



Foto: INIA

Equipo de muestreo de INIA, tajamar en la Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate (INIA Las Brujas).

DIVERSIDAD DE CIANOBACTERIAS EN CUERPOS DE AGUA DE USO AGROPECUARIO: desafíos, oportunidades y abordaje molecular

Dra. Lic. Biol. MSc. María Teresa Federici¹, Lic. Bioq. MSc. Natalia Rigamonti², Dr. Ing. Agr. MSc. Pablo Rovira³, Ing. Agr. MSc. Pablo Torres¹, Lic. Biol. MSc. Graciela Ferrari⁴, Lic. Biol. MSc. Claudia Simón¹, Dr. Ing. Agr. MSc. Claudio García^{1,5}, Téc. Agr. Adriana Reggio⁵, Dra. Ing. Agr. MSc. Verónica Ciganda¹

¹Área Recursos Naturales, Producción y Ambiente - INIA

²Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios - LATU

³Sistema Ganadero Extensivo - INIA

⁴Departamento de Calidad de Agua y Evaluación Ambiental - LATU

⁵Sistema Vegetal Intensivo - INIA

Este artículo aporta información sobre diversidad de especies de cianobacterias y cianotoxinas presentes en distintos cuerpos de agua del país, tanto para evaluar el riesgo de intoxicación como para identificar cepas nativas con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

En las últimas décadas, las cianobacterias han recibido una creciente atención científica y pública debido al impacto que provoca el aumento abrupto de una o algunas poblaciones sobre el ecosistema acuático, lo que se conoce como floraciones o *blooms*. El enriquecimiento de nutrientes debido a la

intensificación de la agricultura, junto a la construcción de embalses para la generación de energía eléctrica en los que se controla artificialmente el flujo de agua y su tiempo de residencia han generado un entorno favorable para la proliferación de las cianobacterias planctónicas¹.

COMPUESTOS BIOACTIVOS Y SU POTENCIAL APLICACIÓN

Las cianobacterias pueden secretar diversas toxinas, que afectan la salud humana, la fauna acuática y el ganado. Por otro lado, también existen especies que segregan compuestos bioactivos que promueven el crecimiento de las plantas y mejoran su resistencia a enfermedades y al estrés ambiental. Entre estos compuestos se destacan antibacteriales, antialgales, antiprotozoarios, antivirales y antitumorales. Una especie de cianobacteria a la que se le ha prestado especial atención en los últimos años es la *Spirulina (Arthrospira)* por ser fuente de proteínas, pigmentos, vitaminas, minerales ácidos grasos esenciales, carotenoides y otros compuestos clave en la producción de alimentos. El uso de esta especie en la industria alimentaria debe ir acompañado de su correspondiente análisis de toxinas, sin embargo, estos análisis no siempre son realizados por los organismos de contralor. Existen potenciales aplicaciones y usos de las cianobacterias en sectores que van desde la bioenergía y biocombustibles, agricultura, alimentación humana y animal, industria biomédica y farmacéutica, cosmética, biopolímeros hasta la biorremediación de ambientes contaminados con plásticos, petróleo, etc. Conocer la diversidad de géneros y especies en los cuerpos de agua de nuestro país, es importante tanto para prevención de riesgos de intoxicación como para identificar cepas nativas o genes asociados con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA Y ANIMAL

Las cianobacterias se encuentran en casi todo ecosistema acuático, debido a su capacidad de sobrevivir en los ambientes más extremos, y, por lo tanto, las cianotoxinas pueden encontrarse en la mayoría de los cuerpos de agua del país, usualmente

Existen potenciales aplicaciones y usos de las cianobacterias en sectores que van desde la bioenergía y combustibles, agricultura, alimentación humana y animal, industria biomédica y farmacéutica, cosmética, biopolímeros; hasta la biorremediación de ambientes contaminados.

en bajas concentraciones y solamente detectables con métodos analíticos altamente sensitivos. Las principales toxinas son hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatoxinas. La posibilidad de que estas toxinas alcancen concentraciones relevantes para las evaluaciones de riesgo se relaciona con los grupos taxonómicos potencialmente productores de toxinas, que proliferan en condiciones eutróficas, con alto contenido de nutrientes. En nuestro país, existe un servicio de detección de cianotoxinas en el Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), mediante las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) o HPLC (*high performance liquid cromatography*). Se han determinado niveles de alerta basados en las concentraciones de toxinas que corresponden a valores de referencia para la salud, dependiendo si es para agua recreacional o potable¹ (Cuadro 1). Sin embargo, muchos de estos valores son provisionales, ya que no existen datos disponibles para determinarlos. En Uruguay, el Decreto 253/79 y sus modificaciones determina los máximos permitidos de variables fisicoquímicas, de nutrientes y otros contaminantes según clasificación de cursos de agua, sin embargo, este no reglamenta máximos permitidos en cuanto a cianobacterias y/o cianotoxinas.

Cuadro 1 - Valores guía y valores de referencia basados en la salud para las principales toxinas en distintos escenarios de exposición¹.

Toxina	Exposición	Valor (µg./L)	Tipo de valor
Microcistina-LR	Agua potable (a lo largo de la vida)	1	valor guía provisional
Microcistina- LR	Agua potable (corto plazo) ^a	12	valor guía provisional
Microcistina- LR	Agua potable (recreacional)	24	valor guía provisional
Cilindrospermopsina	Agua potable (a lo largo de la vida)	0,7	valor guía provisional
Cilindrospermopsina	Agua potable (corto plazo) ^a	3	valor guía provisional
Cilindrospermopsina	Agua potable (recreacional)	6	valor guía provisional
Anatoxina- a	(corto plazo) ^a (agudo)	30	valor de referencia basado en salud ^b
Anatoxina- a	(recreacional)	60	valor de referencia basado en salud ^b
Saxitoxina	(corto plazo) ^a (agudo)	3	valor guía
Saxitoxina	(recreacional)	30	valor guía

^aRefiere a períodos de aproximadamente a 2 semanas

^bLa información toxicológica disponible no es suficiente para derivar en un valor guía formal (provisional u otro) para una exposición a lo largo de la vida

MONITOREO, DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES POTENCIALMENTE TÓXICAS

Existen muchos métodos para el monitoreo de las floraciones de cianobacterias que van desde la detección satelital, biomasa, detección de clorofila y ficocianina, así como la identificación taxonómica por microscopía óptica, entre otros. Los sistemas de monitoreo remoto, basados en imágenes satelitales y sensores *in situ* como el de ficocianina (pigmento exclusivo de las cianobacterias) permiten la detección temprana de estas floraciones y la evaluación de su magnitud. En Uruguay, el Observatorio Ambiental Nacional del Ministerio de Ambiente (OAN) pone a disposición herramientas que permiten visualizar floraciones algales en distintos cuerpos de agua del país en tiempo real (<https://www.ambiente.gub.uy/oan/geoportal/>). La aplicación permite visualizar imágenes de varios satélites y desplegar distintas intensidades verdes de acuerdo a la probabilidad de visualizar una floración algal. Por otro lado, para monitoreo e identificación de grupos de cianobacterias se cuenta con el servicio del LATU que se realiza en el laboratorio de Calidad de Aguas y Evaluación Ambiental utilizando microscopía óptica. Este servicio es utilizado por INIA en el plan de monitoreo de aguas superficiales de INIA La Estanzuela e INIA Las Brujas.

MÉTODO CLÁSICO PARA IDENTIFICACIÓN DE CIANOBACTERIAS: MICROSCOPIA ÓPTICA

La microscopía óptica es un método económico ya que no requiere mayores insumos e infraestructura, pero es muy laborioso y precisa de personal debidamente entrenado para reconocer géneros y especies de

cianobacterias. Asimismo, debe tenerse en cuenta el tiempo de traslado de la muestra al laboratorio, su conservación y su fijación. Los géneros y especies identificados en Uruguay se describen en el Manual para la identificación y medidas de Gestión. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay².

ABORDAJE MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PRODUCTORAS DE TOXINAS

Las metodologías basadas en ADN tales como qPCR y secuenciación se presentan como herramientas de gran utilidad para conocer la dinámica de las poblaciones de cianobacterias y otros microorganismos, así como para identificar cianobacterias potencialmente productoras en muestras ambientales. La metataxonómica³ o metabarcoding^{4,5} es un abordaje enfocado al estudio de la diversidad de microorganismos presentes en una determinada muestra por medio de la secuenciación de genes marcadores, tales como 16S ARNr e ITS.

Existen muchos métodos para el monitoreo de las floraciones de cianobacterias: detección satelital, biomasa, detección de clorofila y ficocianina, así como la identificación taxonómica por microscopía óptica, entre otros.

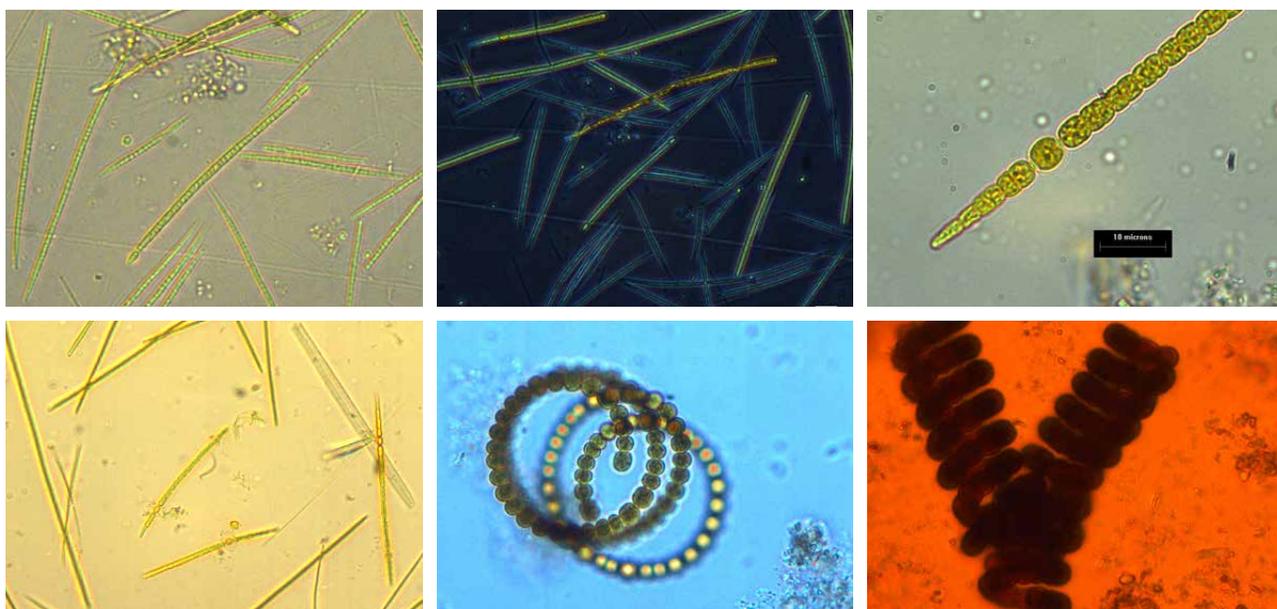


Figura 1 - Especies del grupo Nostocales que han producido floraciones en Uruguay. *Aphanizomenon gracile*, *Cuspidothrix issatschenkoii*, *Raphidiopsis raciborski*, *Dolichospermum circinale* y *Dolichospermum uruguayense*. Departamento de Calidad de Aguas y Evaluación ambiental de LATU. Microscopía óptica.

Con el avance de las técnicas de secuenciación de última generación, los costos han disminuido propiciando una mayor accesibilidad a estos servicios. Mediante qPCR se detectan los genes de las principales toxinas o cianobacterias totales, no se identifican grupos taxonómicos. Es una técnica muy sensible, recomendada para realizar un *screening* primario para determinar presencia de cianobacterias y potencial producción de toxinas.

ESTUDIO DE CASO- RINCÓN DEL BONETE

En el marco del proyecto interinstitucional INIA-LATU SA43 se utilizaron métodos basados en ADN tales como qPCR y secuenciación del gen 16S ARNr para cuantificar y evaluar diversidad de cianobacterias en tres sitios de muestreo adyacentes a diferentes usos del suelo (forestación, agricultura, ganadería en campo natural), y un monte nativo. Se colectaron muestras de agua, suelo y sedimento y se registraron parámetros fisicoquímicos en cada sitio. En paralelo, se utilizaron técnicas clásicas de microscopía óptica⁶ y la técnica de ELISA para detección de toxinas en el agua. En particular, se utilizó un abordaje metataxonómico utilizando el ADN extraído en cada sitio para evaluar el sedimento como posible reservorio de cianobacterias. La secuenciación del gen 16S ARNr (ARN ribosómico) se realizó a través de la empresa MacroGen, Inc. (República de Corea) y se usó el programa DADA2⁷ para los análisis bioinformáticos.

Utilizando microscopía óptica se lograron identificar distintas especies en todas las muestras de sedimento menos en las de campo natural. Mediante qPCR

Se cuantificó y evaluó la diversidad de cianobacterias en tres sitios de muestreo adyacentes a diferentes usos del suelo (forestación, agricultura, ganadería en campo natural), y un monte nativo.

se logró detectar ADN de cianobacterias en suelo y sedimento en todos los sitios, así como de genes de algunas toxinas, complementando su detección por la técnica de ELISA en muestras de agua. Predominaron los filos Actinobacteria, Acidobacteriota y Bacteroidota considerando el microbioma total analizado mediante la secuenciación del gen 16S ARNr y dentro del filo Cianobacterias, las familias *Cyanobiaceae* y *Nostocaceae* fueron las de mayor abundancia relativa.

PLAN DE MONITOREO DE AGUAS SUPERFICIALES DE INIA

En 2019 se inició un plan de monitoreo de aguas superficiales en INIA La Estanzuela, y en 2020 se amplió a INIA Las Brujas para los tajamares y el arroyo Las Brujas. Se registraron, desde ese año, medidas *in situ* utilizando una sonda multiparámetro: pH, temperatura del agua, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y se evaluaron los siguientes parámetros:

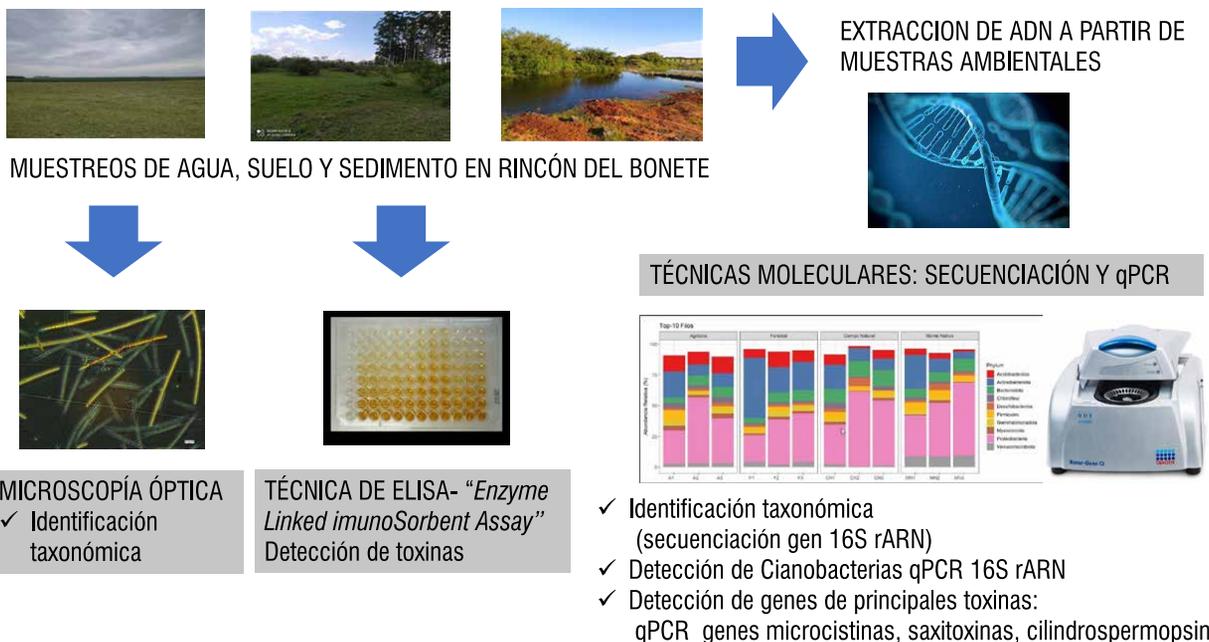


Figura 2 - Fotos del muestreo en el embalse de Rincón del Bonete (enero 2021): sitios agrícola, forestal y monte nativo. Técnicas clásicas y moleculares aplicadas para la detección de toxinas e identificación taxonómica de cianobacterias en agua, suelo y sedimento.

fósforo reactivo, fósforo total, nitratos, demanda química y bioquímica de O₂, incluyendo la cuantificación e identificación de cianobacterias mediante microscopía óptica y la detección de algunas toxinas (microcistinas y saxitoxinas).

En los tajamares de Las Brujas, las microcistinas y saxitoxinas totales se detectaron por debajo de los límites establecidos, ambos por debajo de los valores guía de la OMS¹ para agua recreativa y potable, siendo las cianobacterias más abundantes *Planktolyngbya* cf. *minor*, *Merismopedia tenuissima*, *Oscillatoria* sp., *Leptolyngbya* sp., *Aphanocapsa delicatissima*, *A. planctonica* y *A. koordesii*.

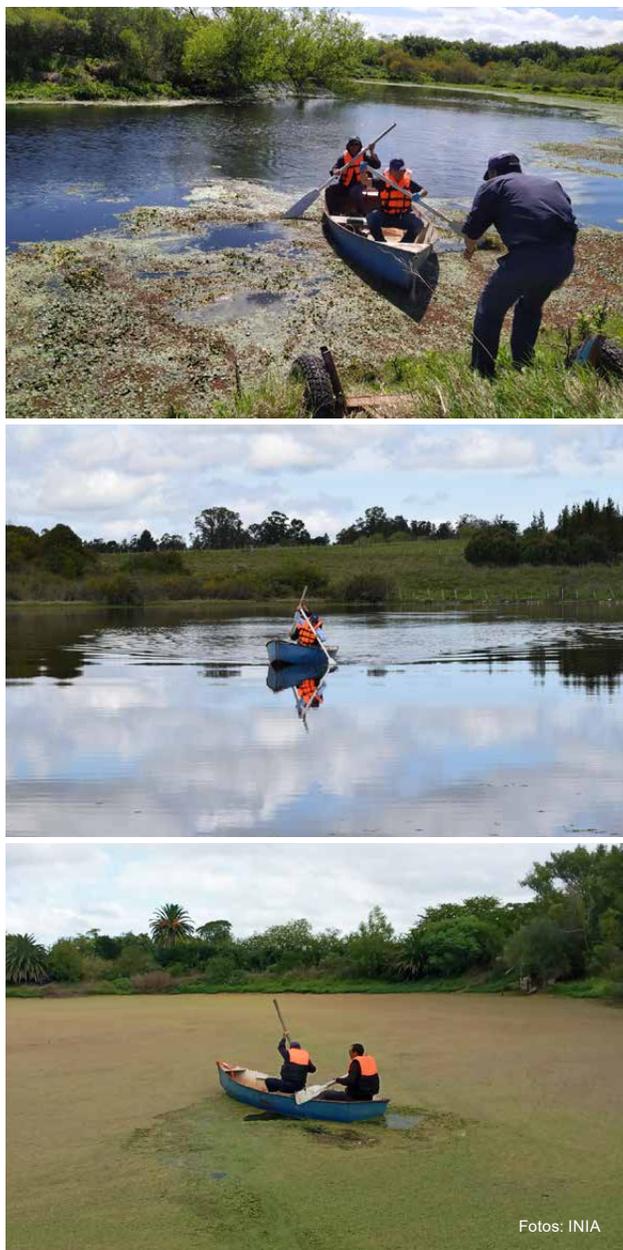


Figura 3 - Equipo de muestreo de INIA, tajamares de la Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate, INIA Las Brujas.

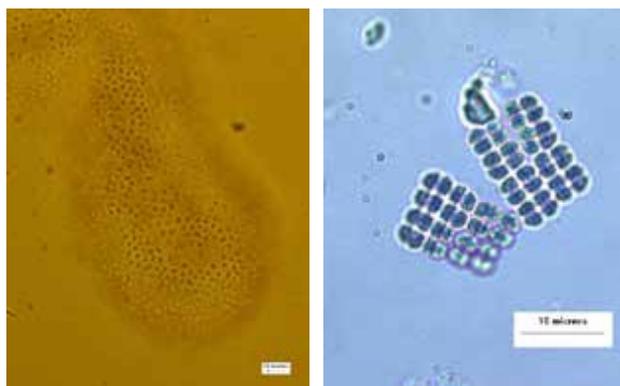


Figura 4 - *Aphanocapsa delicatissima*, *Merismopedia tenuissima*. Microscopía óptica, Departamento de Calidad de Aguas y Evaluación Ambiental-LATU.

PERSPECTIVAS

Las técnicas basadas en ADN y la detección de cianotoxinas aparecen como herramientas promisorias para complementar monitoreos en tajamares, lagunas o embalses usados para la producción agropecuaria en Uruguay.

Estos nuevos abordajes generan información que permite profundizar en la dinámica de las poblaciones de cianobacterias y su interacción con otros microorganismos del agua, suelo o sedimento; así como explorar la diversidad de cepas nativas con potenciales aplicaciones en la agricultura, industria alimenticia o biorremediación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chorus, I. & Welker, M. (2021). Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. CRC Press. WHO Sec. Ed.
2. Bonilla y col. UNESCO (2009). Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Sylvia Bonilla (editora) Documento Técnico N° 16.
3. Marchesi, J. R.; Ravel, J. (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 31, s40168-015-0094-0095, 2015.
4. Dormontt, E. E. et al. (2018). Advancing DNA Barcoding and Metabarcoding Applications for Plants Requires Systematic Analysis of Herbarium Collections-An Australian Perspective. Frontiers in Ecology and Evolution, [s. l.], v. 6, p. 134
5. Lamb, P. D. et al. (2019) How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. Molecular Ecology, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 420-430
6. Utermohl, H. (1958) Zur Ver vollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitteilung Internationale Vereinigung Fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie, 9, 39 p.
7. Callahan, B.J. McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods. Jul;13(7):581-3.