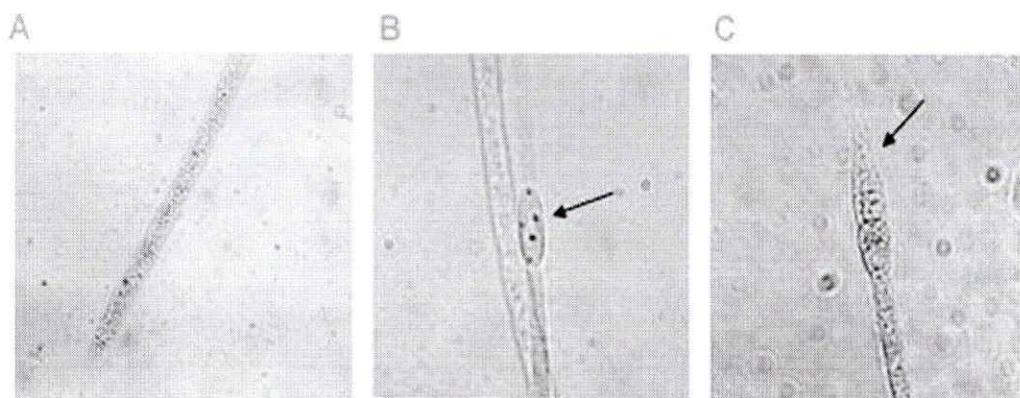


Figura 1. Microscopía óptica de filamentos de la cepa *Cylindrospermopsis raciborskii* C10 aislada de la represa de Billings en Sao Paulo, Brasil.  
**A.** Tricoma recto en estado vegetativo. **B.** Tricoma con un aquinete único oval (flecha). **C.** Tricoma con un heterocisto apical característico (flecha).

Las características que definen al orden *Nostocales* son: división binaria en un plano dando origen a tricomas; una o más células por tricoma que pueden transformarse en heterocistos al menos cuando la concentración de nitrógeno es baja; y en algunos casos producción de células especializadas (aquinetes), resistentes a la desecación y a bajas temperaturas, que en especies de este orden se desarrollan entre dos heterocistos (Castenholz y Waterbury, 1989).

La primer descripción de la especie *C. raciborskii* fue realizada por Seenayya y Subba Raju (Seenayya y Subba Raju, 1972). Inicialmente la especie fue asignada al género *Anabaenopsis* denominándola *A. raciborskii* (Woloszynska), sin embargo debido a que esta cianobacteria presentaba un patrón de formación de heterocistos levemente diferente y similar al del género *Cylindrospermum* la especie fue excluida del género. En base a lo anterior se propuso el género *Cylindrospermopsis*. Posteriormente Horecká y Komareck, también en 1979, avalaron esta determinación al poder diferenciar entre los géneros

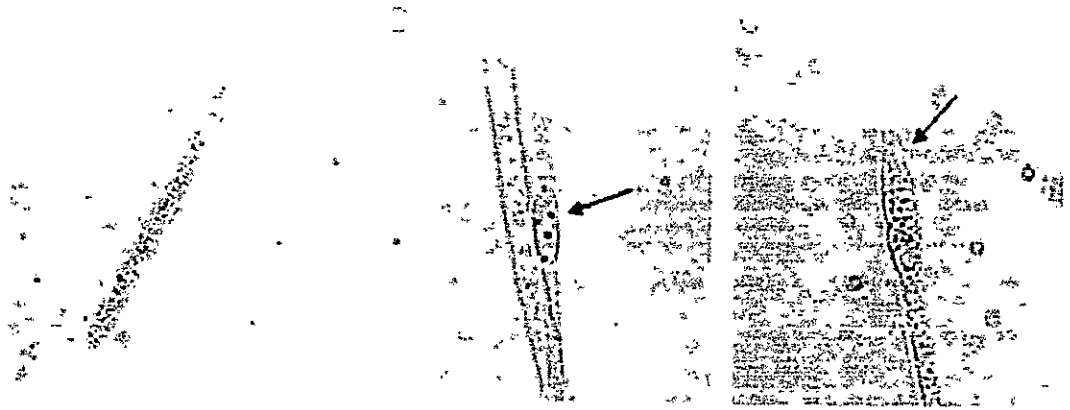


Figura 1. Microscopía óptica de filamentos de la cepa *Cylandrospermopsis raciborskii* C10 aislada de la represa de Billings en Sao Paulo, Brasil.  
 A. Tricoma recto en estado vegetativo. B. Tricoma con un aquinete único oval (flecha). C. Tricoma con un heterocisto apical característico (flecha).

Las características que definen al orden *Nostocales* son: división binaria en un plano dando origen a tricomas; una o más células por tricoma que pueden transformarse en heterocistos al menos cuando la concentración de nitrógeno es baja; y en algunos casos producción de células especializadas (aquinetes), resistentes a la desecación y a bajas temperaturas, que en especies de este orden se desarrollan entre dos heterocistos (Castenholz y Waterbury, 1989).

La primer descripción de la especie *C. raciborskii* fue realizada por Seenayya y Subba Raju (Seenayya y Subba Raju, 1972). Inicialmente la especie fue asignada al género *Anabaenopsis* denominándola *A. raciborskii* (Woloszynska), sin embargo debido a que esta cianobacteria presentaba un patrón de formación de heterocistos levemente diferente y similar al del género *Cylandrospermum* la especie fue excluida del género. En base a lo anterior se propuso el género *Cylandrospermopsis*. Posteriormente Horecká y Komareck, también en 1979, avalaron esta determinación al poder diferenciar entre los géneros

*Cylindrospermum* y *Cylindrospermopsis* por la presencia en este último de vacuolas de gas, tricomas atenuados en los extremos, una a tres células vegetativas entre los heterocistos terminales y la presencia de aquinetes.

*C. raciborskii* fue descrita originalmente como un microorganismo tropical (Woloszynska, 1912) sin embargo existen publicaciones recientes que describen la presencia de este organismo en regiones templadas de Europa, Australia y América (Castro y cols., 2004 y Gugger y cols., 2005).

En el año 1979 en Palm Island Australia, *C. raciborskii* fue el causante indirecto de la hospitalización de 148 personas con síntomas similares a la hepatitis, a causa del envenenamiento por la ingestión de agua contaminada con la hepatotoxina cilindropermopsina (CYL) (Byth, 1980). Este evento se produjo a causa del tratamiento con sulfato de cobre para eliminar las cianobacterias de un reservorio para el suministro de agua. Este tratamiento causó la lisis celular de las cianobacterias y la liberación de toxinas al medio.

A la fecha se han descrito dos tipos morfológicos de la cianobacteria *C. raciborskii*: morfotipos de tricoma curvo y recto (Saker y cols., 1999). Estos morfotipos fueron aislados en el dique Solomon en Queensland, Australia y fueron descritos como productores de la hepatotoxina CYL. Sin embargo, entre aislados de *C. raciborskii* obtenidos de distintas regiones del norte de Australia fueron descritas cepas no tóxicas entre las que se encontraban ambos morfotipos, por lo que la toxicidad de una cepa no está correlacionada con un morfotipo particular (Schembri y cols., 2001). Si bien las características morfológicas diferencian notoriamente un aislado de tricoma curvo de uno recto, la producción de CYL descrita en aislados de ambos morfotipos (expresada

como porcentaje del peso seco) es muy similar, oscilando entre un rango de 0,14 a 0,20%, dependiendo de la fuente de nitrógeno proporcionada en el medio de cultivo (Saker y cols., 1999). La secuenciación del gen 16S rDNA de los aislados mostró que ambos morfotipos poseen una relación genotípica muy cercana ya que el porcentaje de identidad entre estos fue del 99,8% (Saker y cols., 1999).

En el trabajo de Saker y Neilan (2001), aislados australianos de *C. raciborskii* productores de CYL entre los que se encontraban los dos morfotipos descritos, mostraron que al ser sometidos a distintas condiciones de cultivo experimentaron cambios morfológicos y fisiológicos. Estos aislados mostraron variación en la longitud de las células vegetativas y número de heterocistos en respuesta al suplemento de  $\text{NH}_4^+$  en el medio de cultivo. También presentaron variación en el nivel de producción de CYL, en respuesta a la ausencia de una fuente de nitrógeno. La temperatura de cultivo también afecta la producción de CYL (Saker y cols., 2000). Lo anterior indica una cierta plasticidad tanto en la morfología como fisiología de esta especie.

En el año 1996 en Caruaru Estado de Sao Paulo Brasil, fue descrito un evento de intoxicación por agua dulce en un centro de hemodiálisis, que produjo la muerte de 70 personas a causa de una falla hepática aguda (Azevedo, 1996; Carmichael, 1996). Todas las evidencias acumuladas apoyan la hipótesis que toxinas producidas por cianobacterias fueron la causa de muerte, ya que los florecimientos cianobacterianos habían sido descritos con anterioridad en reservorios de agua dulce en Brasil.

Se han descrito hasta la fecha solo tres aislados, obtenidos en Brasil, productores de la neurotoxina saxitoxina (STX) y algunos de sus análogos (Lagos y cols., 1999). Estos aislados no producen CYL. El aislado denominado T1 fue obtenido de una granja

privada en la ciudad de Amparo en 1994, los otros dos aislados (denominados T2 y T3) fueron obtenidos en el reservorio de agua dulce de Billings denominado Taquacetuba en el año 1996. Las características morfológicas descritas para los tres aislados coinciden con el morfotipo de tricoma recto.

Las caracterizaciones realizadas en aislados australianos y brasileños de la especie *C. raciborskii* basadas en características morfológicas y fisiológicas, como es el morfotipo de tricoma y producción de toxinas, indican que esta especie es altamente heterogénea respecto de su fenotipo. Sin embargo, las cepas descritas tienen una estrecha relación filogenética, las similitudes del 16S rDNA entre los distintos aislados son cercanas al 100%. Existen 62 cepas descritas de *C. raciborskii* originarias de distintas regiones del mundo (Neilan y cols., 2003; Chonudomkul y cols., 2004; Briand. y cols., 2004).

#### **I.4. Péptido sintetetasas no ribosomales (NRPS, non ribosomal peptide synthetase) y su participación en producción de metabolitos secundarios en cianobacterias.**

El estudio de las NRPS en cianobacterias se inició con la identificación de genes tipo NRPS codificantes para microcistina. Esta hepatotoxina, es un heptapéptido cíclico del que se conocen 65 isoformas que varían entre si según el grado de metilación, epimerización, secuencia peptídica y toxicidad (Rinehart y cols.; 1994; Sivonen, 1996).

Esta clase de toxinas son potentes inhibidores de proteínas fosfatasas eucarióticas de tipo I y IIA. El estudio de Lankoff y cols. (2003), demostró la actividad promotora tumoral de la microcistina-LR al evidenciar la inducción de apoptosis y necrosis en células CHO-K1 (células de ovario de hamster chino). Como otros péptidos de pequeño tamaño con aminoácidos poco comunes, las microcistinas son sintetizadas no ribosomalmente

por parte de complejos modulares multienzimáticos citoplasmáticos conocidos como péptidos sintetasa no ribosomales (NRPS). Neilan y cols. en el año 1996 identificaron los genes que codifican para NRPS en el género *Microcystis* y observaron la misma estructura modular descrita para NRPS encontrados en otras especies de hongos y bacterias productoras de microcistina (Dittmann y cols., 1996).

La estructura modular de las enzimas NRPS ha mostrado ser responsable de la elongación específica de cadenas peptídicas. La combinación específica de los módulos obtenidos y la presencia de varios dominios funcionales dentro de las NRPS determinan la estructura y la actividad del producto peptídico.

Han sido descritos dos posibles organizaciones de un gen NRPS: los módulos de tipo 1 y 2. Los dominios funcionales de un módulo tipo 1 (Fig. 2) incluyen al dominio de condensación, acil-adenilación específica del aminoácido, tioesterificación y posible epimerización.

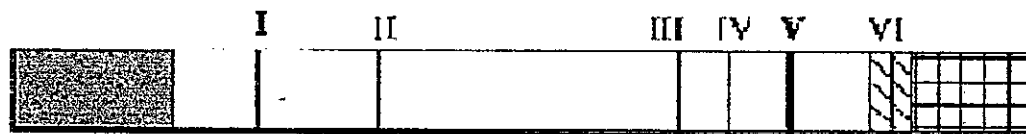


Figura 2. Diagrama que muestra la estructura modular del gen que codifica para un módulo tipo 1 de péptido sintetasa. ■: condensación, □: acil-adenilación, ▨: epimerización, ▩: tioesterificación. Los motivos conservados del gen se muestran con números romanos (I a VI).

Un módulo tipo 2 puede contener un dominio adicional de metiltransferasa entre las regiones de acil-adenilación y tioesterificación (Neilan y cols., 1999). La participación de genes tipo NRPS en la síntesis de microcistina se determinó mediante disrupción con



un gen de resistencia a antibiótico en la cepa hepatotóxica *Microcystis aeruginosa* PCC7806, comprobando que la mutación de estos genes conduce a la transformación de esta bacteria a un estado no tóxico. Pudiendo por lo tanto identificarse el gen codificante para microcistina sintetasa. (Dittmann y cols., 1997). En trabajos posteriores se logró dilucidar el cluster genético completo de microcistina sintetasa como también la ruta biosintética de producción de la toxina usando disrupción genética. Se determinó que el cluster genético tipo NRPS de microcistina sintetasa está compuesto por 7 genes y 33 dominios, cada uno encargado de la activación o modificación de los aminoácidos constituyentes de la molécula toxigénica.

Las policétido sintetetas son complejos modulares que participan en la biosíntesis de policétidos mediante la condensación repetida de monómeros de acetato o propionato en una forma similar a la biosíntesis de ácidos grasos (Hopwood y Sherman, 1990). Estos compuestos comprenden un amplio y diverso grupo de metabolitos secundarios y son sintetizados por bacterias, hongos y plantas teniendo un gran espectro de actividades biológicas y aplicaciones médicas (Katz y Donadio, 1993). Estos incluyen agentes antitumorales como la daunorubicina, antibióticos como la eritromicina y tetraciclina, inmunosupresores como el macrólido FK506 y compuestos con actividad micotóxica como aflatoxinas, ochratoxinas, ergochromos, patulina, etc.

#### **I.5. Toxinas Paralizantes.**

La neurotoxina STX y sus análogos son producidos por dinoflagelados marinos y además por varias especies de cianobacterias (Tabla 1). La STX fue aislada por primera vez del bivalvo *Saxidomus giganteus*, del cual derivó su nombre. Se describió su

presencia por primera vez en cultivos del dinoflagelado *Alexandrium catenella* (Schantz y cols., 1975; Sommer y cols., 1937).

Los bivalvos filtradores que se alimentan por filtración de aquellos organismos presentes en el plancton pueden contaminarse a través de la ingestión de dinoflagelados tóxicos.

Los moluscos pueden ser consumidos por el ser humano provocando el síndrome de envenenamiento (PSP, paralytic shellfish poisoning) por veneno paralizante de mariscos (VPM), y en algunos casos la muerte, la que generalmente ocurre por fallas respiratorias.

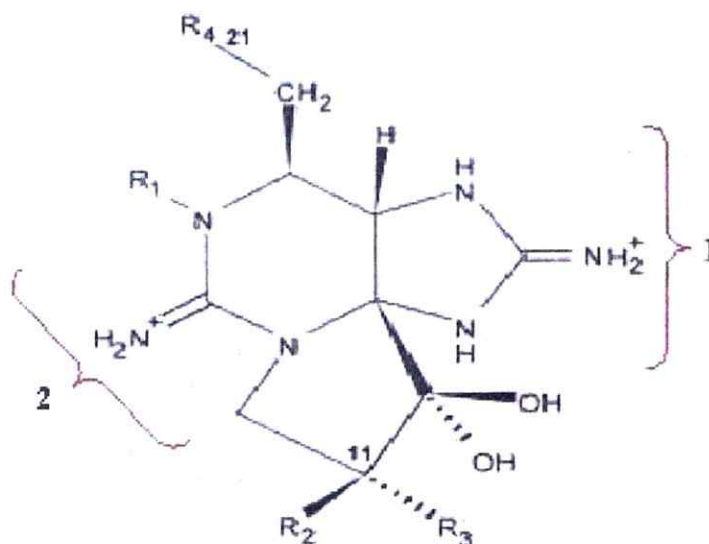
Las toxinas paralizantes, también conocidas como VPM, son un problema de salud a nivel mundial además de generar grandes pérdidas económicas para los países afectados.

STX y sus análogos, junto con la tetrodotoxina y sus análogos también son denominadas toxinas bloqueadoras del canal de sodio voltaje dependiente (sodium channel blocking, SCB) ya que bloquean el flujo de iones sodio hacia el interior de las células, impidiendo la transmisión del impulso nervioso y generando parálisis muscular (Gallacher y Birkberk, 1992).

La estructura básica de la STX es un esqueleto de tetrahidropurina con dos grupos guanidinio (Fig. 3). Las toxinas paralizantes del tipo STX y sus análogos se ordenan en tres grupos principales: i) el grupo carbamato o carbamoil, que comprenden a STX, neoSTX, GTX1-4; ii) del grupo N-sulfocarbamoil y sus derivados, que comprenden a GTX5, GTX6, y C1-4; iii) del grupo decarbamoil (dc GTX2, dc GTX3). Las sustituciones que tenga la estructura base afectan y determinan la potencia individual de cada una de ellas, ya que se altera en la afinidad de unión específica al canal de sodio. Las toxinas del tipo carbamato (STX, neoSTX, GTX1-4) son los análogos más tóxicos (Lehane, 2000).

## I.6. Biosíntesis de STX.

La vía biosintética de la STX aún se desconoce, y hasta ahora no hay ningún gen que se haya podido asociar con esta ruta, sin embargo se han realizado algunas aproximaciones a su dilucidación, por síntesis química y por experimentos usando precursores marcados radioactivamente.



### Toxinas

#### Carbamato

	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	CONH <sub>2</sub>
NEO	OH	H	H	CONH <sub>2</sub>
GTX 1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>
GTX 2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>
GTX 3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>
GTX 4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>

#### N-Sulfocarbamoyl

GTX 5	H	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C2	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C3	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

#### Decarbamoyl

dcGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
dcGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H

Figura 3. Estructura de la STX y sus análogos. Los motivos guanidínios se muestran resaltados con una llave. R1, R2, R3 y R4 son los sustituyentes de la estructura básica de la STX. Figura modificada de Shimizu, 1996.

Estos últimos se han realizado en el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* y en la cianobacteria *Aphanizomenon flos-aquae*, obteniéndose resultados muy similares para ambas especies a partir de los cuales se propuso un modelo de ruta biosintética posible (Fig. 4) (Shimizu y cols., 1996). Este modelo propone que la molécula es sintetizada a partir de tres moléculas de arginina, una molécula de metionina y una molécula de acetato (Fig. 5).

Considerando los elementos comentados anteriormente respecto a la biosíntesis de las microcistinas, otras toxinas de cianobacterias cuyos precursores también son aminoácidos, se discutirán los antecedentes que permitan asociar algunos genes a la síntesis de STX.

Los estudios relativos a *C. raciborskii* indican que existen aislados productores de STX, o de CYL, o no productores, pero no hay descripciones de aislados que produzcan STX y CYL, (Lagos, 1999; Schembri, 2001). *C. raciborskii*, clásicamente productora de CYL, fue usada como blanco de estudio por Schembri y cols. (2001). Estos investigadores obtuvieron cepas productoras y no productoras de CYL entre 13 aislados de *C. raciborskii* de distintas regiones del norte de Australia. El análisis genético de estos aislados de *C. raciborskii* mediante PCR verificó la presencia simultánea de los genes tipo NRPS y policétido sintasa (PKS) solo en las cepas productoras de CYL, evidenciando que en la síntesis de CYL existe una correlación entre la presencia de estos dos tipos de genes codificantes de enzimas NRPS y PKS.

Estudios con precursores marcados han demostrado que CYL también es sintetizada a partir de un aminoácido, arginina, al igual que la STX (Shimizu, 1996).

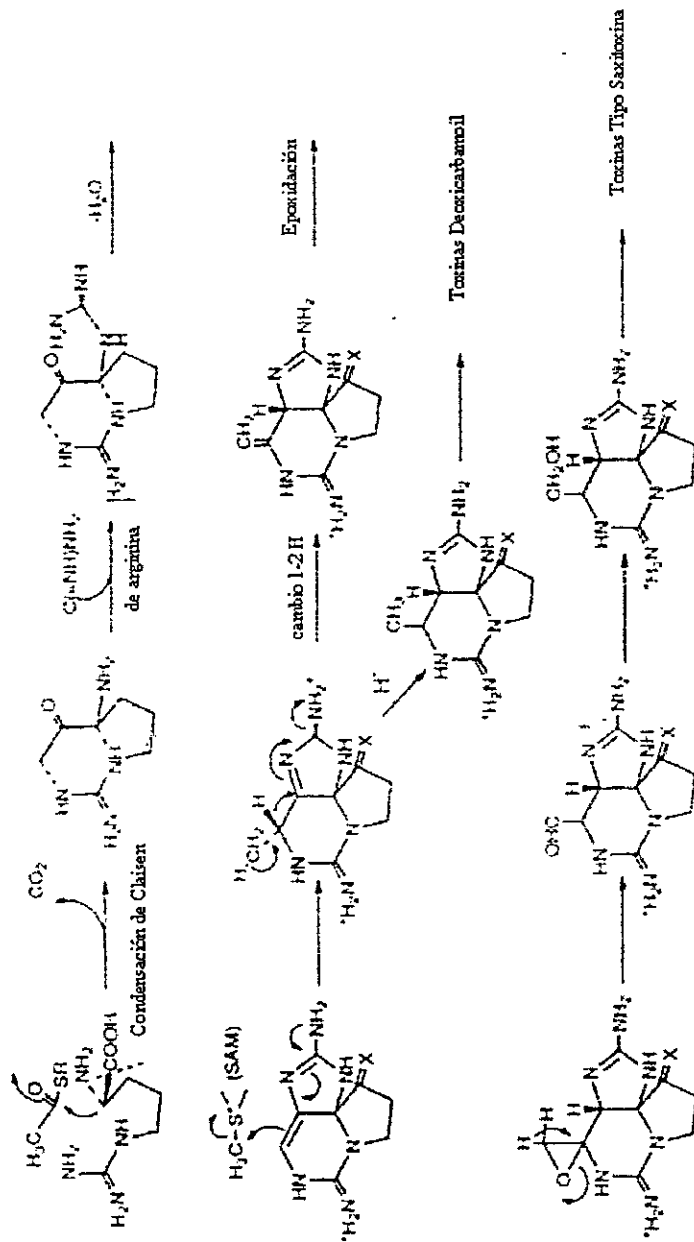


Figura 4. Ruta biosintética teórica de la STX, como resultado de experimentos usando precursores radioactivos tanto en dinoflagelados como en cianobacterias (Shimizu, 1996).

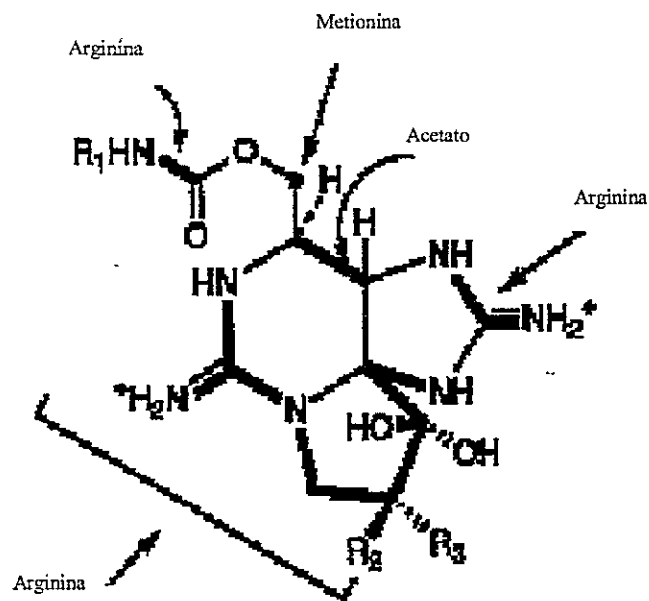


Figura 5. Origen químico de la estructura de STX (Shimizu, 1996).

Recientemente, fue clonado y secuenciado el segmento génico responsable de la biosíntesis de CYL en *C. raciborskii* (Kellmann y cols., 2006). Tres tipos de genes estarían participando en la síntesis de CYL, codificantes para: una amidinotransferasa, una péptido sintetasa no ribosomal y una policétido sintetasa.

## II. HIPOTESIS

La cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*, productora de saxitoxina, puede constituir un modelo para obtener evidencias concretas sobre la síntesis de saxitoxina, los genes involucrados en la misma y su relación evolutiva con otros organismos productores.

## III. OBJETIVOS

### III.1. Objetivo General.

Caracterizar genotípicamente y fenotípicamente la cianobacteria productora de toxinas paralizantes *Cylindrospermopsis raciborskii*.

### III.2. Objetivos Específicos.

1. Desarrollar un protocolo para lograr axenicidad del cultivo.
2. Verificar que el cultivo *C. raciborskii* SPC 338 obtenido desde Brasil corresponda a un cultivo clonal. Si no fuera clonal, realizar la obtención de un cultivo clonal.
3. Caracterizar genéticamente una cepa de *C. raciborskii*, en lo que se refiere al análisis de la secuencia de gen 16S rDNA y detección y secuenciación de genes codificantes para péptido sintetasas no ribosomales.
4. Establecer las relaciones filogenéticas entre la cepa de *C. raciborskii* seleccionada a través del análisis del gen 16S rDNA y su comparación con secuencias existentes en las bases de datos.
5. Caracterizar fenotípicamente una cepa de *C. raciborskii*, en lo que se refiere a sus propiedades más relevantes, esto es evaluar la producción de toxinas por análisis cromatográfico del tipo HPLC con derivatización post-columna.

6. Evaluar como influye la temperatura de cultivo en la síntesis de STX y sus análogos por *C. raciborskii*.



## IV. METODOLOGIA

### IV.1. Cultivo de *C. raciborskii*.

#### IV.1.1. Obtención del cultivo *C. raciborskii* SPC 338.

El cultivo *C. raciborskii* SPC 338 fue obtenido durante un evento de florecimiento algal ocurrido en la represa de Billings en Sao Paulo Brasil. Este cultivo fue enviado a la Dra. Mónica Vásquez por la Dra. Maria Teresa de Paiva a solicitud del Dr. Pedro Zagatto, quien fue el primero en describir la presencia de este tipo de especies en Brasil (Lagos, 1999).

*C. raciborskii* SPC 338 fue cultivado en medio MLA (Tabla 2) en diferentes condiciones de cultivo.

#### IV.1.2. Condiciones de cultivo de *C. raciborskii* SPC 338

El cultivo *C. raciborskii* SPC 338 fue mantenido en medio líquido usando el medio MLA descrito por CSIRO Marine Research para cianobacterias. Se realizaron cultivos de 200 ml en matraces de vidrio, usando como inóculo un décimo de volumen de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento (25 días). Los cultivos fueron mantenidos en un incubador con luz fluorescente blanca ( $40 \mu\text{E s}/\text{m}^2$ ) con un ciclo luz-oscuridad de 12 h:12 h, a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) o a 19°C en incubador según correspondiese, todos ellos sin agitación. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de petri con agarosa 0,4% (Ferris y Hirsch, 1991) preparada con medio MLA. El inóculo fue mezclado con 3 ml de agarosa 0,2% en MLA casi a temperatura de solidificación e incubado por una semana en las mismas condiciones descritas para cultivos líquidos, hasta aparición de colonias.

Tabla 2. Medio MLA

Componente	Concentración (g/l)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,9.10 <sup>-2</sup>
NaNO <sub>3</sub>	1,7.10 <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,5.10 <sup>-2</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,3.10 <sup>-3</sup>
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1,3.10 <sup>-6</sup>
Biotina	1,3.10 <sup>-5</sup>
Vitamina B12	1,3.10 <sup>-5</sup>
Tiamina HCl	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA	4,4.10 <sup>-3</sup>
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,6.10 <sup>-3</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	6,0.10 <sup>-4</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3,6.10 <sup>-4</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,0.10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,2.10 <sup>-3</sup>
COCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	1,0.10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	6,0.10 <sup>-4</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	6,7.10 <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,7.10 <sup>-2</sup>

#### IV.2. Axenicidad de *C. raciborskii* SPC 338.

Se diseñó el siguiente protocolo de lavado del cultivo: un cultivo de 200 ml de *C. raciborskii* en fase estacionaria fue filtrado usando una membrana de nitrocelulosa de 3 µm de diámetro de poro y luego lavado con agitación con abundante agua destilada estéril. El filtro se reemplazó después de estos 2 lavados y se repitió el lavado y la filtración. Finalmente las células que quedaron adheridas al último filtro fueron

resuspendidas en 1 ml.(por cada 100 ml de cultivo) de agua bidestilada estéril. Se trabajó en esterilidad impidiendo la contaminación del cultivo con otros microorganismos.

#### **IV.2.1. Tinción de bacterias con naranja de acridina y recuento mediante microscopia de epifluorescencia.**

Alicuotas de 500 µl de un cultivo de *C. raciborskii* se filtraron en una unidad de filtración de vidrio con filtros de policarbonato teñidos con Negro de Sudán, de acuerdo a lo ya descrito (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.

#### **IV.3. Análisis de la naturaleza clonal del cultivo SPC 338.**

##### **IV.3.1. Protocolo de extracción de DNA genómico desde *C. raciborskii* SPC 338:**

##### **Método del etil-xantogenato de potasio (Tillet y Neilan, 2000).**

Brevemente, este método consistió en crecer las células de *C. raciborskii* por 20 a 30 días, lavarlas como se describió anteriormente y colectarlas mediante centrifugación a 13.100 x g durante 15 min. El pellet se resuspendió en 500 µl de solución TER (10 mM TrisHCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8; 100 µg/ml RNAasa A),y esto fue traspasado a un tubo cónico de 15 ml. Lo anterior fue tratado con 7,5 ml de buffer XS (1 % etil-xantogenato de potasio, Fluka™, Buchs, Switzerland; 100 mM TrisHCl, pH 7,4; 20 mM EDTA,pH:8; 1 % sodium dodecilsulfato) fresco homogenizando suavemente. Se incubó durante 2 h en baño termostático a 70°C y luego se trató con vortex 10 s. Lo anterior

se incubó en hielo durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 11.180 x g durante 40 min para remover el debris celular. El sobrenadante fue retirado y el DNA fue precipitado con 5 ml de isopropanol incubando a -20°C toda la noche. El DNA fue colectado centrifugando a 10.000 x g por 40 min a 4°C, secado al aire y finalmente resuspendido en 150 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ. Se verificó la calidad y se cuantificó el DNA genómico mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v), tinción con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y comparación con marcador de peso molecular (DNA de Lambda digerido con *Hind* III).

#### **IV.3.2. Amplificación, clonamiento, y análisis de los clones mediante ARDRA (amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis) y secuenciación del gen 16S rRNA de *C. raciborskii* SPC 338.**

El DNA genómico fue obtenido mediante el tratamiento del pellet de cultivo con una solución de lisis (25% sucrosa, 50 mM TrisHCL, 100 mM EDTA) y posteriormente con lisozima (5 mg/ml), SDS (1%), proteinasa K (100 µg/ml) y RNAasa (10 µg/ml). Lo obtenido fue tratado dos veces con 1 volumen de fenol y una vez con 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico. El DNA fue precipitado con etanol absoluto y lavado con etanol al 70% (Espejo y Romero, 1997). Nótese que en esta etapa no se utilizó el método del xantogenato para realizar extracción de DNA.

El gen del 16S rRNA fue amplificado mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) usando 1-5 ng de DNA genómico. Se usaron los partidores 27F y 1492R descritos por Lane y cols., 1985 (Tabla 3).

Tabla 3. Información de los partidores

Partidor	Secuencia	Referencia
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	DeLong, 1992
1492R	5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'	DeLong, 1992
M13r	5'-CACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'	Messing, 1983
M13f	5'-GACGTTGTAACGACGGCCAG-3'	Messing, 1983
MTR	5'-CCNCG(A/G/T)AT(T/C)TTNAC(T/C)TG-3'	Neilan y cols., 1999
MTF	5'-GCNCG(C/T)GG(C/T)GCNTA(C/T)GTNCC-3'	Neilan y cols., 1999
L1	5'-CAAGGCATCCACGT-3'	Jensen y cols., 1993
G1	5'-GAAGTCGTAACAAGG-3'	Jensen y cols., 1993.

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 3 min, 58°C 6 min, 72°C 90 s; un segundo ciclo de 95°C 90 s, 58°C 3 min y 72°C 90 s; 30 ciclos a 95°C 90 s, 58°C 90 s, 72°C 90 s; un ciclo final a 95°C 90 s, 58°C 90 s y 72°C 5 min.

El producto de la amplificación de 1,4 Kb, fue purificado desde gel de agarosa mediante GeneClean™ siguiendo las instrucciones del fabricante, luego clonado usando el vector del kit pGEM-T Easy™ (Anexos), según instrucciones del fabricante usando la cepa receptora *E. coli* XL1 Blue.

Previo a la electroporación, se procedió a precipitar la mezcla de ligación. Para ello se agregó 30 µl de H<sub>2</sub>O, 400 µl de butanol y luego se agitó en vortex durante 10 s a alta velocidad. Se centrifugó durante 5 min a 15.000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se secó totalmente por vacío. Para la electroporación, las células de *E. coli* XL1 Blue fueron crecidas en un volumen de 3 ml de LB hasta fase logarítmica en baño

termorregulado a 37°C. A una alícuota de 1 ml de cultivo de *E. coli* se le realizó 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril y fría, centrifugando a 10.000 rpm durante 2 min y resuspendiendo cada vez en 500 µl de agua estéril fría. Finalmente, todo el pellet se resuspendió en 45 µl aproximadamente de H<sub>2</sub>O estéril. La mezcla de ligación se adicionó a la suspensión bacteriana y se depositó en una cubeta de electroporación estéril y fría. La electroporación se llevó a cabo usando un electroporador BioRad™, con una cubeta de gap de 0,1 cm, 200 Ω de resistencia, 25 µD de capacitancia y aplicando 1,8 V.

Las bacterias electroporadas fueron incubadas en 750 µl de medio SOC a 37°C en baño termorregulado con agitación durante 30 min. La selección de los clones fue hecha en placas LB agar Ampicilina (100 µg/ml), a las que se les agregó superficialmente 20 µl de IPTG (20 mg/ml) y 50 µl de X-gal (20 mg/ml), se realizaron placas en duplicado plaqueando un volumen de 25, 50, 100 y 250 µl del producto de electroporación. Se incubó en estufa a 37°C toda la noche.

La extracción de DNA plasmidial para identificar los clones se realizó siguiendo el protocolo de lisis alcalina descrito en Sambrook y cols. (1989). El DNA plasmidial fue visualizado en electroforesis en gel de agarosa al 1% usando la tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y luz U.V.

El gen de 16S rDNA clonado fue amplificado desde el DNA plasmidial extraído de cada clon usando los primers 27F y 1492R (Tabla 3).

Las digestiones fueron hechas con la enzima de restricción *TaqI* (Qiagen™, Hilden, Germany) en un volumen de reacción de 30 µl usando por cada µg de DNA 2,5 unidades

de enzima, incubadas a 37°C durante 8 h. Los productos de digestión fueron observados en electroforesis en gel de agarosa 3% (p/v) y tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Los amplificadores con patrones de restricción diferentes fueron purificados y secuenciados en forma automática en un equipo Modelo Applied Biosystem 373<sup>a</sup>, utilizando los partidores descritos por Lane (1991).

Medio de cultivo Luria Bertrani (LB) para *E. coli* (1 l).

Se pesó 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl y enrasó a 1 l con agua destilada. Se agitó y autoclavó.

Medio de cultivo S.O.C para electroporación de *E. coli* (1 l).

A 950 ml de agua destilada se agregó 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl. Se autoclavó, enfrió, y luego incorporó 20 ml de una solución 1M de glucosa estéril.

#### **IV.3.3. Generación de cultivos clonales.**

Desde el cultivo de *C. raciborskii* SPC 338 se tomaron tricomas individuales bajo el microscopio y fueron cultivados en placas de 24 pocillos, con 1 ml de medio MLA condicionado en cada uno. El medio condicionado resulta de una dilución 1/10 de medio de cultivo filtrado, en medio de cultivo MLA fresco. Bajo el microscopio fueron identificados e individualizados los pocillos que presentaron un solo tricoma. Se individualizaron 30 pocillos en total. Cada pocillo seleccionado de la placa fue seguido

día a día rigurosamente hasta que el tricoma presentó un crecimiento evidente a la vista. En este momento el tricoma fue trasladado a un tubo de ensayo en un volumen de medio MLA condicionado de 5 ml. En esta etapa se realizó la amplificación del 16S rDNA por duplicado a partir de una célula individual (para esto se agregó al programa de PCR una etapa de lisis a 90°C, previa a la amplificación). El producto de amplificación fue digerido con *EcoRI* siguiendo con el procedimiento descrito anteriormente y visualizado en gel agarosa al 3% p/v. Se identificaron dos patrones de restricción diferentes. El patrón 10 fue individualizado e identificado como el cultivo C10.

Se aisló el cultivo C10 que posee características morfológicas idénticas a las descritas para el cultivo SPC 338.

#### **IV.4. Caracterización genotípica del cultivo C10.**

##### **IV.4.1. Amplificación, clonamiento, y análisis de los clones mediante ARDRA y secuenciación del gen 16S rRNA de *C. raciborskii* C10.**

Las diferencias en el procedimiento de amplificación, clonamiento, digestión y secuenciación del 16S rDNA del cultivo C10 se mencionan a continuación. Posteriormente al clonamiento del 16S rDNA desde la cepa C10 los clones fueron analizados mediante la amplificación por PCR directamente desde colonias. Para realizar esta amplificación se resuspendió una colonia en 100 µl de TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) y se hirvió durante 10 min 1 µl del lisado se utilizó en una reacción de amplificación usando los partidores M13f y M13r. El análisis de los amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y tinción con nitrato de



plata (Espejo y Escanilla, 1993). Todo el volumen de la reacción de amplificación fue digerida usando la enzima de restricción *EcoRI* siguiendo el protocolo ya descrito anteriormente. Cada patrón de restricción diferente se reamplificó usando los partidores para 16S rDNA y purificó mediante GeneClean™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Fueron secuenciadas ambas hebras utilizando los partidores M13f, f357, r518, f945, r1087, r1389 y M13r cuya información se describe en Lane y cols. (1991) (Tabla 3).

#### **IV.4.2. Alineamiento del 16S rDNA de SPC 338 y C10 con el 16S rDNA de *Anacystis nidulans* 6301 (*Synechococcus* sp. strain PCC 6301).**

Se realizó el alineamiento de las secuencias de los 16S rDNA provenientes de los clones 4 y 9, obtenidos desde el cultivo SPC 338, y 24 y 41 obtenidos de C10. Se utilizó el programa ClustalW (Thompson y cols., 1994).

#### **IV.4.3. Detección de un gen tipo Péptido Sintetasa no Ribosomal (NRPS, non ribosomal peptide synthetase) en *C. raciborskii* SPC 338.**

##### **IV.4.3.1. Amplificación, clonamiento, análisis de restricción y secuenciación de genes tipo NRPS.**

A partir de DNA genómico de *C. raciborskii* SPC 338 obtenido mediante el método del etil-xantogenato de potasio se llevó a cabo una reacción de amplificación utilizando los partidores degenerados MTR y MTF (Tabla 3) (Neilan y cols., 1999) para el gen péptido sintetasa. Las condiciones de amplificación debieron ser optimizadas para la utilización

de estos partidores, el programa optimizado de amplificación se describe a continuación:  
1 paso a 96°C por 5 min, 35 ciclos de: 94°C por 1 min, 57°C por 90 s, 72°C por 10 min  
y un paso final a 72°C por 10 min.

Los amplificados fueron purificados desde un gel de agarosa mediante Wizard™ (Promega) y clonado en el vector plasmidial pGEM-T Easy™ (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando como cepa receptora *E. coli* XL1 Blue. Los clones obtenidos fueron analizados mediante amplificación usando los partidores del vector M13f y M13r y posterior digestión con la enzima *Hae*III (Gibco BRL, Eggenstein, Germany).

#### **IV.4.3.2. Ensayo de hibridación en membrana.**

El procedimiento de hibridación en membrana se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Sambrook y cols. (1989). Se usó para marcar la sonda el PCR DIG Probe Synthesis Kit™(Roche) usando el sistema de revelado recomendado por el fabricante y detección por autoradiografía.

#### **IV.5. Análisis filogenético de aislados de distinto origen geográfico de *C. raciborskii* mediante alineamiento del 16S rDNA.**

El alineamiento múltiple se llevó a cabo mediante ClustalW (Thompson y cols., 1994), el cálculo de distancia genética fue realizado mediante el método de Kimura y el árbol fue obtenido con el método de "Neighbour Joining" ("agrupando vecinos"), con un "bootstrapping" de 1.000.

#### **IV.6. Caracterización fenotípica de *C. raciborskii*.**

**IV.6.1. Detección e identificación de toxinas SCBs en la fracción celular de cultivo de *C. raciborskii* C10 mediante HPLC- FLD y oxidación post-columna (High Performance Liquid Chromatography and on-line Fluorescence Detection).**

##### **IV.6.1.1. Obtención y tratamiento de las muestras de cultivo de *C. raciborskii* C10.**

Para caracterizar la producción de toxinas SCBs por la cianobacteria en la fracción celular se utilizó como método el HPLC-FLD (Oshima, 1995) con algunas modificaciones.

Se obtuvo un volumen de cultivo de *C. raciborskii* C10 de 1 ml el cual fue centrifugado a 13.100 x g durante 15 min, para obtener la fracción celular y el sobrenadante por separado.

Los pellets de cultivo obtenidos fueron liofilizados en un "SpeedVac" y luego secados en estufa a 60 °C hasta obtener peso constante. Finalmente los pellets fueron pesados en balanza analítica.

##### **IV.6.1.2. Extracción ácida de toxinas de la fracción celular de un cultivo de *C. raciborskii* C10.**

Para la extracción de toxinas de la fracción celular de *C. raciborskii* C10 se siguió el protocolo descrito por Lagos y cols. (1999) con las modificaciones que se describen a continuación.

A cada pellet de cultivo liofilizado y obtenido como se describió anteriormente se le agregó 500 µl de Acido acético 0,05 M (pH 5) para homogenizar el pellet. Se sonicó durante 15 min usando un vortex periódicamente. Fueron agregados 2 volúmenes de

metanol:cloroformo 1:1, agitando en vortex para luego sonicar entre 5 a 10 min. Se centrifugó a 12.500 x g durante 10 min y se extrajo la fase acuosa que contiene las toxinas. A la fase orgánica le fue agregado 250 µl de ácido acético 0,05 M repitiendo la extracción. Finalmente, se juntaron y liofilizaron las fases en un "SpeedVac". Cuando fue visible una fase orgánica y sólida (de color blancuzco), se extrajo nuevamente la fase acuosa y se prosiguió con la liofilización hasta sequedad total.

#### **IV.6.1.3. Limpieza de las toxinas obtenidas desde *C. raciborskii* C10: utilización de columna C18 Sep-Pack.**

Se utilizó el protocolo descrito por Onodera y cols. (1996) para minimizar la presencia de picos de toxinas falsos mediante la eliminación de pigmentos. Brevemente, un volumen de 900 µl de toxinas resuspendidas en ácido acético fue purificado a través de la columna C18 Sep-Pack (Waters, MA, USA), previamente activada. La columna C18 Sep-Pack se activó con 3 ml de metanol por goteo lento. Se retiró el exceso de metanol de la columna haciendo pasar aire y luego se agregó 3 ml de agua bidestilada y dejó pasar por goteo lento. Este procedimiento se repitió tres veces.

#### **IV.6.1.4. HPLC-FLD y derivatización postcolumna para la detección de toxinas en la fracción celular de cultivo de *C. raciborskii* C10.**

Se siguió el protocolo descrito por Oshima en 1995 y las modificaciones descritas por Lagos (1998), para la detección de toxinas de Veneno Paralizante de Mariscos (VPM). 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 buffer fosfato de amonio 10 mM (pH 7,1) para las toxinas del grupo GTX y ácido 1-heptanosulfónico 2 mM en buffer fosfato de amonio 30 mM (pH 7,1) más acetonitrilo 3% para las toxinas del grupo STX.

Las condiciones de cromatografía utilizadas se describen a continuación:

-Buffer para STX = 7 ml/5 $\mu$ .min

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

-Estándares utilizados = GTX (detección de todas en conjunto), neoSTX, STX.

-Tiempo de elución de estándares = GTX 6-7 min

neoSTX 11-12 min

STX 16 min

-Volúmen de muestra inyectado = 20  $\mu$ l.

#### **IV.7. Estudio de la influencia de distintas condiciones de cultivo en la síntesis de STXs por parte de SPC 338.**

##### **IV.7.1. Cuantificación de toxinas bloqueadoras de canales de sodio por medio de ensayo en células de neuroblastoma de ratón (N2A).**

Para determinar la concentración de toxinas bloqueadoras de canales de sodio en las muestras de sobrenadantes de cultivos de *C. raciborskii* SPC 338 se utilizó el ensayo en células de neuroblastoma de ratón (línea celular N2A) descrito por Gallacher y Birkbeck

(1992) y modificado (trabajos anteriores del laboratorio). Se trata de un ensayo cuantitativo que se realiza en microplacas de 96 pocillos.

El ensayo básicamente funciona exponiendo las células de la línea de células de Neuroblastoma de ratón N2A a Veratridina (Sigma®), la que activa los canales de sodio y permite la entrada de este ión al interior de las células, y a ouabaina (Sigma®), que bloquea la acción de la bomba Na/K-ATPasa impidiendo la acción compensatoria de esta bomba frente al exceso de iones  $\text{Na}^+$  al interior de las células. Cuando estos dos compuestos entran en contacto con las células de N2A ocurre lisis celular ya que conjuntamente con la entrada de iones  $\text{Na}^+$  al interior de las células se produce también la entrada de agua. Sin embargo, al exponer las células a una toxina bloqueadora de canales de sodio, como la STX (obtenida desde el National Research Council, Canada) se genera un efecto protector y las células resisten el tratamiento no produciéndose la muerte celular. La cuantificación de la cantidad de células vivas se realizó por medio de una tinción con el colorante vital Neutral Red (Sigma®). Los resultados fueron leídos en un lector de microplacas de 96 pocillos a 570 nm.

Medio RPMI 1640 (para cultivo celular).

El formulado comercial para 1 l (Sigma®) fue llevado al volumen de 900 ml de agua destilada. Luego se agregó 2 g de  $\text{NaHCO}_3$  por l, se disolvió por agitación y ajustó a pH 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N, según correspondiese. Se enrasó a un litro y filtró en una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  en botella estéril.

Neutral Red (1 l).

A 1 l de solución de Hank's (Tabla 4) se agregó 0,5 g de neutral red. Se mezcló 12 h cubriendo con papel aluminio el recipiente utilizado. Se autoclavó a 120°C durante 15 min y filtró para eliminar posibles precipitados.

Citrato-etanol (1 l).

Se pesó 16,75 g de tri-sodio citrato·2H<sub>2</sub>O y se agregó a 500 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 4,6 agregando ácido acético. Se agregó 500 ml de etanol y guardó a 4°C.

Tabla 4. Solución de Hank's

Reactivos	Concentración (g/l)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,9·10 <sup>-2</sup>
D-Glucosa	1,6
KCl	4,0·10 <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0·10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,1·10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,0·10 <sup>-2</sup>
NaCl	8,0

Solución "stock" de ouabaína

Para preparar una solución 4 mM se pesó 0,116 g de ouabaína, disolvió en 40 ml de medio RPMI-gentamicina (2 µg/ml). Se hirvió 15 min en baño de agua y se almacenó en alícuotas.

Solución "stock" de STX.

Se preparó una solución en HCl 0,001 M de STX-diHCl proveniente de la National Research Council Canada (NRC-CNRC). La concentración final de STX fue de 725 nM (0,27 µg/ml).

#### **IV.7.1.1. Cultivo de la línea celular N2A y ensayo de cuantificación de toxinas bloqueadoras de sodio.**

##### **IV.7.1.1.1. Mantención línea celular N2A (ATCC CCL-131).**

La línea celular denominada Neuro-2<sup>a</sup> (N2A) obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection) número CCL-131, está conformada por células adherentes que expresan en gran cantidad canales de sodio en su membrana celular. Esta característica permitió utilizar esta línea celular para realizar el ensayo de cuantificación de toxinas bloqueadoras de canales de sodio.

Las células se mantuvieron en botellas de cultivo (Nunc®) cuya base tiene una superficie de 25 cm<sup>2</sup> o de 75 cm<sup>2</sup> incubadas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (Gibco®) y gentamicina 80 µg/ml. El traspaso o subcultivo celular de una botella se realizaba cuando se alcanzaba la confluencia celular según lo descrito anteriormente (Gallacher y Birkbeck, 1992). Una vez que las células alcanzaron alrededor de 30-35 trasposos se observó que dejaron de responder adecuadamente al ensayo por lo tanto fue necesario eliminarlas y descongelar un nuevo criotubo del lote original.



#### **IV.7.1.1.2. Protocolo criopreservación células N2A.**

Se utilizó una mezcla de criopreservación suero fetal de bovino 90% (Gibco®) y dimetilsulfóxido 10%(Merck ®). El medio de cultivo para crecer estas células fue el RPMI 1640. Se usó como medio de lavado PBS-gentamicina (80 µg/ml) en proporción 0,2 ml de PBS (buffer fosfato salino) por cm<sup>2</sup>. Para realizar los subcultivos se usó una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,53 mM (Gibco) en proporción 20 µl/cm<sup>2</sup>, para poder despegar las células de la botella y realizar recuento celular utilizando una cámara Neubauer. Para eliminar la tripsina se centrifugó a 1.800 rpm durante 5 min.

A las células resuspendidas en una pequeña fracción de medio se les agregó gota a gota la mezcla de criopreservación (primeros 500 µl) agitando suavemente entre cada gota. Se agregó suficiente mezcla de criopreservación para obtener una densidad de  $1 \cdot 10^6$  cél/ml. La suspensión celular separada en criotubos se congeló en nitrógeno líquido.

#### **IV.7.1.1.3. Determinación de la concentración óptima de veratridina y ouabaína a usar en el ensayo en células de neuroblastoma de ratón.**

Antes de realizar el ensayo de determinación de concentración de toxinas en las muestras, debió realizarse un ensayo previo para determinar la concentración óptima de Veratridina y Ouabaína a utilizar en la placa. Para esto, se confeccionaron curvas con distintas combinaciones de veratridina y ouabaína en concentración ascendente, las que fueron desde 0 a 0,0375 mM para Veratridina, y desde 0 a 0,5 mM para Ouabaína (Fig. 6). Este procedimiento debió repetirse cada vez que varió alguna condición del ensayo, esto fue algún cambio de reactivo por otro nuevo o cambio del lote de células.

#### **IV.7.1.1.4. Ensayo de cuantificación toxinas SCBs en células de neuroblastoma de ratón.**

Este ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos, con una cantidad de 30.000 a 35.000 células/pocillo, en 88 de los 96 pocillos (Fig. 6). Las células se resuspendieron en RPMI 1640-10% SFB-gentamicina y se pusieron en las placas en un volumen de 200  $\mu$ l en concentración que fue desde 150.000 a 175.000 cél/ml. La placa se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Al observarse la monocapa celular en cada pozo, se realizó el ensayo del siguiente modo: se eliminó el medio de cultivo de la placa el que fue reemplazado por 50  $\mu$ l de una solución de ouabaína (concentración determinada por ensayo descrito anteriormente); 50  $\mu$ l de una solución de veratridina (concentración determinada por ensayo descrito anteriormente) y 100  $\mu$ l de la muestra problema (que fue probada a una dilución 1/10 en RPMI 1640 gentamicina 80  $\mu$ g/ml). Todas las muestras fueron probadas por octuplicado, tal como se muestra en el esquema de la Fig. 7. Los controles de la placa fueron:

Control positivo (columna L): 8 pocillos con 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640-gentamicina y 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640-10% MLA-gentamicina. Esta columna debe tener los valores más altos de absorbancia pues las células no se lizarán debido a la ausencia de la Oubaina y la Veratridina.

Control negativo (columna B): 8 pocillos con 50  $\mu$ l de veratridina y 50  $\mu$ l de ouabaína en concentración óptima más 100  $\mu$ l de RPMI 1640-10% MLA-gentamicina.

Blanco (columna A): 8 pocillos sin monocapa celular con 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640-gentamicina y 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640-10% MLA-gentamicina.

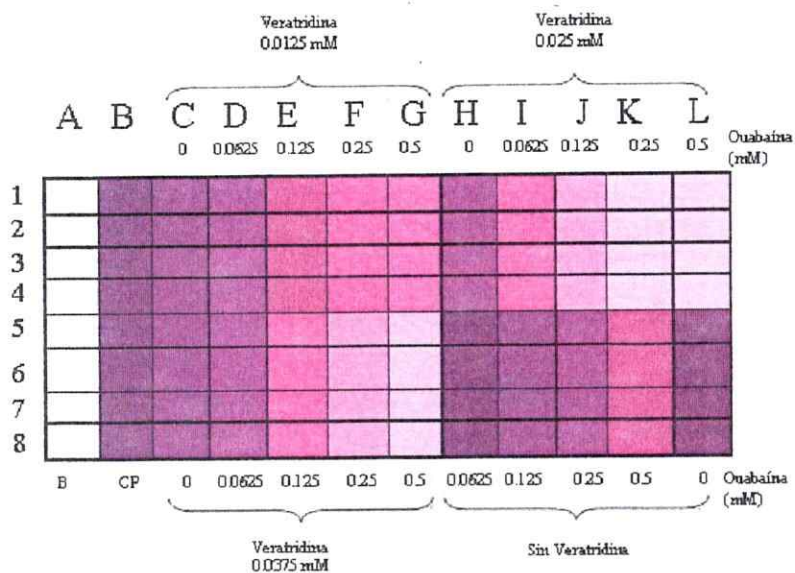


Figura 6: Esquema experimental de la placa de 96 pocillos para la determinación de la concentración óptima de veratridina y ouabaina a utilizar. CP: control positivo; B: blanco. En forma de justificación se muestra la distinta gama de colores obtenida en una de estas determinaciones.

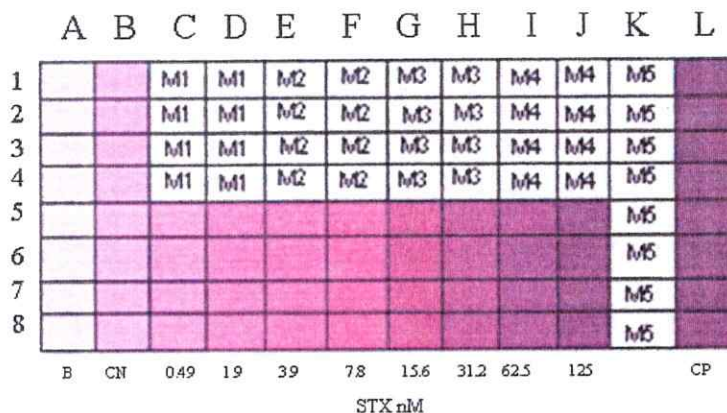


Figura 7: Esquema experimental de la placa de 96 pocillos para el ensayo de cuantificación de SCBs. CN: control negativo; CP: control positivo; B: blanco. La curva de STX se ubica en las columnas C-J, filas 5-8. Las muestras M1 a M5 se cargan en los pocillos libres (en blanco) por octuplicado. En forma de justificación se muestra la distinta gama de colores obtenida en una de estas determinaciones.

Esta columna permitió determinar cuánto colorante se adhirió inespecíficamente a los pocillos de la placa.

En la parte inferior de la placa se confeccionó una curva de STX 10% de MLA 1X en concentraciones ascendentes (0,488 nM hasta 125 nM). Se estimó que los valores de absorbancia fueron directamente proporcionales a la concentración de STX (Fig. 7). Esto permitió interpolar los valores de absorbancia obtenidos de cada muestra, de este modo se determinó la concentración del bloqueador presente en cada una de ellas calculadas como STX equivalentes. Cada concentración se cargó por cuadruplicado en la placa (Fig. 7).

Después de cargar la placa, se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h, para posteriormente realizar la tinción de ésta. Esto fue la remoción del medio de cultivo, aplicación de 200 µl de solución rojo neutro (0,5 g/l) y posterior incubación a 37°C durante 30 min. Después de la incubación, se eliminó el colorante y se realizó suavemente 2 lavados con 200 µl por pocillo de solución salina de Hank's pH 8.

Posteriormente, se efectuó el revelado de la placa aplicando 200 µl de una solución 50 mM citrato, buffer ácido acético, pH 4,6 y etanol al 50%. Se incubó una h a temperatura ambiente y se realizó la lectura de la placa en el espectrofotómetro a 570 nm. La preparación de cada solución utilizada se describió anteriormente.

El porcentaje de protección de las células por el efecto de la STX o por las muestras probadas se calculó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Protección} = \frac{A - B}{C - B} \times 100$$

Donde A, B y C son los valores de absorbancia de Muestra, Control negativo y Control Positivo, respectivamente. La concentración de toxinas SCB de cada muestra se estimó como STX equivalente (STX eq) [nM], y se obtuvo interpolando en la porción lineal de la curva obtenida a partir de STX estándar. Si la concentración de STX eq. de la muestra estuvo cercano o superó los límites superiores de la curva, se diluyó la muestra y se determinó nuevamente hasta que la concentración calculada estuviese en el rango de la curva estándar.

#### **IV.7.2. Análisis de la producción de toxinas Bloqueadoras de Canales de Sodio (SCB, sodium channel blocking) por *C. raciborskii*.**

De cada cultivo de *C. raciborskii* a analizar, se extrajeron alícuotas. Se separaron la fracción celular y el sobrenadante de cultivo mediante centrifugación a 13.100 x g por 15 min, el sobrenadante de cultivo se almacenó a -20 °C para ser utilizado en el ensayo MNA.

Se realizaron diluciones de los sobrenadantes entre 1:10 y 1:50 utilizando agua destilada estéril. Se realizaron curvas de crecimiento de la cianobacteria a 19 y 25 °C (también se realizó una de bacterias contaminantes), para analizar la cinética de producción de toxinas SCBs de *C. raciborskii* detectadas mediante MNA.

Se tomó una alícuota de cultivo de 500 µl a la cual se le realizó conteo por epifluorescencia de cianobacterias y bacterias contaminantes y otra alícuota de 1 ml de *C. raciborskii* SPC 338 en distintos días de cultivo.

## V. RESULTADOS

### V.1. Descripción del cultivo SPC 338.

Las células en cultivo formaron tricomas rectos, en su mayoría, o ligeramente curvos de una longitud entre 20 y 200  $\mu\text{m}$ . En algunos tricomas fue posible encontrar en un extremo un heterocisto de forma cónica. En condiciones de cultivo líquido sin agitación, cada tricoma se desarrolló en forma separada hasta longitudes mayores que las descritas produciendo un crecimiento visible en forma de "ovillo". Sin embargo, en cultivo sólido *C. raciborskii* SPC 338 creció o como filamentos muy largos o formando una colonia en forma de anillos concéntricos.

### V.2. Obtención de un cultivo axénico de *C. raciborskii* con propósitos de extracción de DNA genómico.

El cultivo *C. raciborskii* SPC 338 no es axénico. La observación mediante tinción con naranja de acridina y microscopia de epifluorescencia (Hobbie, 1977) mostró la presencia abundante de bacterias contaminantes de tipo bacilo.

Se estudiaron diversas estrategias para obtener un cultivo axénico. Entre las alternativas probadas estuvo los tratamientos en medio líquido y sólido con antibióticos (gentamicina, cloramfenicol, kanamicina, neomicina, tobramicina y paramomicina) aplicados en el rango de concentración de 5 a 100 mg/ml a diluciones del cultivo, con el objetivo de individualizar un agente antibiótico selectivo para las bacterias contaminantes (Ferris y Hirsch, 1991). Sin embargo, ninguno de los tratamientos fue exitoso. Alternativamente, se decidió diseñar un protocolo de lavado del cultivo que

permitiera obtener un cultivo axénico o con una reducida carga de bacterias acompañantes. Este protocolo consistió en la filtración del cultivo por membranas de nitrocelulosa de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, elegido este tamaño pues un filamento de *C. raciborskii* alcanza longitudes de 200  $\mu\text{m}$ . Posteriormente el filtrado fue lavado con un volumen de agua destilada estéril de 500 ml aproximadamente. Las células de *C. raciborskii* lavadas de esta forma fueron cultivadas en diluciones seriales tanto en medio líquido como en medio sólido, con el objetivo de obtener colonias únicas libres de contaminantes. Tampoco se obtuvo cultivos axénicos de esta forma.

Ya que ninguno de estos intentos por obtener un cultivo axénico fue exitoso, fue aplicado un protocolo que incluyó filtración de cultivos en la fase estacionaria por membrana de nitrocelulosa de 3  $\mu\text{m}$  y lavados repetidos con 200 ml de agua destilada estéril y abundante agitación. Esta membrana fue cambiada 2 veces durante el procedimiento. Finalmente, la fracción celular fue resuspendida en 2 ml de MLA (por cada 100 ml de cultivo se obtiene 1 ml de concentrado). Cada etapa se realizó teniendo precaución de realizar el mínimo de manipulación por pipeteo.

La determinación del número de bacterias contaminantes en este concentrado fue realizada por microscopia de epifluorescencia (Metodología).

El resultado evidenció entre 1.000 a 10.000 bacterias contaminantes por ml. Debe tenerse en cuenta que el número de contaminantes en el día 30 de un cultivo de *C. raciborskii* no lavado es mayor a  $3,3 \cdot 10^8$  cél./ml, por lo que el lavado del cultivo disminuyó el número de contaminantes 4 a 5 órdenes de magnitud, demostrando la eficacia de los lavados mediante filtración.

### V.3. Análisis de la naturaleza clonal del cultivo SPC 338

#### V.3.1. Obtención de DNA genómico de *C. raciborskii* adecuado para su uso en análisis molecular.

La obtención de DNA genómico de buena calidad desde cianobacterias es una tarea difícil ya que la aplicación de los protocolos convencionales resulta en la extracción de un DNA generalmente degradado y con un alto contenido de iones metálicos y nucleasas; que impiden los experimentos de biología molecular tales como digestión de DNA, amplificación por PCR, etc. Por ello se implementó el método del etil-xantogenato de potasio (Metodología) que genera un DNA de óptimas condiciones.

Este protocolo fue aplicado durante el desarrollo de esta tesis por lo que fue necesario adaptar los volúmenes publicados originalmente a un cultivo de cianobacterias previamente sometido a un protocolo de lavado (Metodología). Este protocolo de extracción permitió obtener de manera reproducible un DNA no degradado con una concentración que varía entre 5 a 100 ng/ $\mu$ l (Fig. 8).

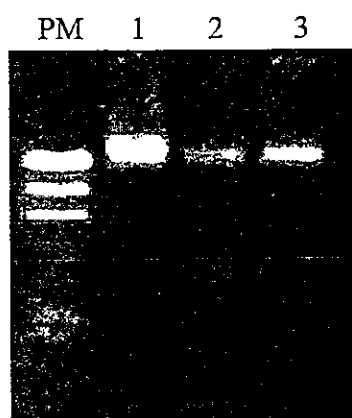


Figura 8. Extracción de DNA genómico de *C. raciborskii* por el método del xantogenato de potasio. Se cargaron 5  $\mu$ l de soluciones del DNA purificado a una concentración de 16,2 ng/ $\mu$ l (1), 3,1 ng/ $\mu$ l (2) y 4,6 ng/ $\mu$ l (3). PM: marcador de peso molecular  $\lambda$  HindIII.



### V.3.2. Amplificación, clonamiento, análisis de restricción (ARDRA) y secuenciación del 16S rDNA de *C. raciborskii* SPC 338.

La secuenciación del gen 16S rDNA es una herramienta útil para caracterizar genotípicamente un microorganismo, por ello este método fue utilizado en la caracterización a nivel genético del cultivo *C. raciborskii* SPC 338.

Además, la caracterización del cultivo a través de la secuenciación del 16S rDNA permitiría demostrar la procedencia del DNA genómico extraído desde un cultivo no axénico. En este caso el clonamiento del 16S rDNA fue realizado en paralelo con un gen tipo NRPS (resultado discutido en sección V.4.2.3.).

Para la amplificación del 16S rDNA se utilizaron los oligonucleótidos 27F y 1492R (Tabla 3), y el programa de amplificación descrito en Metodología. El tamaño de producto esperado fue de 1.500 pb. La amplificación del 16S rDNA se realizó desde una dilución 1:100 de DNA genómico de *C. raciborskii* SPC 338 (dilución límite en la que se obtuvo un amplificado apropiado para el clonamiento, resultado discutido en la sección V.4.2.3.)

Los clones de la librería del 16S rDNA de *C. raciborskii* SPC 338 que portaban vectores recombinantes fueron analizados por amplificación directa de colonias usando los oligonucleótidos del vector y posterior digestión con una enzima de restricción. En este caso las enzimas utilizadas fueron *TaqI* y *EcoRI*. Siguiendo este procedimiento se analizaron 20 clones de la librería.

La electroforesis en gel de agarosa mostró tanto en la digestión con *TaqI* (Fig. 9) como con *EcoRI* (resultado no mostrado) la presencia de 2 patrones de restricción diferentes los que fueron identificados como 4 y 9.

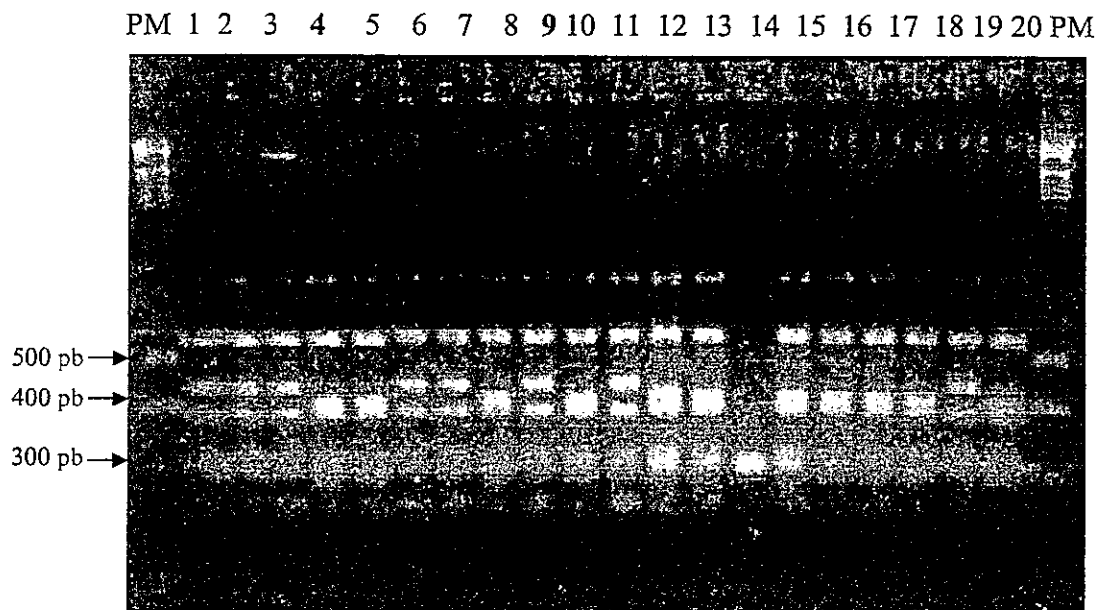


Figura 9. ARDRA de *C. raciborskii* SPC338 usando la enzima *TaqI*. A partir del patrón de digestión de los clones analizados (1 a 20) se definieron dos familias cuyos representantes son el clon 4 y el clon 9. PM: marcador 100 pb Boehringer Mannheim™.

Los clones 4 y 9 fueron secuenciados a partir de la amplificación desde DNA plasmidial. Los resultados de la búsqueda de identidad de las secuencias en la base de datos del NCBI indicaron que las secuencias del gen 16S rDNA de ambas cepas presentan un alto grado de similitud con secuencias de 16S rDNA de otras cepas de *C. raciborskii*. De las 60 secuencias de 16S rDNA de *C. raciborskii* descritas hasta el momento, se utilizaron 26 para hacer las comparaciones.

El alineamiento mostró para ambos clones una alta identidad de un 99,35 % y 99,42 %, con las cepas de *C. raciborskii* Florida D (originaria de Estados Unidos) sobre 1.402 y 1.399 posiciones comparadas, respectivamente. Las secuencias de los clones 4 y 9 mostraron un 99,22% de identidad sobre 1.414 posiciones comparadas, lo que indicó que ambos genes están altamente relacionados.

Los resultados obtenidos en el análisis de restricción y por secuenciación indicaron que los genes 16S rDNA de los clones 4 y 9 detectados son diferentes en un 0,78 % de las posiciones comparadas.

El alineamiento de ambas secuencias mostró 8 posiciones no apareadas ("mismatch") y 3 saltos ("gaps"). La presencia de dos patrones electroforéticos distintos (Fig. 9) revela la existencia de dos moléculas de 16S rDNA diferentes en *C. raciborskii* SPC 338 lo cual podría deberse a la coexistencia en el cultivo de al menos 2 cepas de *C. raciborskii* (es decir la presencia de un cultivo mixto) o bien a una intraheterogeneidad por la presencia de locus ribosomales múltiples cuyos 16S rDNA son heterogéneos en secuencia.

### **V.3.3. Obtención de cultivos clonales a partir de una célula individual de *C. raciborskii* SPC 338.**

Debido al resultado obtenido en el punto anterior fue necesario analizar la pureza del cultivo de *C. raciborskii* SPC 338. Para ello se tomaron tricomas individuales bajo el microscopio, los que fueron depositados en una placa de 24 pocillos, con 1 ml de medio MLA condicionado en cada uno. El medio condicionado fue una dilución 1:10 de sobrenadante de cultivo en medio MLA fresco.

Aquellos pocillos que presentaron un solo tricoma, fueron individualizados y numerados. Se individualizaron 30 pocillos en total. Cada pocillo seleccionado de la placa fue seguido día a día rigurosamente hasta que el tricoma presentó un crecimiento evidente a la vista (forma de "ovillo"). En este momento el tricoma fue trasladado a un tubo de ensayo con 5 ml de medio MLA condicionado. En esta etapa se realizó la

amplificación del 16S rDNA por duplicado a partir de una célula individual y digestión con *EcoRI* (Fig. 10).

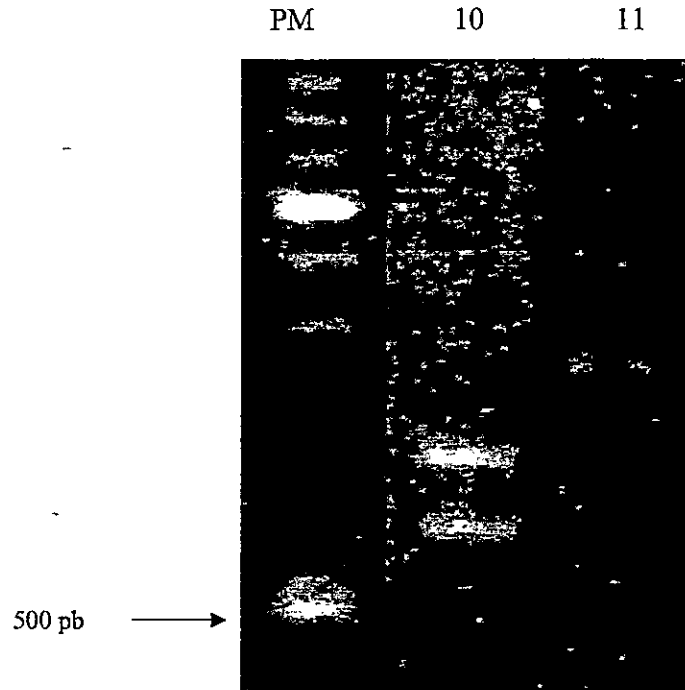


Figura 10. Análisis de restricción de los genes 16S rDNA. Para cada cultivo de *C. raciborskii* (10 y 11) se analizaron 2 tricomas (no mostrado). La enzima utilizada fue *EcoRI*. PM: marcador 100 pb Boehringer™.

Se encontraron 2 cultivos con patrones diferentes. Estos fueron los cultivos 10 y 11. El cultivo 10 presentó una banda de 600 pb y otra de 700 pb mientras que el cultivo 11 presentó una banda de 650 pb y otra de 800 pb. Si a cada patrón se le atribuye una cepa distinta, entonces con este experimento se comprueba que el cultivo SPC 338 no es una cepa única sino una mezcla de al menos 2 cepas de *C. raciborskii*. Finalmente el cultivo 10, nombrado como *C. raciborskii* C10, fue elegido para futuros análisis.

#### **V.4. Caracterización del aislado clonal C10: microscopía y análisis genotípico.**

##### **V.4.1. Microscopia óptica de C10.**

Se realizó una microscopia con el objetivo de conocer morfológicamente al cultivo C10 y realizar una comparación con lo descrito para otros cultivos de *C. raciborskii*.

*C. raciborskii* C10 es una cianobacteria filamentosa, de tricoma recto, con una longitud entre 20-200  $\mu\text{m}$  y no presentó vainas mucilaginosas. Se observaron aquinetes ovals entre células vegetativas (Fig. 1) como así también heterocistos únicos en el extremo de algunos tricomas (Fig. 1). La cepa C10 fue morfológicamente indistinguible de otras cepas descritas con anterioridad (Lagos y cols., 1999; Saker y cols., 1999).

##### **V.4.2. Caracterización genotípica del aislado clonal C10.**

El hallazgo que el cultivo SPC 338 no se trataba de una cepa sino que era una mezcla de estas, indicó que la caracterización molecular de un aislado clonal era necesaria para validar cualquier análisis posterior.

##### **V.4.2.1. Amplificación, clonamiento, análisis de restricción (ARDRA) y secuenciación del 16S rDNA de *C. raciborskii* C10.**

El gen 16S rDNA proveniente de *C. raciborskii* C10 fue amplificado, clonado en pGEM-T™ e introducido a *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación. Los clones de la librería del 16S rDNA de *C. raciborskii* C10 que portaban vectores recombinantes fueron analizados por amplificación directa de colonias usando los oligonucleótidos del vector. Se realizó la purificación del amplificado mediante GeneClean, luego

amplificación con los partidores para 16S rDNA y se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Se analizaron 75 clones de *E. coli*. El análisis por electroforesis en gel de agarosa mostró dos patrones de restricción distintos. Un patrón identificado como clon 24 presentó bandas de 700, 600 y 100 pb fue idéntico al encontrado en el clonamiento del 16S rDNA del cultivo mixto SPC 338, identificado como clon 4. El otro patrón, identificado como clon 41, mostró un patrón distinto al clon 9 del clonamiento realizado para SPC 338 ya que el primero posee bandas de 700 y 100 pb (Fig. 11).

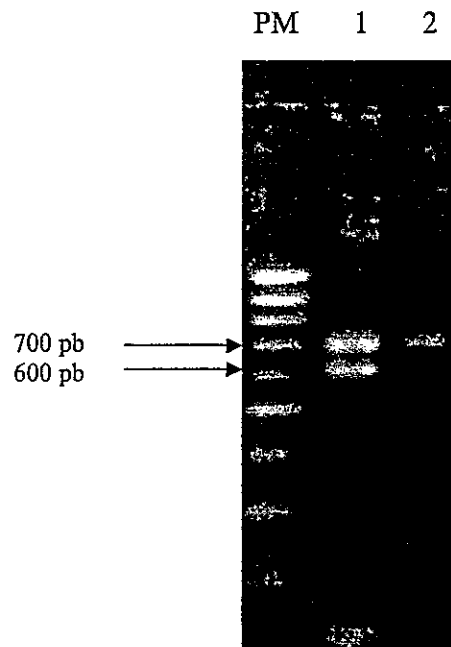


Figura 11. ARDRA de *C. raciborskii* C10. Se utilizó la enzima *EcoRI* para analizar los clones 24 (1) y 41(2). PM: marcador 100 pb GIBCO™.

Para precisar las diferencias evidenciadas en el análisis por restricción de la librería del gen 16S rDNA del aislado C10, los clones 24 y 41 fueron amplificados desde DNA plasmidial, purificados por GeneClean™ y secuenciados. El alineamiento de la secuencia

del 16S rDNA del aislado C10 con las 26 secuencias descritas en la base de datos pertenecientes a cepas de *C. raciborskii* mostró para el caso del clon 24 (1.387 pb) un porcentaje de identidad que fluctuó entre el 98,99 % y el 98,19 % y para el caso del clon 41 (1.442 pb) un porcentaje de identidad que fluctuó entre el 98,72 % y 99 %. Al analizar las secuencias por separado el clon 24 mostró un porcentaje de identidad del 98,99 % con el 16S rDNA de *C. raciborskii* cepa Florida D originaria de Estados Unidos y el clon 41 mostró una identidad del 99 % con el 16S rDNA descrito para la misma cepa. El alineamiento de los clones 24 y 41 entre si mostró un porcentaje de identidad del 98,78 % sobre 1.394 posiciones comparadas lo que indica que estas secuencias se encuentran altamente relacionadas.

El análisis por secuenciación indica que los genes 16S rDNA de los clones 24 y 41 detectados en *C. raciborskii* C10 son diferentes en un 1,22 % de las posiciones comparadas (resultados no mostrados). El alineamiento de ambas secuencias mostró la presencia de 7 posiciones no apareadas (“missmatch”) y 9 saltos (“gaps”).

#### **V.4.2.2. Análisis comparativo entre los sitios polimórficos en el 16S rDNA presentes en *C. raciborskii* C10 y en el cultivo SPC 338 y la estructura secundaria del 16S rRNA de la cianobacteria *Anacystis nidulans* 6301 (*Synechococcus* sp. strain PCC 6301).**

Se realizó un alineamiento con el programa ClustalW (Thompson y cols., 1994) entre las secuencias de los 16S rDNA pertenecientes a los clones 4 y 9 y los clones 24 y 41, obtenidos desde el cultivo SPC 338 y desde la cepa C10, respectivamente. Los sitios

polimórficos encontrados fueron ubicados en la estructura secundaria del 16S rDNA de la cianobacteria *Anacystis nidulans* 6301 (Fig. 12).

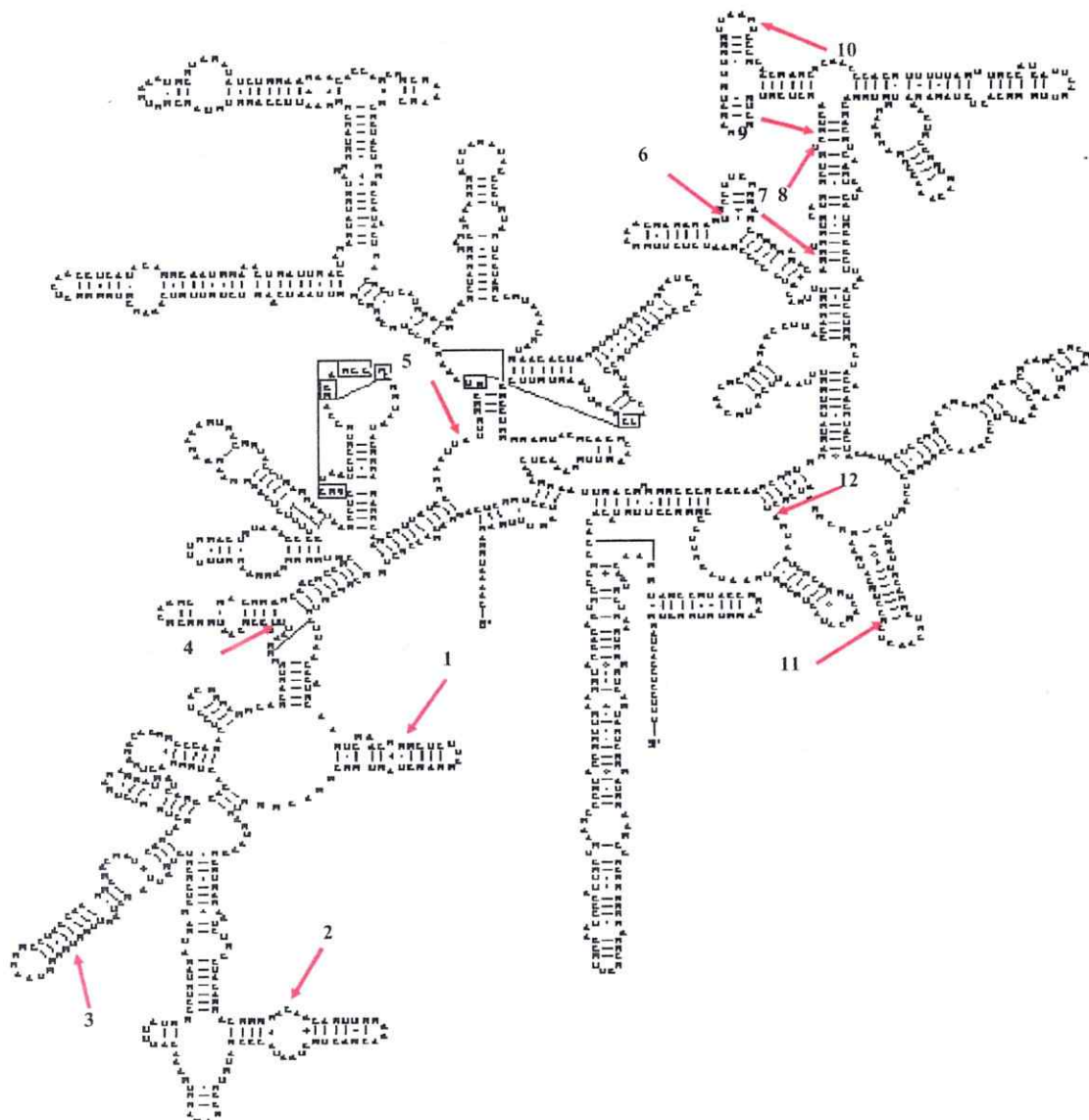


Figura 12. Localización de los 12 sitios polimórficos encontrados en el 16S rDNA de *C. raciborskii* SPC338 y C10 usando como patrón la estructura secundaria del 16S rDNA de la cianobacteria *Anacystis nidulans* 6301. Cada sitio polimórfico es indicado con flecha y número.

Se encontraron un total de 12 sitios polimórficos (Tabla 5) de los cuales 9 son cambios en la secuencia (un cambio de base) y 3 constituyen una inserción en la secuencia del



16S rDNA de alguno de los clones. De un total de 9 sitios en los que ocurrió cambios en la secuencia, un 33,33 % de los sitios fueron constituidos por una C o T, otro 33,33 % por una A o G, en tanto que un 22,22 % por una T o G y un 11,12 % por una C o G. De lo anterior se extiende que en un 33,34 % de los sitios polimórficos ocurrieron transversiones y en un 66,66 % transiciones en la secuencia. Ninguno de los cambios alteró la estructura secundaria de la molécula de 16S rDNA lo que indica que las moléculas en todos los casos son estructuralmente funcionales.

Tabla 5. Sitios polimórficos en el 16S rDNA de *C. raciborskii* SPC338 y C10.

Sitio polimórfico n°	Clon en el que se presenta	Composición de bases en sitios heterogéneos	Apareamiento en la doble cadena*	Estructura en la que se presenta
1	4, 9, 24, 41	R	A-T, G-T, A-T, G-T	brazo
2	4, 9, 24, 41	Y	C-A, T-A, C-A, T-A	horquilla
3	4, 9, 24, 41	Y	T-A, C-A, C-A, C-A	brazo
4	4, 9, 24, 41	Y	T-G, C-G, T-G, T-G	brazo
5	4, 9, 24, 41	R	G, A, G, G	horquilla
6	4, 9, 24, 41	R	A-T, G-T, G-T, A-T	brazo
7	4, 9, 24, 41	W	T-G, A-G, T-G, T-G	brazo-horquilla**
8	4, 9, 24, 41		gap-C, gap-C, G-C, C-C	brazo
9	4, 9, 24, 41	W	T-T, T-T, T-T, A-T	horquilla
10	4, 9, 24, 41	S	C-G, C-G, C-G, G-G	brazo
11	4, 9, 24, 41		gap, gap, T, gap	horquilla
12	4, 9, 24, 41		T, gap, gap, gap	brazo

\* corresponde a las posiciones que forman parte de un brazo o de una horquilla en la doble cadena.

\*\* sitio que se encuentra entre la finalización de una horquilla y comienzo de un brazo (Fig. 12).

La distribución de los sitios polimórficos mostró extenderse en forma homogénea dentro de la estructura secundaria de la molécula de 16S rDNA, es decir, no existió una hélice que concentrase un número elevado de polimorfismos, como es descrito en literatura para el caso de otros organismos que presentan heterogeneidad del gen 16S rDNA.

#### V.4.2.3. Detección de un gen tipo Péptido Sintetasa No Ribosomal (NRPS) en *C. raciborskii* SPC 338.

##### V.4.2.3.1. Amplificación, clonamiento y secuenciación de un gen tipo NRPS de *C. raciborskii* SPC 338.

La detección de un gen tipo NRPS se realizó en una etapa previa a la comprobación del carácter mixto del cultivo SPC 338. A partir de DNA genómico de *C. raciborskii* SPC 338 en dilución 1:100 se llevó a cabo una reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos degenerados MTR2 y MTF (Tabla 3) para el gen NRPS (Fig. 13).

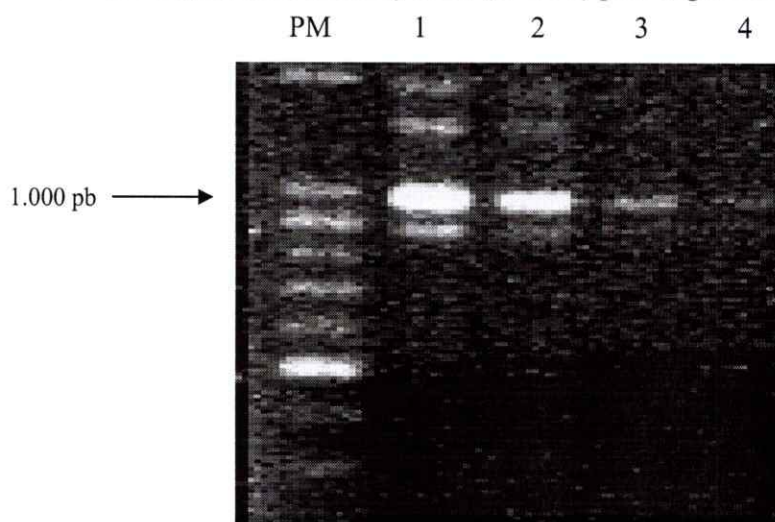


Figura 13. Amplificación de un gen tipo NRPS desde *C. raciborskii* SPC 338. Para amplificar un gen tipo NRPS desde *C. raciborskii* SPC338 se utilizó DNA sin diluir (1) y con diluciones 1:10 (2), 1:50 (3) v 1:100 (4). PM: marcador 100 pb Boehringer™.

La distribución de los sitios polimórficos mostró extenderse en forma homogénea dentro de la estructura secundaria de la molécula de 16S rDNA, es decir, no existió una hélice que concentrase un número elevado de polimorfismos, como es descrito en literatura para el caso de otros organismos que presentan heterogeneidad del gen 16S rDNA.

#### V.4.2.3. Detección de un gen tipo Péptido Sintetasa No Ribosomal (NRPS) en *C. raciborskii* SPC 338.

##### V.4.2.3.1. Amplificación, clonamiento y secuenciación de un gen tipo NRPS de *C. raciborskii* SPC 338.

La detección de un gen tipo NRPS se realizó en una etapa previa a la comprobación del carácter mixto del cultivo SPC 338. A partir de DNA genómico de *C. raciborskii* SPC 338 en dilución 1:100 se llevó a cabo una reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos degenerados MTR2 y MTF (Tabla 3) para el gen NRPS (Fig. 13).

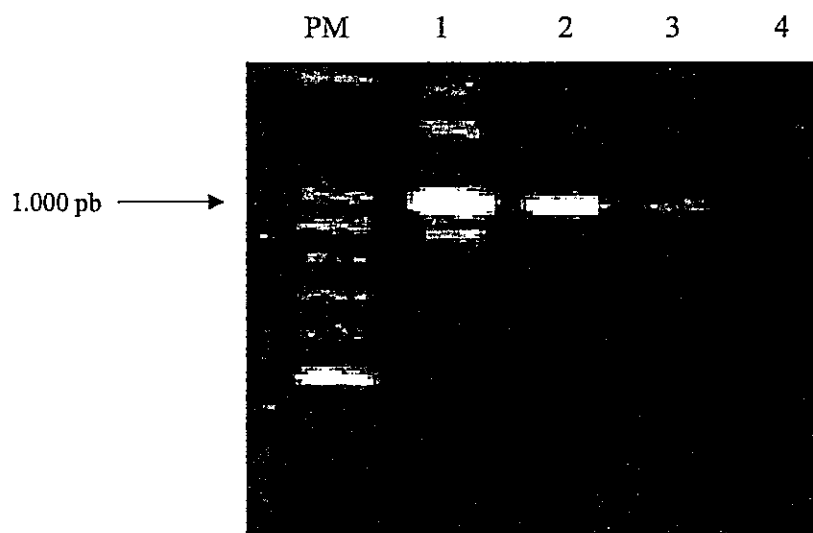


Figura 13. Amplificación de un gen tipo NRPS desde *C. raciborskii* SPC 338. Para amplificar un gen tipo NRPS desde *C. raciborskii* SPC338 se utilizó DNA sin diluir (1) y con diluciones 1:10 (2), 1:50 (3) v 1:100 (4). PM: marcador 100 nb Boehringer™.

Estos oligonucleótidos generaron un fragmento de 1000 pb que incluye los dominios de adenilación I a V. Las condiciones de amplificación debieron ser optimizadas para la utilización de estos oligonucleótidos y el programa de amplificación se describe en Metodología.

- El producto amplificado fue purificado por Wizard <sup>TM</sup> desde el gel de agarosa y posteriormente se clonó en el vector pGEM-T<sup>TM</sup> siguiendo las recomendaciones del fabricante. El producto del clonamiento fue introducido mediante electroporación en la cepa receptora *E. coli* XL1 Blue. Los clones obtenidos fueron analizados mediante amplificación usando los partidores del vector, y posterior digestión del fragmento de DNA obtenido con la enzima *Hae*III. La electroforesis en gel de agarosa evidenció la presencia de 2 patrones de restricción muy similares entre sí los que fueron denominados clon NRPS 64 y clon NRPS 81 (Fig. 14).

PM 64 81

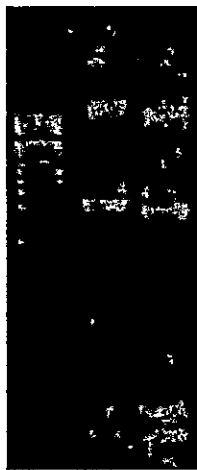


Figura 14. Digestión de los clones NRPS usando la enzima *Hae*III. Se muestran los clones 64 y 81. PM: marcador 100 pb Boehringer Mannheim<sup>TM</sup>.

Se llevó a cabo la secuenciación de los clones NRPS 64 y 81. Fue posible ensamblar correctamente solo el clon 81 generándose un fragmento de 943 pb.

Se realizó una comparación en base a la secuencia aminoacídica que mostró un 43% de identidad con un módulo péptido sintetasa no ribosomal de *Nostoc punctiforme* y que un 87% de los aminoácidos fueron idénticos en carga. Fueron comparadas 130 posiciones.

El resultado obtenido a través de la secuenciación de los genes NRPS clonados desde *C. raciborskii* SPC 338 como así también de la secuenciación del 16S rDNA confirmaron que el DNA extraído del cultivo lavado de *C. raciborskii* SPC 338 provenía de este y no de bacterias contaminantes debido que el clonamiento de los genes NRPS y 16S rDNA fueron hechos en paralelo a partir de las mismas concentraciones de DNA. Por lo tanto, si los únicos genes 16S rDNA detectados están relacionados con *C. raciborskii*, entonces los genes NRPS provienen de cianobacterias. Los genes NRPS de *C. raciborskii* SPC 338 presentaron heterogeneidad en sus patrones de restricción lo que podría relacionarse a la presencia de varias cepas lo que concuerda con los análisis del 16S rDNA.

#### **V.4.2.3.2. Ensayo de hibridación en membrana para detectar el número de locus del gen NRPS en el genoma de *C. raciborskii* SPC 338.**

Con el propósito de identificar el número de locus del gen péptido sintetasa en el genoma de *C. raciborskii* SPC 338, se utilizó el amplificado del clon NRPS 81 de 1.000 pb como sonda, en un ensayo de hibridación, usando como "blanco" 10 µg de DNA genómico de *C. raciborskii* SPC 338 digerido con la enzima *Bam*HI.. Se detectaron 12 sitios de hibridación lo que sugiere la presencia de varios loci tipo NRPS dentro del genoma de *C. raciborskii* SPC 338 (Fig. 15). No obstante, no se puede descartar que el

alto número de copias NRPS detectado se debe a la presencia de varias cepas dentro del cultivo SPC 338.

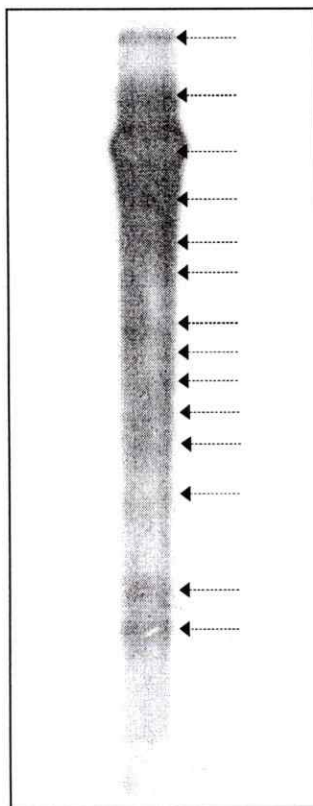


Figura 15. Detección de locus del gen NRPS en el genoma de *C. raciborskii* SPC338 mediante ensayo de hibridación en membrana. Los sitios de hibridación se indican con flechas.

#### **V.5. Análisis filogenético de aislados de distinto origen geográfico de *C. raciborskii* mediante alineamiento del 16S rDNA.**

Los 26 genes 16S rDNAs secuenciados descritos para cepas de distinto origen geográfico de *C. raciborskii* y los dos 16S rDNAs (clones 24 y 41) obtenidos de la cepa C10 originaria de Brasil fueron usados para construir un árbol filogenético. Se utilizó como grupo externo el 16S rDNA de *Nostoc* PCC7120 (Fig. 16).

alto número de copias NRPS detectado se debe a la presencia de varias cepas dentro del cultivo SPC 338.

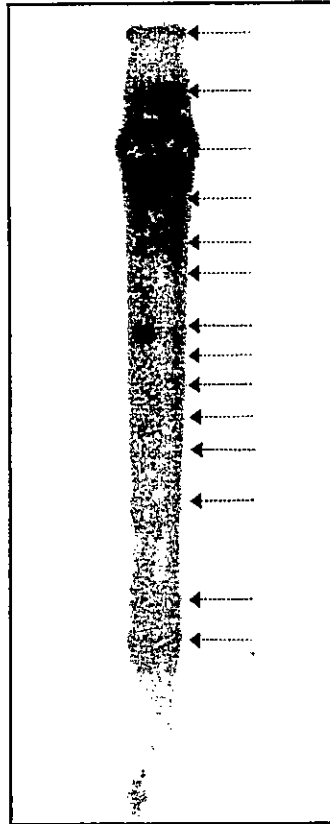


Figura 15. Detección de locus del gen NRPS en el genoma de *C. raciborskii* SPC338 mediante ensayo de hibridación en membrana. Los sitios de hibridación se indican con flechas.

#### **V.5. Análisis filogenético de aislados de distinto origen geográfico de *C. raciborskii* mediante alineamiento del 16S rDNA.**

Los 26 genes 16S rDNAs secuenciados descritos para cepas de distinto origen geográfico de *C. raciborskii* y los dos 16S rDNAs (clones 24 y 41) obtenidos de la cepa C10 originaria de Brasil fueron usados para construir un árbol filogenético. Se utilizó como grupo externo el 16S rDNA de *Nostoc* PCC7120 (Fig. 16).

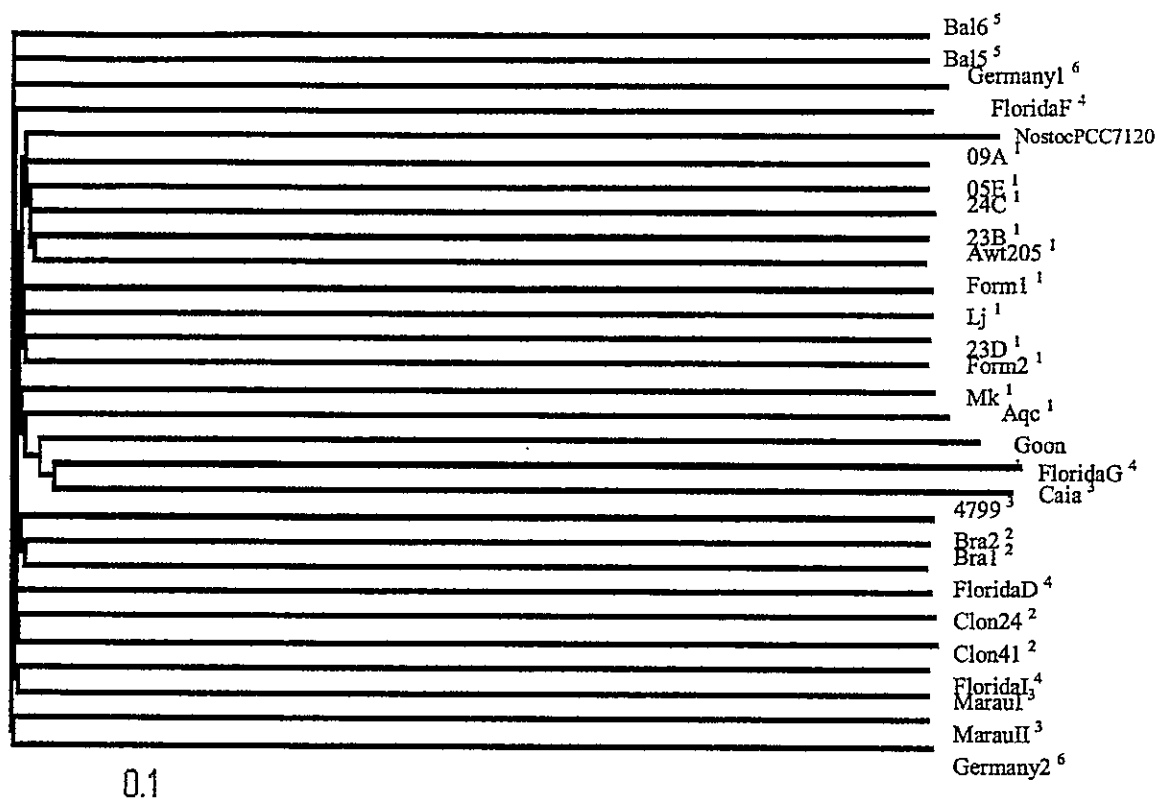


Figura 16. Dendrograma de aislados de *C. raciborskii* mediante el alineamiento del 16S rDNA. El alineamiento múltiple se llevo a cabo mediante ClustalW (Thompson y cols., 1994), el cálculo de distancia genética fue realizado mediante el método de Kimura y el árbol fue obtenido con el método de Neighbour Joining, con un bootstrapping de 1.000. Se incluyen los 16S rDNA detectados en el cultivo de *C. raciborskii* C10 denominados clones 24 y 41. Se indican los orígenes de los aislados: Australia (1), Brasil (2), Portugal (3), Estados Unidos (4), Hungría (5), Alemania (6).

El análisis filogenético indicó que los aislados no se agruparon estrictamente en base a su origen geográfico, ni tampoco en base al morfotipo o a propiedades fenotípicas como producción de toxinas, excepto algunas excepciones como los aislados 09<sup>a</sup>, 24C, 05E,



Awt205 provenientes de Australia que se ubicaron filogenéticamente cercanos conformando un cluster.

Otro caso es el de los aislados Brasil1 y Brasil2 que conformaron un cluster y que según el análisis estarían relacionados con el aislado Florida D, originario de Estados Unidos, lo que coincidió con el resultado encontrado al realizar el alineamiento en la base de datos del GenBank. La distancia genética existente entre las secuencias analizadas fue mucho menor que 0,1. Este análisis filogenético indicó que los clones 24 y 41 provenientes del aislado C10 se encontraron formando parte de un solo cluster.

#### **V.6. Caracterización fenotípica del aislado C10.**

##### **V.6.1. Detección e identificación de toxinas SCB en la fracción celular de cultivo de *C. raciborskii* C10, mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión con Derivatización Postcolumna y detección en línea por fluorescencia directa (HPLC-FLD).**

Se realizó la identificación de toxinas SCBs mediante HPLC-FLD, además se cuantificó las toxinas SCBs del Veneno Paralizante de Mariscos (VPM) o como se conocen internacionalmente las toxinas PSP (Paralytic Shellfish Poisoning), es decir STX y sus análogos. En este caso la presencia de las toxinas se determinó en la fracción celular de un cultivo de *C. raciborskii* C10, mediante HPLC-FLD tal como se describió en la sección Metodología. La detección se realizó en los días de cultivo 9, 15 y 30 de un cultivo crecido a 25 °C de *C. raciborskii* C10.

Fueron llevadas a cabo dos corridas cromatográficas en las que se varió la composición

de la fase móvil para obtener una resolución diferencial de las toxinas. Para la detección de aquellas toxinas de carga neta +1 (GTX 1 a 6 y dcGTX 2/3) se utilizó como fase móvil heptasulfonato de sodio (2 mM) en fosfato de amonio (10 mM) a pH 7,1. Para la detección de STX, neoSTX, dc STX, se utilizó ácido 1-heptanosulfónico 2 mM en buffer fosfato de amonio 30mM (pH 7,1) más acetonitrilo 3% vol.

En el pellet de cultivo de *C. raciborskii* C10 fueron detectadas las toxinas SCB: STX, dc STX, GTX2 y GTX3 (Tabla 6). Si bien la concentración de toxina total por peso seco de cianobacterias fue en aumento, la concentración de cada toxina en el tiempo no mostró el mismo comportamiento.

Tabla 6. Detección de toxinas paralizantes mediante HPLC-FLD en la fracción celular de cultivos de *C. raciborskii* C10.

Tiempo (días)	Peso Seco (mg)	STX (ng tox/mg)	GTX 2 (ng tox/mg)	GTX 3 (ng tox/mg)	dc STX (ng tox/mg)	Toxina Total (ng tox/mg)
9	4,7	669,6	12,4	9,7	ND	691
15	5,1	812,4	166,8	220,8	ND	1.200
30	8,0	585,5	179,0	228,6	131,7	1.126

STX: saxitoxina; GTX2 y GTX3: gonyautoxina 2 y 3; dc STX: decarbamoil saxitoxina; ND: no detectado.

Las toxinas GTX2 y GTX3 aumentaron su concentración durante todo el tiempo de medición, mientras que la concentración de STX aumentó solamente hasta el día 15 y luego disminuyó en el caso de dc STX, esta solo fue detectada al día 30 de cultivo. La toxina STX apareció en concentraciones similares durante los 30 días de cultivo, sin

picos significativos y la concentración de GTX3 se mantuvo ligeramente mayor a la concentración de su epímero en los días 15 y 30 de cultivo. Teniendo en cuenta la naturaleza química de las toxinas PSP producidas por *C. raciborskii* C10, el cultivo se mostró predominantemente productor de STX y en un menor grado productor de GTX y de STX. Al igual que lo encontrado en la detección de toxinas SCBs por MNA, la concentración de toxina total se incrementó en el tiempo y luego se mantuvo constante. Realizando una comparación entre los resultados obtenidos en la detección de toxinas SCB en sobrenadante y pellet de un cultivo de *C. raciborskii* se encontró que la concentración detectada en el pellet fue 4 veces superior a la encontrada en el sobrenadante de cultivo, siendo la primera de 812,4 ng/mg y la segunda de 195 ng/mg. Este análisis se realizó en base a los valores de STX y STXeq al día 15 de un cultivo de *C. raciborskii* C10 y *C. raciborskii* SPC 338 respectivamente (el día 15 constituyó la última determinación de la curva del cultivo SPC 338). Por tratarse SPC 338 de un cultivo mixto debe tenerse en cuenta que los valores de STXeq encontrados pueden ser aportados por varias cepas de *C. raciborskii*.

## **V.7. Estudio de la influencia de distintas condiciones de cultivo en la síntesis de STX y análogos por *C. raciborskii*.**

### **V.7.1. Detección de toxinas SCB en el sobrenadante de cultivo de *C. raciborskii* SPC 338, mediante el ensayo en células de Neuroblastoma de Ratón (Mouse Neuroblastoma Assay, MNA).**

Para caracterizar la producción de toxinas SCBs por la cianobacteria *C. raciborskii* SPC 338 en el sobrenadante de cultivo, se utilizó el ensayo en células de neuroblastoma de

ratón (MNA) (Gallacher y Birkbeck, 1992), de acuerdo a las modificaciones descritas en Metodología. En esta caracterización, se exploró la influencia de la temperatura en la producción de toxinas SCB en cultivos a 19 °C y temperatura ambiente (rango entre 24-25°C) (Fig. 17 y 18).

La curva de producción de SCB por *C. raciborskii* SPC 338 a 19 °C mostró un máximo de 250 nM de STX eq en fase estacionaria el día 57 de cultivo. En cambio, a temperatura ambiente el máximo de producción fue de 325 nM STX eq. al día 15 de cultivo, también en fase estacionaria de crecimiento.

Tanto a 19 °C como a temperatura ambiente luego de alcanzada la fase estacionaria, la concentración de toxinas SCB y la concentración de células de *C. raciborskii* SPC 338 alcanzaron un máximo (Fig. 17). *C. raciborskii* SPC 338 a temperatura ambiente alcanzó una concentración máxima de  $7,9 \cdot 10^6$  cél/ml, en tanto que a 19 °C la concentración máxima fue de  $1,8 \cdot 10^6$  cél/ml. Las bacterias contaminantes (o acompañantes) alcanzaron una concentración máxima de  $3,7 \cdot 10^8$  cél/ml a 19 °C en tanto que a temperatura ambiente el máximo alcanzado fue de  $4,4 \cdot 10^7$  cél/ml.

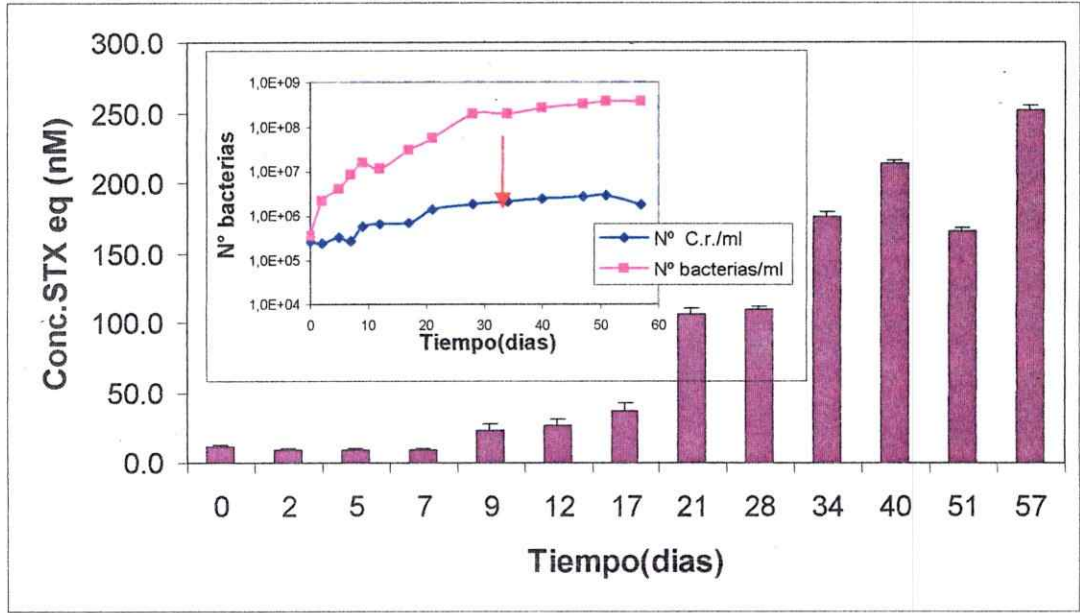


Figura 17. Producción de toxinas SCBs a 19°C por *C. raciborskii* SPC338 detectada mediante MNA y expresada como saxitoxina equivalente (STX eq.). En el inserto, la curva de crecimiento de *C. raciborskii* SPC338 y de bacterias contaminantes. Se indica con una flecha el comienzo visible de lisis celular.

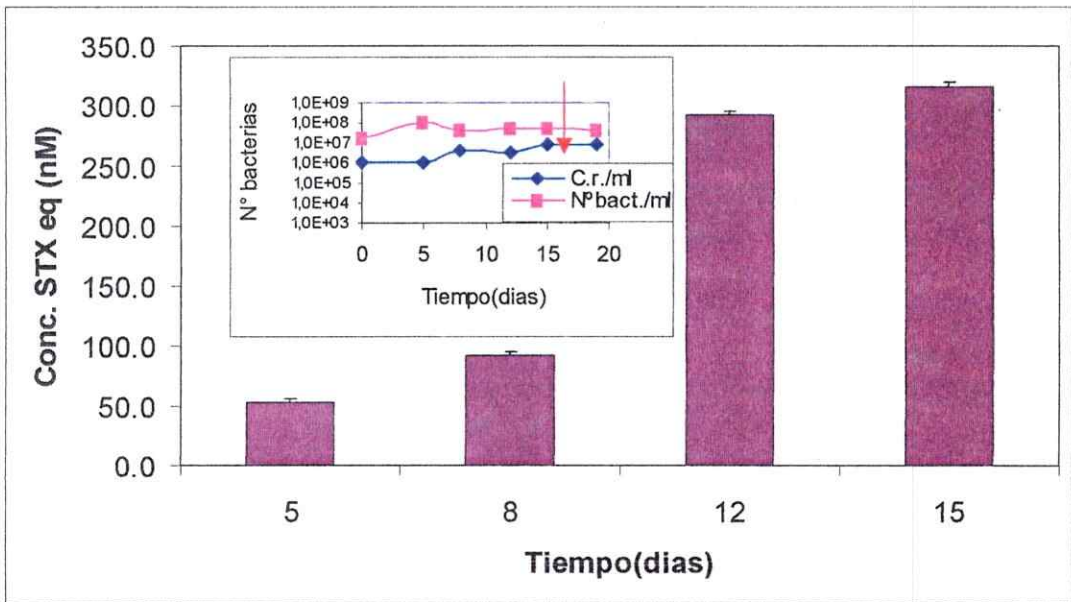


Figura 18. Producción de toxinas SCBs a 25°C por *C. raciborskii* SPC338 detectada mediante MNA. En el inserto la curva de crecimiento de *C. raciborskii* SPC338 y de bacterias contaminantes. Se indica con una flecha el comienzo visible de lisis celular

## VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se propuso que la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* productora de STX y sus análogos es un buen modelo para estudiar la ruta biosintética de STX. El cultivo de *C. raciborskii* elegido en esta tesis, corresponde a uno de los pocos en Sudamérica (todos aislados en Brasil), capaz de producir STX en vez de Cylindrospermopsina que es lo común para esta especie. Inicialmente, se pensó que el cultivo obtenido (SPC 338) era un cultivo clonal, pero como fue demostrado en el curso de esta tesis era un cultivo mixto compuesto de dos cepas estrechamente relacionadas. Por otro lado como ocurre con muchas de las especies de cianobacterias filamentosas es difícil obtener y mantener la axenicidad de los cultivos, en este contexto el cultivo SPC 338 no fue la excepción, no era axénico. Entre las especies de cianobacterias productoras de STX no hay cultivos axénicos disponibles y todos los intentos por obtener cultivos libres de bacterias contaminantes no fueron exitosos. Por esta razón, en los experimentos de amplificación y clonamiento de genes fue diseñado un protocolo de filtración y lavados que aseguraron obtener cultivos con menos de 1.000 bacterias contaminantes/ml. Este procedimiento garantizó que los genes amplificados y clonados correspondiesen solo a las cianobacterias.

Esta tesis incluye resultados obtenidos en una etapa inicial que consistió en la caracterización del cultivo SPC 338 mediante el clonamiento y secuenciación de los genes tipo NRPS y 16S rDNA, la detección del número de locus codificantes para NRPS, como así también la detección de toxinas SCBs mediante MNA. Esta etapa inicial fue llevada a cabo cuando aún se desconocía el carácter mixto del cultivo SPC

338, lo que llevó a generar cultivos clonales y escoger entre estos al nombrado C10 para futuros estudios.

Desafortunadamente para el análisis de los genes NRPS fue utilizado el DNA del cultivo SPC 338 ya que, como se mencionó antes, la evidencia de que este era un cultivo no clonal, se obtuvo en el transcurso de esta tesis. Sin embargo, el clonamiento en paralelo de los genes tipo NRPS y del gen 16S rDNA permitió verificar la procedencia de los ácidos nucleicos extraídos posteriormente al tratamiento de lavado del cultivo diseñado. El análisis de las secuencias de estos genes mediante la búsqueda de identidad demostró que los ácidos nucleicos extraídos correspondían a cianobacterias y aún más, presentaban una alta identidad con genes de la cianobacteria de la especie *C. raciborskii*. Este procedimiento permitió asegurar que los amplificadores obtenidos provenían de la cianobacteria y no de las bacterias contaminantes, demostrando además que el protocolo de lavado implementado previo a la extracción de ácidos nucleicos resultó exitoso.

El análisis de las secuencias aminoacídicas codificadas por el gen tipo NRPS detectado en *C. raciborskii* SPC 338 presentó un 43% de identidad con un módulo péptido sintetasa no ribosomal de *Nostoc punctiforme*. Los genes NRPS detectados en el cultivo SPC 338 son muy homogéneos y el análisis de restricción permitió detectar un solo patrón.

Los resultados del ensayo de hibridación en membrana usando como sonda un gen tipo NRPS proveniente de SPC 338 mostraron que secuencias tipo NRPS están presentes en forma repetida en el genoma de *C. raciborskii*, productora de STX. Sin embargo, no fue posible establecer que este es el número total de locus presentes ya que SPC 338 no resultó ser un cultivo puro sino una mezcla de cepas de *C. raciborskii*. No obstante, esta

hibridización demostró la presencia de este tipo de genes en esta cianobacteria productora de toxinas PSP. Esta afirmación resulta importante ya que ha sido demostrado que en la especie *C. raciborskii* los genes tipo NRPS y PKS están asociados a la producción de toxinas (Neilan, 1999; Kellmann y cols., 2006).

Con el objetivo de obtener información acerca del fenotipo del cultivo *C. raciborskii* SPC 338 se llevó a cabo la caracterización de la producción de toxinas SCBs en el sobrenadante de cultivo mediante la técnica del MNA, disponible en el laboratorio. Sin embargo, a pesar de ser un ensayo altamente sensible (posee un límite de detección de 10 nM), no es capaz de entregar el perfil de toxinas SCBs presentes en una muestra, ni distinguir entre los dos principales grupos de SCBs conocidas como la STX y análogos, y tetrodotoxina y análogos, por lo tanto un análisis de tipo químico como el HPLC-FLD resultó mucho más apropiado para determinar específicamente la naturaleza de las toxinas y además cuantificarlas (usando los estándares adecuados). El análisis del perfil de toxinas SCBs mediante HPLC-FLD del cultivo clonal *C. raciborskii* C10 fue realizado en colaboración con el Dr. Nestor Lagos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

A diferencia de otros trabajos descritos en la literatura, en esta tesis se realizaron cinéticas de producción de toxinas usando MNA o HPLC-FLD. En una primera instancia, el MNA sólo permite cuantificar la producción de toxinas SCBs sin embargo, al ser realizado a lo largo de una curva de 30 días entrega información acerca de la estabilidad de estas en el medio de cultivo y determina cómo es la forma de la curva de producción, es decir, si tiene un patrón similar a la curva de crecimiento del cultivo. El estudio de la estabilidad de las toxinas SCBs es un punto importante pues ha sido



descrito en cinéticas de producción de SCBs (determinadas por MNA) que en sobrenadantes de cultivo de cepas bacterianas obtenidas desde cholgas contaminadas con SCBs, existe la acumulación y luego la disminución de las toxinas en la fase estacionaria tardía de cultivo (trabajos anteriores del laboratorio). Los resultados obtenidos al analizar la cinética de producción de SCBs usando el ensayo del MNA en el sobrenadante de *C. raciborskii* SPC 338 indicó la presencia de estas toxinas en una alta concentración, llegándose a obtener valores de hasta 250 nM STX eq y 325 nM STX eq para cultivos crecidos a 19°C y a temperatura ambiente (rango entre 23-25 °C), respectivamente. La mayor concentración de toxinas en el cultivo a temperatura ambiente, se correlacionó con una mayor concentración de células en cultivo (3 a 4 veces mas biomasa). Sin embargo, a temperatura ambiente no se produjo 3 a 4 veces mas toxinas que a 19 °C, por lo que tal como se observa en otros sistemas a temperaturas mas altas se estimuló el crecimiento pero la síntesis de toxina por célula disminuyó (Saker y Neilan, 2000; Rapala y cols., 1993; Watanabe y Oishi, 1985). Por otra parte, la concentración de toxinas SCBs en ambas condiciones de cultivo, alcanzó un valor constante luego del día 17 en el caso del cultivo crecido a 19 °C y del día 50 para el crecido a temperatura ambiente, mostrando que las toxinas se mantuvieron estables en el sobrenadante de cultivo no detectándose un metabolismo de degradación o un agente degradativo de estas en *C. raciborskii* ni en el medio de cultivo, respectivamente. La producción de toxinas PSP en alta concentración por parte de *C. raciborskii* indica que estas toxinas juegan un papel biológico importante aún desconocido ya que utilizan una buena parte de la maquinaria celular en su producción implicando un gran gasto energético. Estudios en *C. raciborskii* T3 han determinado una relación entre la

acumulación de STX intracelular y bajos niveles de Na<sup>+</sup> celulares por lo que la toxina podría tener un rol en la mantención de la homeostasis de Na<sup>+</sup> cianobacteriana (Pomati y cols., 2003).

Por otra parte, la detección temprana de estas toxinas en el sobrenadante y su presencia en alta concentración antes de que se inicie la fase de muerte celular del cultivo indicó que estas no fueron liberadas exclusivamente por lisis natural sino que pudieron ser transportadas hacia el exterior de las células. Trabajos relacionados describen un gen transportador tipo ABC formando parte del cluster génico de producción de microcistina en *Microcystis aeruginosa* (Pearson y cols., 2004).

La estabilidad de las toxinas en el sobrenadante de cultivo es uno de los hechos mas notables pues considerando el pH alcalino del medio de cultivo se hubiera esperado que las toxinas fueran inestables observándose una inactivación o degradación hacia componentes no tóxicos, lo cual parece no ocurrir e implicaría un mecanismo de estabilización aun no determinado. Este fenómeno podría ser de una gran importancia para el monitoreo y detección de este tipo de bacterias en los efluentes y reservas de agua dulce.

Finalmente, el clonamiento del gen 16S DNA y su posterior análisis por ARDRA evidenció que el cultivo SPC 338 no se trataba de un cultivo puro sino de una mezcla de cepas. Para probarlo se obtuvo cultivos individuales a partir de células aisladas. Finalmente, se generó un cultivo clonal denominado C10. La caracterización del cultivo C10 consistió en el clonamiento del 16S rDNA, análisis por ARDRA y secuenciación,

amplificación de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rRNA y análisis de la producción de toxinas mediante HPLC-FLD.

Iniciando la caracterización fenotípica se realizó la detección de toxinas PSP en la fracción celular de C10 cultivada a temperatura ambiente. Esto permitió identificar las toxinas STX y GTX 2/3. Solo se detectó dc STX en cultivos a temperatura ambiente y en la fase estacionaria de cultivo. Si bien la concentración de toxina total por peso seco de cianobacterias fue en aumento, la concentración de cada toxina en el tiempo no mostró el mismo comportamiento. Las toxinas GTX 2/3 aumentaron su concentración en el tiempo, sin embargo la concentración de STX aumentó hasta el día 15 y luego disminuyó. En el caso de dc STX esta sólo fue detectada al día 30 de cultivo. Si se analizan los porcentajes de cada toxina por separado es posible observar que STX disminuyó luego del día 15 en la misma cantidad que apareció dc STX al día 30. Este resultado sugiere una biotransformación de un análogo en otro es decir, STX está dando origen a dc STX, probablemente por una acción enzimática.

La biotransformación de STXs ha sido descrita tanto en bacterias marinas Gram-negativas aisladas desde moluscos bivalvos (Smith y cols., 2001) como en *Vibrio* y *Pseudomonas* sp aisladas desde mejillones (Kotaki, 1989; Kotaki y cols., 1985a; Kotaki y cols., 1985b), sin embargo no existen descripciones al respecto en cianobacterias. En el trabajo de Smith y cols. (2001) se describe que aislados bacterianos obtenidos desde mariscos bivalvos cultivados en agar marino suplementado solo con STXs como fuente de carbono, fueron capaces de biotransformar y degradar estas SCBs (durante el seguimiento de las biotransformaciones de STXs fue utilizado HPLC-FLD). Este

experimento determinó que ciertos aislados bacterianos son capaces de llevar a cabo la transformación de GTX1/4 en GTX2/3 mediante reducción, como así también decarbamilación de GTX2/3 en dc GTX2 y dc GTX3, sulfatación de GTX y degradación de GTX1/4 y GTX5.

Por su parte Kotaki y cols. demostraron que es posible la transformación de GTX1, 2 y 3 y NEO en su análogo STX mediante la eliminación del hidrosulfato C-11 por reducción y el hidroxilo N-1. Basándose en estas evidencias es posible pensar que *C. raciborskii* C10 posee un mecanismo biotransformador que lleva a cabo, en fase estacionaria de crecimiento, la transformación de STX al análogo dc STX. Aunque fue posible detectar esta biotransformación de STX en dc STX no se ha tenido en cuenta la posibilidad de un cometabolismo de toxinas SCBs, es decir la existencia de un sustrato presente en el ambiente acuático que actúe como inductor, ya sea de la biotransformación de un análogo en otro o de la degradación de toxinas SCBs. En el trabajo de Jones y cols. (1994), ha sido descrito que una bacteria acuática (no especificada) posee mecanismos capaces de degradar microcistina (de origen cianobacteriano) que son activados solo cuando hay escasez de otras fuentes de carbono, por lo que sería posible pensar que enzimas responsables de la transformación de toxinas SCBs son susceptibles de represión por catabolito (Smith y cols., 2001).

El perfil de toxinas que presenta *C. raciborskii* C10 es distinto al descrito por Lagos y cols. (1999), para los aislados T2 y T3, siendo el primero productor de neoSTX y STX y el segundo productor de STX, C1 y C2. Debe tenerse en cuenta que en el estudio de Lagos y cols. la producción de toxinas PSPs fue determinada en la fracción celular de un cultivo en fase exponencial, y corresponde a una sola determinación, en tanto que los

resultados expuestos en esta tesis correspondieron a determinaciones realizadas siguiendo la cinética de producción de toxinas PSP.

La cepa *C. raciborskii* T2 (Lagos y cols., 1999) posee un perfil muy similar a C10 produciendo STX y GTX 2/3 en fase exponencial tardía pudiéndose esperar que dc STX hubiese sido detectada en fase estacionaria al igual que en C10. Este resultado se explica en base a que los cultivos C10 y T2 poseen el mismo origen geográfico (Lagos y cols., 1999).

Según la naturaleza química de las toxinas PSP producidas por *C. raciborskii* C10, el cultivo fue productor mayoritariamente de STX y en un menor grado productor de GTX (y análogos) y dc STX lo que también lo diferencia de lo descrito para T2 y T3. Según el porcentaje de producción, el día 9, STX constituyó el 96% de la toxina total producida y GTX2/3 el 4% (una razón de 1/30), pero esta cantidad disminuyó al día 30 cuando STX constituyó el 52% de la toxina total producida, GTX2/3 un 36.18% (una razón de 3/2) y dc STX el 11.6%. Lo descrito para T2/T3 indica una razón de 1/9 de STX y GTX2/3 (Lagos y cols., 1999).

Asumiendo que la STX podría ser sintetizada por parte de una maquinaria enzimática particular la diferencia en el perfil de toxinas entre los aislados C10 y T2/T3 descritos por Lagos y cols. (1999), puede ser explicada por dos vías: 1) *C. raciborskii* C10 posee una dote de genes propia distinta a la que poseen T2 y T3 pues es capaz de sintetizar (o convertir desde otro análogo) el análogo dc STX ó 2) T2, T3 y C10 poseen la misma dotación de genes pero cada cepa es regulada diferencialmente por una señal externa como la presencia o ausencia de un nutriente o la acción de un factor ambiental, que

genera la síntesis o la conversión de un análogo determinado. Estudios para dilucidar el punto están en progreso en el laboratorio.

Finalmente, la concentración de toxinas PSPs detectada en la fracción celular de *C. raciborskii* C10 fue 4 veces superior a la encontrada en el sobrenadante de cultivo (concentración expresada en molaridad) por lo que en caso de existir un mecanismo de transporte de toxinas SCBs hacia el medio de cultivo, este no fue mayoritario ya que estas permanecen en una mayor proporción dentro de la célula, constituyendo otra incógnita la razón de su almacenamiento.

El aislado *C. raciborskii* C10 posee, en medio líquido, las mismas características morfológicas que las descritas para los aislados descritos por Lagos y cols. (1999) (obtenidos del mismo sitio que SPC 338, cultivo que dio origen al aislado C10) ya que presentó tricomas aislados rectos de color verde-azulado, presencia de aquinetes, y formación de heterocistos terminales, sin embargo presentó un perfil de toxinas PSPs distinto, lo que dio cuenta de la plasticidad fenotípica de esta especie existiendo heterogeneidad aun entre aislados geográficamente cercanos. La evidencia encontrada en la caracterización fenotípica indica que la cepa *C. raciborskii* C10 es diferente a los cultivos T2 y T3 descritos por Lagos y cols. (1999).

Esta tesis demuestra que la caracterización de una cepa solo en base a características morfológicas no es adecuado (al menos en este linaje), o más bien poco riguroso, ya que un cultivo que es una mezcla de cepas con la misma morfología puede confundirse fácilmente, que es lo que suponemos le ocurrió a quienes obtuvieron el cultivo SPC 338. Los genes ribosomales (rRNA) son esenciales para la supervivencia de todos los organismos y son altamente conservados tanto en las bacterias como en los demás

reinos, por ello su secuenciación ha sido aplicada al estudio de las relaciones evolutivas entre los organismos como una especie de reloj molecular. El operón del rRNA es transcrito como un pre-transcrito que contiene las secuencias rRNA de los siguientes componentes en orden 5' a 3': 16S, espaciador, tRNA (este puede estar presente o no), espaciador, 23S, espaciador y 5S.

Este pre-transcrito es separado posteriormente en las moléculas de rRNA y tRNA. La caracterización del gen 16S ha sido establecida como un método de identificación de especies, género y familias de bacterias, sin embargo la secuencia de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S (ITS) permite una identificación a nivel de especie y cepa (Gurtler y Stanisich, 1996). Virtualmente en todas las especies, las copias múltiples de los genes de rRNA son casi o completamente idénticas y esta homogeneidad se cree que es gobernada por evolución concertada (Gurtler y Stanisich, 1996), sin embargo ha sido descrito que bacterias como el actinomiceto *Thermobispora bispora*, la arqueobacteria *Halobacterium marismortui* (Ueda y cols., 1999) y cianobacterias del orden *Nostocales* como *Aphanizomenon* y *Anabaena* presentan divergencia intra-cepa (Gugger y cols., 2002).

La secuenciación de los genes 16S rDNA de la cepa C10 indicó la presencia de 2 genes similares en un 98,78 % sobre 1.394 posiciones comparadas, es decir, existió intraheterogeneidad del gen 16S rDNA en esta cepa, es decir, la cepa C10 posee al menos 2 locus ribosomales cuyos 16S rDNA son heterogéneos en secuencia. La especie *C. raciborskii* presenta una alta heterogeneidad fenotípica existiendo descritos en literatura tanto aislados tóxicos como no tóxicos, productores de CYL y STX y de morfotipo curvo o recto, no pudiéndose asignar ninguna de estas características a un

origen geográfico en particular (Schembri y cols., 2001). Cabe pensar entonces que esta alta heterogeneidad fenotípica podría observarse también a nivel del gen 16S rDNA, sin embargo el alineamiento de los 16S rDNAs de los aislados de *C. raciborskii* descritos muestra un porcentaje de identidad superior al 98%, lo que indica una muy baja variabilidad entre estos.

La evidencia descrita por Gugger y cols. (2002), indica la presencia de heterogeneidad del operón ribosomal en el orden *Nostocales*, lo que concuerda con lo descrito en esta tesis, constituyendo posiblemente un fenómeno propio del orden.

La identidad del 16S rDNA tanto intragélica (entre genes de la cepa C10) como intercepa (aislados de distintas regiones fenotípicamente distintos) fue superior a un 98%, por lo tanto, un punto importante a destacar es que al momento de realizar una caracterización genotípica de una cepa de esta especie se debe llevar a cabo el clonamiento del 16S rDNA previo a los análisis por secuenciación.

La construcción de un árbol filogenético basado en el alineamiento múltiple de 26 secuencias de 16S rDNA (incluyendo los clones 24 y 41 de C10) mostró una politomía y que además estas cepas no se agruparon en relación al origen geográfico. Por lo anterior, la secuenciación del 16S rDNA no es la herramienta adecuada para realizar esta aproximación. La secuenciación del gen *nifH* que codifica para la dinitrogenasa reductasa y de la región espaciadora intergénica (IGS) entre las subunidades del ficobilisoma *cpcA* y *cpc*, provenientes de aislados de *C. raciborskii* originarios de diversos puntos alrededor del mundo, si permite un estudio filogenético adecuado puesto que los aislados fueron agrupados en "clusters" dependiendo del origen geográfico. El



árbol construido en base a secuencias de *nifH* agrupó los aislados en dos clusters, en uno se incluyen todos los aislados provenientes de Europa y Australia y en otro los provenientes de América. Resultados similares fueron encontrados al realizar un análisis de los espaciadores rRNA (ITS) por Janse y cols. (2003). El uso de ambas herramientas (secuenciación de *nifH* y *cpcBA*-IGS) fue capaz de agrupar los aislados de morfotipo curvo.

La amplificación de la región espaciadora entre los genes ribosomales 16S y 23S (utilizando partidores para Eubacteria) no develó mayor información acerca de la presencia de operones ribosomales distintos en el cultivo C10 o en el cultivo SPC 338 pues experimentos posteriores con partidores específicos para la región espaciadora de cianobacterias indicaron que los espaciadores obtenidos anteriormente correspondían a bacterias acompañantes propias del cultivo. Sin embargo, este análisis afirmó la importancia del lavado del cultivo previo a la extracción de ácidos nucleicos. El número de espaciadores obtenidos al realizar la amplificación desde DNA del cultivo C10 es mayor que los obtenidos a partir del DNA de SPC 338 (Fig. 16) lo que indicó que el protocolo de lavado fue mas eficaz en el segundo caso.

Con los resultados obtenidos en esta tesis puede concluirse que:

1. Es posible obtener desde los cultivos de *C. raciborskii* un DNA limpio de contaminaciones a través del protocolo de lavados diseñado en esta tesis, lo cual fue demostrado por el clonamiento en paralelo de los genes 16S rRNA y NRPS.

2. El cultivo SPC 338 es una mezcla de al menos dos cepas tal como lo indicó el clonamiento y análisis por ARDRA demostrando que no es adecuado realizar una caracterización de una cepa de este linaje solo en base a características morfológicas. La generación de cultivos clonales a partir de un solo tricoma evidenció que el clon C10 posee las mismas características morfológicas que los aislados brasileños T2 y T3 pero distinto perfil de toxinas.

3. La caracterización genética mediante secuenciación de los genes 16S rDNA de la cepa C10 indicó la presencia de 2 genes similares en un 98,78% evidenciando la existencia de intrahetrogeneidad genética. Este fenómeno ha sido descrito en otras especies del orden como *Aphanizomenon* y *Anabaena*.

El análisis de NRPS en SPC 338 indicó un 43% de identidad en secuencia aminoacídica con la cianobacteria *Nostoc punctiforme* y el ensayo de hibridación en membrana detectó un alto número de copias de este gen. No fue posible determinar que este es el número de locus debido al carácter mixto del cultivo SPC 338 ni tampoco establecer una correlación con la producción de STXs.

4. El porcentaje de similitud entre los genes 16S rRNA de una misma cepa (C10) fue parecido al detectado entre cepas geográficamente muy distantes. Lo anterior hace recomendable el clonamiento del 16 S rDNA al realizar una caracterización genotípica de cepas de esta especie.

5. La caracterización de *C. raciborskii* en base a la producción de toxinas permitió conocer que esta produce el mismo tipo de toxinas que la que se observa en dinoflagelados: STX, GTX2, GTX3 y dc STX.

6. La síntesis de STX por parte de *C. raciborskii* se vio influenciada por la temperatura de cultivo sin embargo aunque la mayor concentración de toxinas en el cultivo a temperatura ambiente se correlacionó con una mayor concentración de células en cultivo (3 a 4 veces mas biomasa) a temperatura no se produjo 3 a 4 veces mas toxinas que a 19 °C, tal como se observa en otros sistemas.

Algunos datos importantes obtenidos en esta tesis en relación al manejo de florecimientos de este tipo de cianobacterias son:

- Las toxinas SCBs permanecieron estables luego del día 50 a 19°C lo cual es destacable pues a pH levemente alcalino las toxinas deberían haber sido inactivadas.
- La alta concentración de las toxinas en el medio extracelular y su gran estabilidad debería ser de importancia para el monitoreo y detección de cianobacterias tóxicas en los efluentes y reservas de agua dulce donde los florecimientos pueden producir problemas de salud pública.

Los hallazgos de esta tesis demuestran que la simple filtración de cianobacterias productoras de toxinas PSP podría llegar a ser insuficiente en el tratamiento de aguas contaminadas y que procedimientos destinados a remover las toxinas deberían ser considerados aún después del decaimiento del florecimiento.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, D.G. 2000. Symbiotic Interactions. En Whitton B.A. y Potts M. (eds.), The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. pp 523-561. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
2. Azevedo, S.M.F.O. 1996. Current studies on toxic cyanobacteria (blue green algae) of Brazilian water bodies. En IV Congreso Latinoamericano de Ficología. July 28<sup>th</sup> to August 3<sup>rd</sup>. p.62. Caxambu, MG, Brazil.
3. Baker, P.D. y Humpage, A.R. 1994. Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray-Darling Basin. Aus. J. Mar. Freshwater Res. 45:773-786.
4. Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K. y Shimamatsu, H. 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. J. Appl. Phycol. 5:235-241.
5. Briand, J.F., Leboulanger, C., Humbert, J.F., Bernard, C. y Dufour, P. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? J. Phycol. 40:231-238.
6. Byth, S. 1980. Palm Island mystery disease. Med. J. Aust. 2:40-42.
7. Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. J. App. Bact. 72:445-459.
8. Carmichael, W.W. 1996. Liver failure and human deaths at a hemodialysis center in Brazil: microcystins as a major contributing factor. Harmful Algae News, IOC UNESCO. 15:11.
9. Carmichael, W.W., Evans, W.R., Yin, Q.R., Bell, P. y Moczydlowsky, E. 1997. Evidence of paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Garmont) comb. Nov. App. Env. Microbiol. 63:3.104-3.110.
10. Carmichael, W.W. y Falconer, I.R. 1993. En Falconer I.R., editor. Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. pp 187-679. London: Academic Press.
11. Carmichael, W.W. y Li, R.H. 2006. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. Saline Systems. <http://www.salinesystems.org/content/2/1/5>.
12. Castenholz, R.W. y Garcia-Pichel, F. 2000. Cyanobacterial responses to UV-radiation. En Whitton B.A. y Potts M. (eds.), The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. pp:591-611. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
13. Castro, D., Vera, D., Lagos, N., García, C. y Vásquez, M. 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. Toxicon. 44:483-489.
14. Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K. y Watanabe, M.M. 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. FEMS Microbiol. Ecol. 48:345-355.
15. DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 5685-5689.

16. Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
17. Dittman, E., Neilan, B.A., Erhard, M., von Döhren, H. Y y Börner, T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. *Mol. Microbiol.* 26:779-787.
18. Dittmann, E., Meißner, K. y Börner, T. 1996. Conserved sequences of peptide synthetase genes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycologia.* 35:62-67.
19. Espejo, R.T y Romero, J. 1997. Bacterial community in copper sulfide ores inoculated and leached with solution from commercial-scale copper leaching plant. *App. Env. Microbiol.* 63:1.344-1.348.
20. 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. *Res. Virol.* 144:93-102.
21. Espejo, R.T., Feijóo, C.G., Romero, J. y Vásquez, M. 1998. PAGE separation of the heteroduplex formed between PCR amplified 16S ribosomal RNA genes allows estimation of phylogenetic relatedness between isolates and assessment of bacterial diversity. *Microbiol.* 144:1.611-1.617.
22. Falconer, I.R. 1996. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia.* 6:11.
23. Ferris, M. y Hirsch, C.F. 1991. Method for isolation and purification of cyanobacteria. *App. Env. Microbiol.* 57:1.448-1.452.
24. Gaete, V., Canelo, E., Lagos, N. y Zambrano, F. 1994. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon.* 32:121-127.
25. Gallacher, S., 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.
26. Gugger, M., Lyra, C., Henriksen, P., Couté, A., Humbert, J.F. y Sivonen, K. 2002. Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1.867-1.880.
27. Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C. y Humbert, J.F. 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (cyanobacteria) isolated from four continents. *App. Env. Microbiol.* 71:1.097-1.100.
28. Gurtler, V.Y. y Stanisich, V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using 16S-23S spacer region. *Microbiology.* 142: 3-16.
29. Hobbie, J.E. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *App. Env. Microbiol.* 33:1.225-1.228.
30. Hopwood, D.A. y Sherman, D.H. 1990. *Ann. Rev. Genet.* 24:37-66.
31. Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W.E.A. y Zwart, G. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *App. Env. Microbiol.* 69:6.634-6.643.

32. 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. *App. Env. Microbiol.* 9:945-952.
33. Jones, G.J., Bourne, D.G., Blakeley, R.L. y Doelle, H. 1994. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins.* 2:228-235.
34. Katz, L. y Donadio, S. 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:875-912.
35. Kellman, R., Mills, T. y Neilan, B.A. 2006. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *J. Mol. Evol.* 62:267-280.
36. Kotaki, Y. 1989. Screening of bacteria wich convert gonyautoxin 2,3 to saxitoxin. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55: 1239.
37. Kotaki, Y., Oshima, Y. y Yasumoto, T. 1985a. Bacterial transformation of paralytic shellfish toxins. En Anderson D.M., White A.W. y Baden D.G. (eds.), *Toxic dinoflagellates.* pp:287-292. Elsevier Science Publishers, New York, N.Y.
38. Kotaki, Y., Oshima, Y. y Yasumoto, T. 1985b. Bacterial transformation of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and a marine snail. *Bull. Jpa. Soc. Sci. Fish.* 51: 1009-1043.
39. Krishnamurty, T., Carmichael, W.W. y Sarver, E.W. 1986. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue green algae): Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon.* 24:865-873.
40. Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.Q.F. y Oshima, Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon.* 37:1.359-1.373.
41. Lagos, N. 1998. Microalgal blooms: A global issue with negative impact in Chile. *Biol. Res.* 31:375-386.
42. 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.* 20:6.955-6.959.
43. Lehane, L. 2000. Paralytic Shellfish poisoning a review. National Office of Animal and Plant Health Agriculture, Fisheries and Forestry, Australia, Canberra.
44. 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.
45. Messing, J. 1983. *Meth. Enzymol.* 101:20-78.
46. 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.* 181:4.089-4.097.
47. Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Töröknéš, A. y Burns, B.P. 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.* 12:133-140.

48. Nishizawa, T., Ueda, K., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Ochi, K. y Shirai, M. 2000. J.Biochem. 127:779-789.
49. 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.
50. Onodera, H., Oshima, Y., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Bolch, C.J, Blackburn S. y Yasumoto T. 1996 Screening of paralytic shellfish toxins in freshwater cyanobacteria and chemical confirmation of the toxins in cultured *Anabaena circinalis* from Australia. En Yasumoto T., Oshima Y., Fukuyo Y. (eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. pp. 563-566. IOC UNESCO, Paris.
51. Oshima, Y. 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J. AOAC Int. 78:528-532.
52. Padan, E. y Cohen, Y. 1982. Anoxygenic photosynthesis. En Carr N.G. y Whitton B.A (eds.), The biology of cyanobacteria. pp 215-235. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
53. Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T, Dittman E. y Neilan. B.A. 2004. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. App. Env. Microbiol. 70:6.370-6.378.
54. Peñaloza, R., Rojas, M., Vila, I. y Zambrano, F. 1990. Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis aeruginosa* to zooplankton and fish. Freshwater boil. 24:233-240.
55. Pomati, F., Sacchi, S., Rosetti, C., Giovannardi, S., Onodera, H., Oshima, Y. y Neilan, B.A. 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix sp.FP1*: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. J. Phycol. 36:553-562.
56. Pomati, F., Rosetti, C., Calamari, D. y Neilan, B.A. 2003. Effects of saxitoxin (STX) and veratridina of bacterial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> fluxes: a prokaryote-based STX bioassay. App. Env. Microbiol. 69:7.371-7376.
57. Potts, M. 2000. Nostoc. En Whitton B.A. y Potts M. (eds.), The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. pp 465-504. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
58. Rapala, J., Sivonen K., Luukkainen, R., y Niñeémela, 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.
59. Rinehart, K.L., Namikoshi, M. y Choi, B.W. 1994. Structure and biosynthesis of toxins of blue green algae (cyanobacteria). J. Appl. Phycol. 6:159-176.
60. Robinson, N.J., Rutherford, J.C, Pocock, M.R. y Cavet, J.S. 2000. Metal metabolism and toxicity: repetitive DNA. En Whitton B.A. y Potts M.(eds.), The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. pp 443-463. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
61. Rocap, G., Distel, D.L., Waterbury, J.B. y Chisholm, S.W. 2002. Resolution of *Prochlorococcus* y *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal

- DNA internal transcribed spacer sequences. *App. Env. Microbiol.* 68:1.180-1.191.
62. Saitu N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
  63. Saker, M.L. y Neilan, B.A. 2001. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *App. Env. Microbiol.* 67:1.839-1.845.
  64. Saker, M.L. y Griffiths, D.J. 2000. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 39:349-354.
  65. 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.
  66. Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
  67. Schantz, E.J. 1975. Poisonous red tide organisms. *Env. Letters.* 9:225-237.
  68. Schembri, M.A., Neilan, B.A. y Saint, C.P. 2001. Identification in genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Env. Toxicol.* 16:413-421.
  69. Schopf, J.W. y Walter, M.R. 1982. Origin and early evolution of cyanobacteria: The ecological evidence. En Carr N.G and Whitton B.A (eds.); *The biology of cyanobacteria*. pp 543-564. Blackwell, Oxford and University of California Press, Berkeley.
  70. Seenayya, G. y Subba Raju, N. 1972. On the ecology and systematic position of the algae known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolsk.) Elenkin and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis*. En Desikachary.T.V. (Ed.), *Taxonomy and Biology of blue green algae*. pp:52-57. Madras.
  71. Shimizu, Y. 1996. Microalgal metabolites: a new perspective. *Ann. Rev. Microbiol.* 50:431-465.
  72. Sivonen, K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 35:12-24.
  73. Sivonen, K. y Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. En *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus I., and Bertram J. (eds.). pp 41-111. London:E. &F.N. Spon.
  74. Sommer, H. y Meyer, K.F. 1937. Paralytic shellfish poisoning. *Am. Med. Assoc. Arch. Pathol.* 24:560-598.
  75. Stal, J. 2000. Cyanobacterial mats and stromatolites. En Whitton B.A. y Potts M. (eds.), *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. pp 61-120. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
  76. Thompson, J.D., Higgins D.B y Gibson, T.J. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment trough sequence



- weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:42673-42680.
77. **Tillet, D. y Neilan, B.A.** 2000. Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *J. Phycol.*36:251-258.
  78. **Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida T. y Kataoka M.** 1999. Two mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J. Bacteriol.* 181:78-82.
  79. **Vincent, W.F.** 2000. Cyanobacterial dominance in the polar regions. En Whitton B.A. y Potts M. (eds.). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.* pp 321-340. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
  80. **Watanabe, M.F. y Oishi, S.** 1985. Effects of environmental factors of toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *App. Env. Microbiol.* 49:1342-1344.
  81. **Ward, D.M. y Castenholz, R.W.** 2000. Cyanobacteria in geothermal habitats. En Whitton B.A. y Potts M. (eds.). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.* pp:37-59. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
  82. **White, A.W.** 1988. Blooms of toxic algae worldwide: Their effects on fish farming and shellfish resources. *Proc Intl Conf Impact of Toxic Algae on Mariculture, Aqua-Nor 187 Exhibition, Trondheim, Norway, 13-8 August 1987.* 9-14.
  83. **Whittle, K. y Gallacher, S.** 2000. Marine toxins. *Brit. Med. Bull.* 56:236-253.
  84. **Whitton, B.A. y Potts, M.** 2000. *The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in Time and Space,* Kluwer Academic Publishers.
  85. **Wilson K., Schembri M., Baker P. y Saint C.** 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *App. Env. Microbiol.* 66:332-338.
  86. **Woloszynska, J.** 1912. Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit 10 Berücksichtigung des sawa-planktons. *Bull. Inter. Acad. Sci. Cracoviae, Ser. B.* 6:649-709.

## VIII. ANEXOS

## Anexo I

### **Análisis de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rRNA de los cultivos SPC 338 y el clon C10.**

#### Metodología

La amplificación de la región intergénica entre los genes 16S y 23S rRNA se realizó con los partidores L1 y G1 (Tabla 3) descritos por Jensen y cols. (1993) como específicos para bacterias. La electroforesis fue realizada en gel de poliacrilamida al 8% y tinción con nitrato de plata. La presencia de heteroduplexes se comprobó realizando un ciclo adicional a una dilución 1/10 del DNA amplificado inicial, esto con el propósito de obtener las moléculas de DNA en su estado de homodúplex (Espejo y cols., 1998). Un volumen de 20 µl del producto amplificado fue analizado también por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% (p/v).

#### Resultados

La amplificación de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S del operón ribosomal permite una discriminación a nivel de cepa y por lo tanto permitió investigar en forma más apropiada las diferencias entre los cultivos SPC 338 y C10.

Para la amplificación de los ITSs fueron utilizados los oligonucleótidos L1 y G1 (Tabla 3).

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% mostró, en ambos casos, la presencia de heteroduplexes, por lo que a una dilución 1/10 del DNA amplificado se le realizó un

ciclo adicional de amplificación con el propósito de obtener las moléculas de DNA en su estado de homodúplex como se describe en Metodología.

La resolución de los heteroduplexes mostró la presencia de 2 espaciadores de 650 y 800 pb para el caso del cultivo SPC 338 y 3 espaciadores de 300, 450 y 550 pb para el cultivo C10 (Fig. 19). Esto puede deberse a la presencia de locus ribosomales diferentes en los cultivos SPC 338 y C10 o bien a espaciadores de bacterias acompañantes que aparecen representados en mayor o menor cantidad dependiendo del tratamiento de lavado de los cultivos (este resultado fue tratado en la discusión).

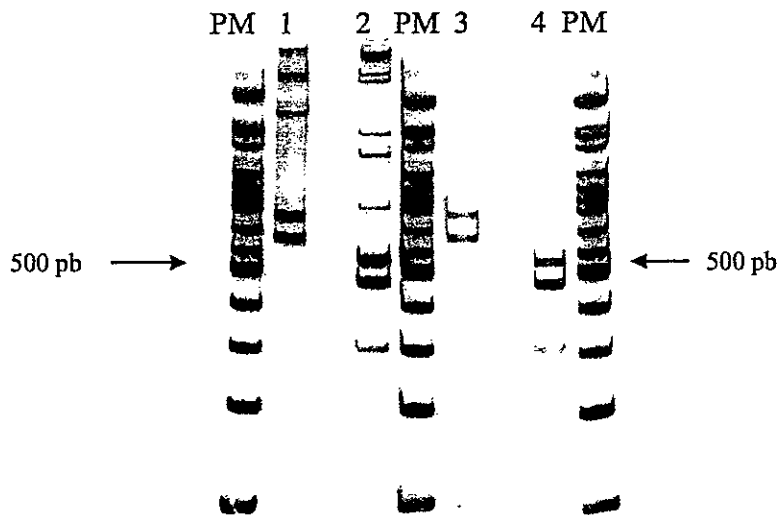


Figura 19. Aislamiento de los espaciadores de *C. raciborskii* SPC338 y C10. Cultivo SPC338 (1), C10 (2); resolución de los heteroduplexes formados por los ITS de los cultivos SPC338 y C10 (3 y 4). PM es marcador 100 bp plus Fermentas™.

## Anexo II

### Información del plasmidio pGEM-T Easy™(Promega )

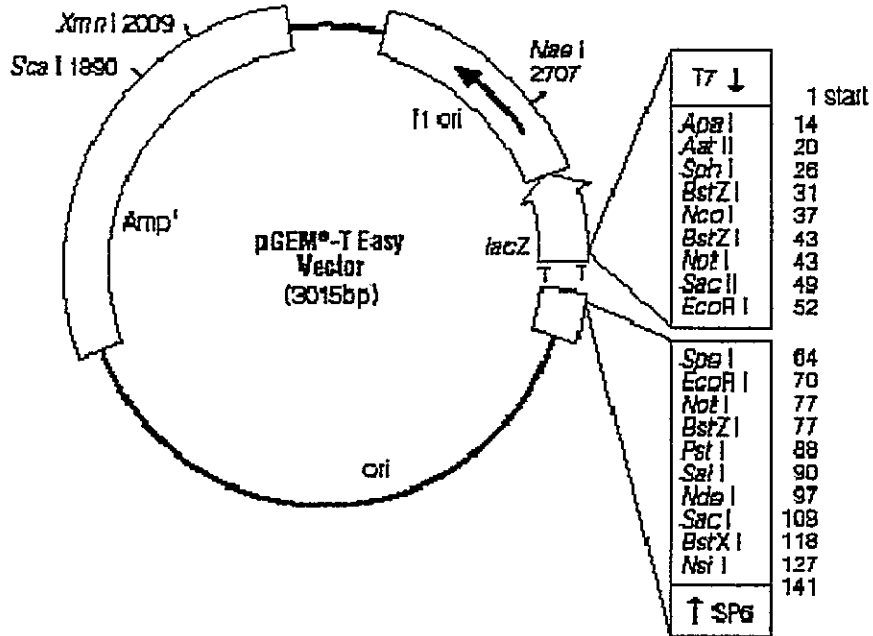


Figura 20. Información del plasmidio pGEM-T Easy™(Promega )

#### pGEM®-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3
SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
multiple cloning region	10-128
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
<i>lac</i> operator	200-216
$\beta$ -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2956-2972
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	176-192

## **Anexo III. Publicación**



## The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10

Daniela Castro<sup>a</sup>, Diana Vera<sup>a</sup>, Néstor Lagos<sup>b</sup>, Carlos García<sup>b</sup>, Mónica Vásquez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, Av. Macul 5540, Casilla 138-11, Santiago, Chile

<sup>b</sup>Laboratorio Bioquímica de Membrana, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70005, Correo 7, Santiago, Chile

Received 13 April 2004; revised 27 May 2004; accepted 9 June 2004

Available online 3 August 2004

### Abstract

*Cylindrospermopsis raciborskii* is a cyanobacterium which produces either cylindrospermopsine or paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. We studied the effect of temperature on growth and production of PSP toxins by *C. raciborskii* C10, isolated from a freshwater reservoir in Brazil. We analyzed the extracellular and intracellular content of PSP toxins at two different temperatures: 19 and 25 °C. *C. raciborskii* C10 produces STX, GTX2, and GTX3 at both temperatures.

dcSTX was also detected at 25 °C in the intracellular extracts obtained at the end of the stationary phase. The growth achieved at 25 °C and estimated by optical density at 700 nm was three times greater than at 19 °C. However, no significant differences were observed in the content of PSP toxins in either the cells or the extracellular media. The kinetics of accumulation of PSP toxins within the cells rather than in the media suggests an active PSP toxins-export process that is not related to cell lysis. The extracellular accumulation of PSP toxins at 19 °C suggested a biotransformation of STX to the epimers GTX2 and GTX3. The stability of the PSP toxins produced by *C. raciborskii* C10 was high enough for them to remain active in the media after 30 days (at 25 °C) or after 50 days (at 19 °C).

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Cylindrospermopsis raciborskii*; Paralytic shellfish poisoning toxins; Temperature effect; Saxitoxin

### 1. Introduction

Cyanobacteria are found throughout the world in different habitats. However, it is the freshwater habitat that typically experiences cyanobacterial 'blooms'. Nutrient-rich bodies of water, such as eutrophic lakes, agricultural ponds, or catch basins, may support a rapid growth of cyanobacteria (Whitton and Potts, 2000). *Cylindrospermopsis raciborskii* is a freshwater, planktonic cyanobacterium

that has the ability to produce toxic compounds that can potentially affect the health of humans and domestic animals. *C. raciborskii* has been described to produce cylindrospermopsine (CYL), a potent hepatotoxic alkaloid (Saker et al., 1999; Saker and Griffiths, 2000). Nevertheless, *C. raciborskii* strains isolated in Brazil from domestic water supplies have been described as producers of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002). PSP toxin-producing species do not produce CYL. *C. raciborskii* was originally described as a tropical microorganism (Woloszynska, 1912), but it has been increasingly reported from the temperate regions of Europe, Australia, and America (Chapman and Schelske, 1997; Padišák 1997, 1998; Saker and Griffiths, 2000, 2001).

\* Corresponding author. Address: Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, Av. Macul 5540, Casilla 138-11, Santiago, Chile. Tel.: +56-2-6781515; fax: +56-2-2214030.

E-mail address: mvasquez@inta.cl (M. Vásquez).

Thus, it has been recently isolated from three reservoirs and one river in Portugal, producing unknown toxins different from CYL and PSP toxins (Saker et al., 2003). In Germany, strains of the same species were isolated producing unknown toxins too (Fastner et al., 2003). The presence of *C. raciborskii* in freshwater reservoirs producing similar toxins to those produced by other cyanobacteria (Carmichael et al., 1997; Humpage et al., 1994; Mahmood and Carmichael, 1986) and by some dinoflagellates associated with red tides (Hallegraeff, 1993) raises further concerns about the importance of this cyanobacterium in drinking water and other freshwater supplies world-wide.

In general, the determination of the toxin concentration of new isolates or environmental samples has been mostly obtained from concentrated, lyophilized samples (i.e. cyanobacterial cells) and performed only at one time point in the growth curve of the culture (Humpage et al., 1994; Carmichael et al., 1997; Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002; Pereira et al., 2000). Therefore, in many cases it has not been possible to estimate the toxin profile or the toxin concentration during its cultivation. For the same reason, the potential existence of any biotransformation process has not been demonstrated. Thus, in order to define the process of PSP toxin production, it is necessary to determine the kinetics of PSP toxin-production both inside the cells and in the extracellular medium. Also, it is necessary to assess the stability of the PSP toxins in the medium. In the present study, we determined the effect of two moderate temperatures on both the growth and the intra- and extracellular production of PSP toxins of the filamentous freshwater cyanobacterium *C. raciborskii* C10, a clonal culture obtained from a mixed cyanobacterial culture isolated in Brazil (Lagos et al., 1999).

## 2. Material and methods

### 2.1. Organism and cultivation procedures

*Cylindrospermopsis raciborskii* SPC 338 culture was kindly provided by Maria Teresa de Paiva (Sao Paulo, Brazil). This culture was obtained by Pedro Zagatto from a branch of Billings water reservoir called Taquacetuba, in Sao Paulo, Brazil. Studies done previously (unpublished results) confirmed that SPC 338 corresponds to a mixed culture of *C. raciborskii* species. For that reason, a unialgal culture, named C10, was obtained from the culture SPC 338 and used for this study. Cultures were grown in MLA medium ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  49.4 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{NaNO}_3$  170 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  34.8 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.47 mg l<sup>-1</sup>; vitamin B<sub>12</sub> 0.05 µg l<sup>-1</sup>; thiamine HCl 0.1 mg l<sup>-1</sup>; biotin 0.05 µg l<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  4.36 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.58 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  22 µg l<sup>-1</sup>;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.006 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{NaHCO}_3$  169 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  29.4 mg l<sup>-1</sup>). Cultures were

initiated by aseptic transfer of 20 ml of a 20 day culture into 200 ml MLA in 1 l Erlenmeyer flasks. The incubation temperatures were 25 or 19 °C under white fluorescent light (40 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with a 12:12 h light–dark cycle). Aliquots were harvested at different times by centrifugation at 16,000g during 45 min. The buoyant cells present on top of the supernatant were not removed. The pellets and, depending of the sample, also the buoyant cells were lyophilized, weighed and stored at –20 °C. Supernatants were acidified with HCl to pH 4, and then lyophilized and stored at –20 °C until processed.

### 2.2. Growth measurements

Samples were taken under sterile conditions and turbidimetric estimation of cell concentration was done by measurement of optical density at 700 nm with a Metertek SP-830 spectrophotometer.

### 2.3. Mouse neuroblastoma assay

Sodium channel blocking (SCBs) toxins were detected in the supernatant of *C. raciborskii* C10 by a mouse neuroblastoma assay (MNA), as described before (Vásquez et al., 2001).

### 2.4. Extraction of toxins

The lyophilized cells were extracted following the method previously described by Lagos et al. (1999). Briefly, lyophilized cells of *C. raciborskii* C10 were extracted twice by sonication for 10 min in 500 µl of 0.05 M acetic acid (pH 5) and 1 ml chloroform/methanol (1:1, v/v). After sonication, the mix was centrifuged at 11,000 rpm for 10 min (SORVALL MC 12V), and the aqueous layer extracted. Toxins from lyophilized supernatants were extracted by sonication in 1 ml of acetic acid 0.05 M during 50 min, then centrifuged (11,000 rpm for 5 min, SORVALL MC 12V). Finally, the supernatant was recovered. Both pellet and supernatant toxin extracts were stored at –20 °C until used.

### 2.5. HPLC-FLD analysis of PSP toxins

The HPLC-FLD analysis was carried out following the same procedure and using the same equipment described before (Lagos et al., 1999). The mobile phases consisted of 2 mM 1-heptanesulfonic acid in 10 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.1) for the gonyautoxin (GTxs) group of toxins and 2 mM 1-heptanesulfonic acid in 30 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.1) containing 3 vol% of acetonitrile for the saxitoxin (STxs) group, pumped at a flow rate of 0.7 or 0.8 ml min<sup>-1</sup>. Samples were continuously oxidized with 7 mM periodic acid in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 9.0, 0.3 ml min<sup>-1</sup>) while passing through a Teflon tubing (after passing through the column),



and acidified with 0.5 M acetic acid ( $0.25 \text{ ml min}^{-1}$ ) before entering a fluorescence detector.

The detection of false GTX peaks was achieved by replacing the oxidizing reagent with distilled water, where only mild oxidation occurred and only fluorescence of real GTX1 and GTX4 should be observed (Lagos et al., 1999; Pereira et al., 2000). Toxin concentrations were determined by comparing peak areas for each toxin with those of standards. As an external standard, pure toxin solutions calibrated by combustion analysis nitrogen measurements and HPLC-MS were used (Andrinolo et al., 2002).

### 3. Results

#### 3.1. Characteristics of *C. raciborskii* C10

*C. raciborskii* C10 is a filamentous cyanobacterium, generally straight, 20–200  $\mu\text{m}$  long, without mucilaginous sheaths. Single conical heterocysts were observed at the ends of some trichomes. Oval-shaped akinetes were also observed between vegetative cells (Fig. 1). Morphologically, strain C10 is undistinguishable from other *C. raciborskii* strains described before (Lagos et al., 1999; Saker et al., 1999; Molica et al., 2002). However, C10 strain can be recognized by molecular methods and ribosomal gene analysis (Vásquez, unpublished results). Toxin production was evaluated, in a preliminary way, with the mouse neuroblastoma assay. Around 250–300 nM STX equivalent were detected in the extracellular medium after 30 days of culture at 25 °C, and it was stable after this time. The sample media was not acidified at pH around 4–5 before being stored at –20 °C. This fact could be the cause of the differences detected when performing HPLC-FLD analysis.

#### 3.2. Effect of temperature on growth and PSP toxin content

Growth of *C. raciborskii* C10 was tested at 19 and 25 °C. Maximal biomass estimated by optical density at 700 nm reached during cultivation at 25 °C was around 3–5 times greater than that reached at 19 °C, from 0.353–0.309 to

0.986–1.8 (Figs. 2A and 3A). However, the intracellular contents of each PSP toxin, measured as  $\text{nmol mg}^{-1}$  of dry weight, d.w., were on average not different between cultures grown at the two different temperatures (Figs. 2B and 3B). After 30 days culture, at 25 °C the cells changed color typically green to brown, and the trichomes were shorter, suggesting decay of the cells.

At 25 °C, *C. raciborskii* C10 produced STX, GTX2, GTX3, and dcSTX at the end of the stationary phase (30 days) (Fig. 2B). On the other hand, dcSTX was not detected in the cultures at 19 °C. Only SXT, GTX2 and GTX3 could be detected at this temperature (Fig. 3B and C). At both temperatures, PSP toxins detected in the extracellular medium were very stable even after long incubation times. The period analyzed in both conditions was chosen considering the time when cells start to decay: 50 days for 19 °C and 30 days for 25 °C.

The pH of the medium is considered to be an important factor in the stability of the toxins. In this study, the pH was always around 9 (data not shown).

#### 3.3. Production of PSP toxins at 25 vs 19 °C, intracellular analysis

Intracellular STX concentrations at 25 °C were around 1.2–1.5  $\text{nmol mg}^{-1}$  during 30 days culture (Fig. 2B). At the beginning of the stationary phase, STX concentrations were around four and eight times higher than those of GTX2/GTX3 at 25 and 19 °C, respectively. STX appeared before the epimers GTX2/GTX3 under both culture conditions. A relatively constant level of STX was observed at 25 °C after 30 days of culture; however, two peaks of STX production were noted at 19 °C during the 50 days of culture (Figs. 2B and 3B).

The intracellular contents of GTX2/GTX3 epimers at 25 °C showed a constant increment during the 30 days of culture, from undetectable up to 0.5–0.6  $\text{nmol mg}^{-1}$ . At 19 °C, on the contrary, the toxin content increased at two points (at 17 and 40 days): from undetectable to 0.1–0.3  $\text{nmol mg}^{-1}$ , and from 0.1 to 0.6–0.7  $\text{nmol mg}^{-1}$ , respectively.

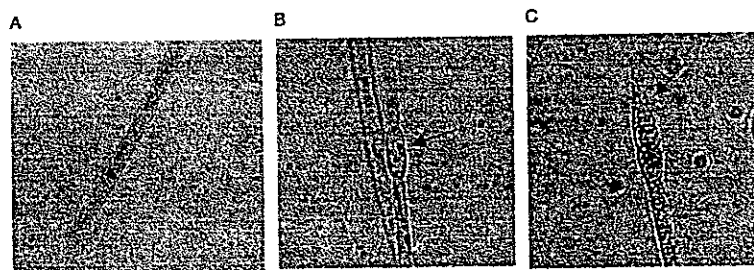


Fig. 1. Optical microscopy of the strain *Cylindrospermopsis raciborskii* C10 filaments, isolated from Billings reservoir in Sao Paulo, Brazil. (A) Single straight trichome in vegetative state. (B) Trichomes with one single oval akinete (arrow). (C) Trichome showing characteristic apical heterocyst (arrow).

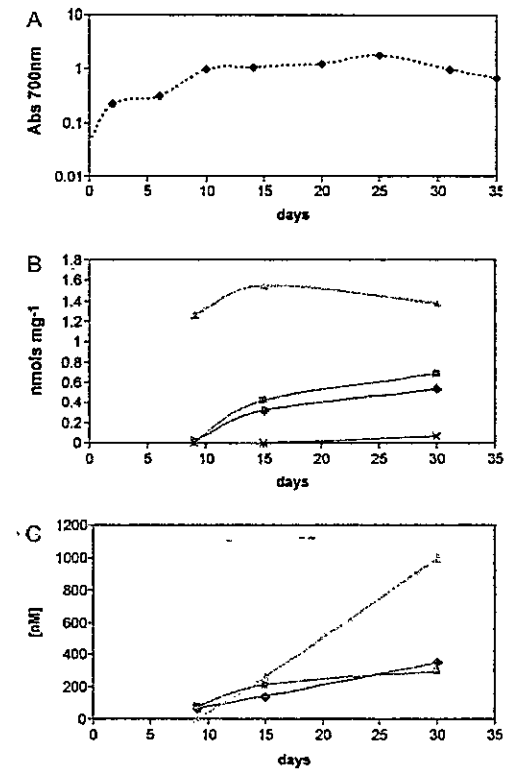


Fig. 2. Intracellular and extracellular contents of the PSP toxins detected by HPLC-FDL from *C. raciborskii* C10 culture at 25 °C. (A) Growth curve estimated by Absorbance at 700 nm, at 25 °C (—◆—). (B) Intracellular concentration (nmol mg<sup>-1</sup>). (C) Extracellular concentration (nM) of STX (—△—), GTX2 (—◇—), GTX3 (—□—), and deSTX (—×—).

Since GTX2 and GTX3 are epimers, similar concentrations of both could be expected. This is what we found at both temperatures, which supports the accuracy of the data.

### 3.4. Production of PSP toxins at 25 vs 19 °C, extracellular analysis

High levels of PSP toxins were detected in the culture medium from the beginning of the stationary phase at 19 °C. In contrast, high levels of STX were detected only at the late stationary phase at 25 °C. The biomass reached at 25 °C was three times higher than at 19 °C. However, the PSP toxin concentration was always higher at 19 than at 25 °C. STX and GTX2/GTX3 epimers were around 1.6 and 5 times higher, respectively (Figs. 2C and 3C). The maximal concentration of GTX2/GTX3 epimers was detected after 30 days at both temperatures, being 1250–1600 nM at 19 °C and 300 nM at 25 °C.

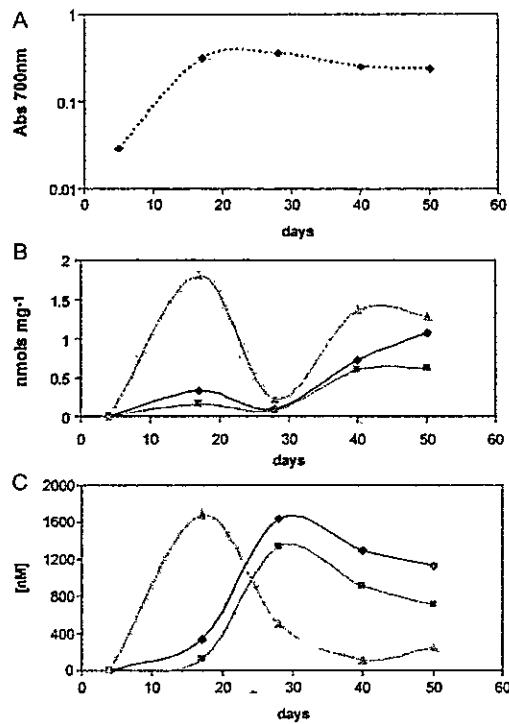


Fig. 3. Intracellular and extracellular contents of the PSP toxins detected by HPLC-FDL from *C. raciborskii* C10 culture at 19 °C. (A) Growth curve estimated by absorbance at 700 nm, at 19 °C (—◆—). (B) Intracellular concentration (nmol mg<sup>-1</sup>). (C) Extracellular concentration (nM) of STX (—△—), GTX2 (—◇—), GTX3 (—□—).

The extracellular concentration of GTX2/GTX3 epimers detected at 25 °C showed the same changes with time as those observed inside the cells. On the contrary, a large increase in the production of GTX2/GTX3 epimers and concomitant decrease in STX were observed at 19 °C. This result suggests that STX could be biotransformed to produce GTX2/GTX3 epimers in the extracellular medium.

### 3.5. PSP toxins stability

The stability of PSP toxins in the culture medium was evaluated in order to detect spontaneous chemical transformation. A mix of GTX toxins (GTX1/GTX4 epimers, GTX2/GTX3 epimers and GTX5) was prepared in MLA medium and incubated at 25 °C under the same culture conditions as *C. raciborskii* C10. Samples were taken for HPLC-FLD analysis. After 40 days, the concentrations of GTX2/GTX3 epimers and GTX5 were similar to those detected at the beginning of the culture. On the other hand, GTX1/GTX4 epimers were undetectable by HPLC after 10 days (data not shown).

### 3.6. PSP toxins imposters

Reports have described, and also shown here in Section 2, a way to confirm the chemical nature of the PSP toxins: changing the oxidant to water. Thus it is possible to distinguish the existence of imposter molecules with similar retention times as PSP toxins by HPLC-FLD method (Lagos et al., 1999; Pereira et al., 2000; Baker et al., 2003). We found, during the *C. raciborskii* C10 cultivation some peak signals either from the cells or extracellular media with retention times similar to GTX1/GTX4 epimers but that corresponded to GTX1 and GTX4 imposters (data not shown). These data were not considered for further analysis.

## 4. Discussion

*C. raciborskii* was initially described as a cylindrospermopsin (CYL) producing species (Padišak, 1997; Saker and Griffiths, 2000). However, since the first strains were reported as PSP toxin-producing, this species acquired importance in the contamination of water reservoirs (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002). Our results show that *C. raciborskii* C10 may produce and accumulate intracellularly high amounts of STX, GTX2, GTX3, as well as dcSTX at 25 °C. Besides, the PSP toxins produced were released to the culture medium and were stable for long periods (at least 30 days at 25 °C and 50 days at 19 °C). The stability of PSP toxins varies depending on the structures and pH. Saxitoxin is extremely stable even at high temperature at a low pH. However, above pH 8 it degrades, even at ambient temperature (Shimizu, 2000). The pH during cultivation of *C. raciborskii* C10 was always around 9–10. Thus, at this pH perhaps the PSP toxins present in the extracellular media should be unstable and the concentration measured by HPLC may be underestimated. Nevertheless, the results obtained by HPLC analysis showed that the most toxic molecule, i.e. STX, was unusually stable in the culture conditions, as shown in Fig. 2B. If chemical inactivation happened, i.e. the breakdown of the STX molecule into non-toxic compounds, the STX should not have been detectable in the extracellular media and that was not the case.

One of the most remarkable features of *C. raciborskii* C10 was the higher production of PSP toxins at the lower temperature assayed. This was also observed by Saker and Griffiths (2000). These authors reported that cultivation of *C. raciborskii*, a cylindrospermopsin-producing strain, below the optimal temperature decreased the maximal biomass reached, and increased toxin production. In our case, it was also possible to observe changes in the toxin profile. At 25 °C, and at the end of the stationary phase, we detected low amounts of dcSTX, only intracellularly. This is the first report of dcSTX production by *C. raciborskii*. For some toxic cyanobacteria, in contrast to our results, the highest toxin production is associated with conditions

conducive to growth (Sivonen and Jones, 1999). However, examples consistent with our results have been described in species from the genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*, both anatoxin-a producers. The content of this toxin was three times higher at 20 °C than at 30 °C (Rapala et al., 1993). The same phenomenon was observed in the microcystin content of *Microcystis aeruginosa* (Watanabe and Oishi, 1985).

Interestingly, the close phylogenetic relationships among the different isolates of *C. raciborskii* (Neilan et al., 2003; Vázquez unpublished results); and the same toxin regulation behavior of this species suggest that CYL-producing and PSP toxins-producing species may have toxigenic genes which are under similar genetic background, regulated in the same way by the same regulation system. Recently, Rantala et al. (2004) obtained strong evidence that the genes coding for nodularin synthase have evolved recently from those encoding microcystin synthase. A similar relationship could exist between genes for saxitoxin (STX) and cylindrospermopsin (CYL) synthesis. Although these genes have not been yet identified, the close phylogenetic relationships between STX and CYL-producing isolates of *C. raciborskii* (Neilan et al., 2003; Vázquez unpublished results), and their similar response to temperature point in this direction.

The early detection and the high intracellular content of STX in *C. raciborskii* C10 at 19 and 25 °C is also an interesting feature. Usually toxins have been described as secondary metabolites which are not essential for cell growth. Synthesis of a secondary metabolite is considered to take place during the stationary phase. However, *C. raciborskii* C10 started synthesizing STX rather early.

We found significant differences between the intracellular and extracellular content of PSP toxins at both temperatures studied. This characteristic was more remarkable at 19 than at 25 °C. If the presence of PSP toxins in the medium had been the consequence of cell lyses, we should have detected a constant increase in all toxins with time. At 19 °C, however, we observed a clear decrease in STX concentration and a concomitant increase in GTX2/GTX3 epimers concentrations in the extracellular medium (Fig. 3B). The increase was not related to the concentrations detected in the cells. Therefore, our results suggest export of STX to the extracellular medium. In the case of GTX2/GTX3 epimers, concentrations detected can be explained either by an active transport to the extracellular medium or by STX transformation.

Sako et al. (2001) proposed a hypothetical pathway of PSP toxin transformation in *Gymnodinium catenatum* with the participation of sulfotransferase enzymes (ST). STX can be the precursor of GTX2 and GTX3 by C-11 oxidation and further the 11- $\alpha,\beta$ -hydroxy STX produced sulfated by a *O*-sulfotransferase producing GTX2 and GTX3, being subsequently converted to C1 and C2. The reverse of this pathway was proposed by Taroncher-Oldenburg et al. (1997) for a synchronically growing culture of

*Alexandrium fundyense*, where C2 would be converted to GTX2 and GTX3. Finally, STX could be produced from the GTX2/GTX3 epimers. In our case, the results obtained at 19 °C suggest that STX was transformed to produce GTX2 and GTX3. Because *C. raciborskii* C10 is a not axenic culture we cannot discard the influence of other bacteria on this biotransformation process at extracellular level. However, if those bacteria are important in the biotransformation process they should have different effects depending of the incubation temperature.

Recently, Pomati et al. (2003a,b, 2004) demonstrated the relationship between Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes with the presence of STX in the PSP toxin-producing *C. raciborskii* T3. These authors suggested that either STX metabolism or the toxin itself could be linked to the maintenance of cyanobacterial homeostasis. Within this context, three questions arise: why are different STX analogs synthesized? why do they show up at different proportions during cultivation? and, what is the effect of the incubation temperature on the whole process?. In the case of *C. raciborskii* C10, we have shown that temperature influences both the intra- and extracellular contents of PSP toxins and the toxin profile. The mechanisms regulating the process and the relationship to the Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes, however, remain unknown.

Finally, the persistence of PSP toxins in the medium is a matter of critical importance for water reservoir management. Cyanobacterial toxins affect many components of aquatic ecosystems. Toxic effects of cyanobacteria have been demonstrated on fish, certain zooplankton species, and macrophytes (Christoffersen, 1996). Different organisms may differ in their sensitivity to the PSP toxins and this sensitivity may depend on the particular strain (or even clone) of cyanobacterium present as well as on the stage of the life cycle of the organism. Thus, cyanobacterial toxins may alter food web structure in aquatic ecosystems (Sivonen, 2000). Results presented in this study demonstrate that GTX2/GTX3 epimers and STX are stable even at pH above 9 for a long period of time. Our results suggest that either GTX2/GTX3 epimers or STX may be stabilized in the medium by complexation or binding with other substances. Simple water filtration may, thus, be unsafe for treatment of water supply and removal of the PSP toxins should be considered even after cyanobacterial bloom decay.

#### Acknowledgements

We thank Maria Teresa de Paiva for providing the toxic *C. raciborskii* culture and Veronica Flores for her help assistance with the microscopy preparations. The work has been supported by DI-U. de Chile (CSMAR 02/5-2), Fundación Andes (C-13680/5) Grant, FONDECYT # 1020090, and Programa de Cooperación Científica Internacional GRICES/CONICYT. D.C. has a PhD student CONICYT fellowship.

#### References

- Andrinolo, D., Iglesias, V., García, C., Lagos, N., 2002. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon* 40, 699–709.
- Baker, T.R., Doucette, G.J., Powell, C.L., Boyer, G.L., Plumley, F.G., 2003. GTX(4) imposters: characterization of fluorescent compounds synthesized by *Pseudomonas stutzeri* SFPS and *Pseudomonas/Alteromonas* PTB-1, symbionts of saxitoxin-producing *Alexandrium* spp. *Toxicon* 41, 339–347.
- Carmichael, W.W., Evans, W.R., Yin, Q.Q., Bell, P., Moczydlowski, E., 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbyella wollei* (Farlow ex Gomont) comb.nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3104–3110.
- Chapman, A.D., Schelske, C.L., 1997. Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. *J. Phycol.* 33, 191–195.
- Christoffersen, K., 1996. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* 35, 42–50.
- Fastner, J., Heinz, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I., 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42, 313–321.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79–99.
- Humpage, A.R., Rositano, J., Bretag, A.H., Brown, R., Baker, P.D., Nicholson, B.C., Steffensen, D.A., 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian blue-green algal (cyanobacterial) blooms. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 45, 761–771.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P., Andrinolo, D., Azevedo, S., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359–1373.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 24, 175–186.
- Mollica, R., Onodera, H., García, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S., Lagos, N., 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Pernambuco, Brazil. *Phycologia* 41, 606–611.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Török, A., Burns, B.P., 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.* 12, 133–140.
- Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol.* 107, 563–593.
- Padisák, J., 1998. Sudden and gradual responses of phytoplankton to global climate change: case studies from two large, shallow lakes (Balaton, Hungary, and the Neusiedlersee, Austria/Hungary). In: George, D.G., Jones, J.G., Puncocchar, P., Reynolds, C.S., Sutcliffe, D.W. (Eds.), *Management of Lakes and Reservoirs during Global Change*. Kluwer, London, pp. 111–125.
- Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N., Oshima, Y., 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38, 1689–1702.
- Pomati, F., Neilan, B., Suzuki, T., Manarolla, G., Rossetti, C., 2003a. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by

- lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (nostocales). *J. Phycol.* 39, 535–542.
- Pomati, F., Rossetti, C., Calamari, D., Neilan, B.A., 2003b. Effect of saxitoxin (STX) and veratridine on bacterial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  fluxes: a prokaryote-based STX bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7371–7376.
- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A., 2004. Interactions between intracellular  $\text{Na}^+$  levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150, 455–461.
- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K., 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *PNAS* 101, 568–573.
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., 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.
- Saker, M.L., Griffiths, D.J., 2000. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 39, 349–354.
- Saker, M.L., Griffiths, D.J., 2001. The occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya and Subba Raju in a north Queensland domestic water supply. *Mar. Freshwater Res.* 52, 907–915.
- Saker, M.L., Neilan, B.A., Griffiths, D.J., 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *J. Phycol.* 35, 599–606.
- Saker, M.L., Nogueira, I.C., Vasconcelos, V.M., Neilan, B.A., Eaglesham, G.K., Pereira, P., 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 243–250.
- Sako, Y., Yoshida, T., Ushida, A., Arakawa, O., Noguchi, T., Ishida, Y., 2001. Purification and characterization of a sulfotransferase specific to N-21 of Saxitoxin and Gonyautoxin 2 + 3 from the toxic dinoflagellate *Gymnodium catenatum* (dinophyceae). *J. Phycol.* 37, 1044–1051.
- Shimizu, Y., 2000. Paralytic shellfish poisoning (PSP): chemistry and mechanism of action. In: Botana, L.M., (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 151–172.
- Sivonen, K., 2000. Freshwater cyanobacterial neurotoxins: ecobiology, chemistry, and detection. In: Botana, L.M., (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 567–581.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water*. Spon, London, pp. 41–111.
- Taroncher-Oldenburg, G., Kulis, D.M., Anderson, D.M., 1997. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1178–1188.
- Vásquez, M., Grüttner, C., Gallacher, S., Moore, E., 2001. Detection and characterization of toxigenic bacteria associated with *Alexandrium catenella* and *Aulacomyxa ater* contaminated with PSP. *J. Shell. Res.* 20, 1245–1249.
- Watanabe, M.F., Oishi, S., 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1342–1344.
- Whitton, B.A., Potts, M., 2000. Introduction to the cyanobacteria. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer, Dordrecht, pp. 1–11.
- Woloszynska, J., 1912. Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des sawa-planktons. *Bull. Inter. Acad. Sci. Cracoviacs, Ser. B* 6, 649–709.