



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
NATURALEZA

PROGRAMA DE POSTGRADO EN BIOCENCIAS

**INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Microcystis aeruginosa* Y DEGRADACIÓN  
DE LA CIANOTOXINA MICROCISTINA LR POR EXTRACTOS DE  
MICROORGANISMOS DEL CONTINENTE ANTÁRTICO**

**GABRIELA ROCÍO SOSA BENEGAS**

Foz do Iguaçu  
Año 2020



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS DE  
LA VIDA Y DE LA NATURALEZA

PROGRAMA DE POSTGRADO EN BIOCENCIAS

**INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Microcystis aeruginosa* Y DEGRADACIÓN DE LA  
CIANOTOXINA MICROCISTINA LR POR EXTRACTOS DE MICROORGANISMOS DEL  
CONTINENTE ANTÁRTICO**

**GABRIELA ROCÍO SOSA BENEGAS**

Disertación de maestría presentada al Programa de Postgrado en Biociencias, del Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Master en Ciencias.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini


Foz do Iguaçu  
Año 2020

GABRIELA ROCÍO SOSA BENEGAS

**INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Microcystis aeruginosa* Y DEGRADACIÓN DE LA  
CIANOTOXINA MICROCISTINA LR POR EXTRACTOS DE MICROORGANISMOS DEL  
CONTINENTE ANTÁRTICO**

Disertación de maestría presentada al Programa de Postgrado en Biociencias, del Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Master en Ciencias.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
Orientador  
UNILA

Firmado por COBO GRADIN, FERNANDO  
VALENTIN (AUTENTICACIÓN) el día  
14/12/2020 con un certificado emitido  
por AC DNIE 006

---

Dr. Fernando Cobo Gradín  
USC



---

Dra. Valéria Maia Merzel  
UNICAMP

Foz do Iguaçu, 26 de noviembre de 2020.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

S715

Sosa Benegas, Gabriela Rocío.

Inhibición del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* y degradación de la cianotoxina microcistina LR por extractos de microorganismos del continente antártico / Gabriela Rocío Sosa Benegas. - Foz do Iguaçu - PR, 2020.

70 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu-PR, 2020.  
Orientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

1. Bacteria cianocida. 2. Microcistina. 3. Biodegradação. 4. Microorganismo antártico. 5. Extremotolerante.  
I. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano. II. Universidade Federal da Integração Latino-Americana. III. Título.

CDU 579

Dedico este trabajo a mis abuelos paternos, que leen y escriben lo indispensable y sin embargo trabajaron por la educación de mi padre, a mi abuela materna que terminó el colegio a los 40 años, a mi abuelo materno †, que formó la única biblioteca de la familia, a mi padre que inconformado un día se propuso salir del campo para estudiar, a mi madre que cuidaba de sus hermanos, trabajaba y estudiaba para convertirse en la primera universitaria de la familia. A Julio, mi compañero y amigo, a mis hijas Jeruti e Ysapy. A todos ellos, mi familia, de donde vengo, que formaron la persona que comencé siendo, y aquella en la que poco a poco me voy convirtiendo ... ¡en camino de ser una científica!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradezco a la UNILA, a la comunidad académica de la cual formo parte y que considero una gran familia. Gracias por haberme dado la oportunidad, gracias por abrirme las puertas a la investigación científica. Estudiar en una universidad, con estudiantes de toda Latinoamérica, una comunidad que recibe con curiosidad e interés genuino otros puntos de vista, otras culturas, otros idiomas. Esa interacción, hasta en lo más cotidiano, resulta en un estímulo intelectual que no he experimentado en otros lugares, es como asistir a un congreso internacional todos los días, aprender desde la biodiversidad de culturas y puntos de vista, fue un gran privilegio.

Agradezco a mi orientador, el Prof. Michel, por sus orientaciones, por guiar mi camino en esta iniciación científica tardía, y por sobre todo por su paciencia y comprensión, porque durante este curso, he sido madre de dos hijas maravillosas, y el profesor Michel supo guiarme a través del camino de investigar con el desafío simultáneo de ser madre de primer y segundo viaje.

Agradezco a mi familia, amigos y compañeros de trabajo, gracias por la ayuda, la comprensión, los consejos y el estímulo para continuar.

***«Somos como enanos sentados sobre los hombros de gigantes para ver más cosas que ellos y ver más lejos, no porque nuestra visión sea más aguda o nuestra estatura mayor, sino porque podemos elevarnos más alto gracias a su estatura de gigantes»***

***Juan de Salisbury (s. XII)***

SOSA, Gabriela; PASSARINI, Michel. **Inhibición del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* y degradación de la cianotoxina microcistina LR por extractos de microorganismos del continente antártico**. 70 p. Disertación de maestría del Programa de Posgrado en Biociencias – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz de Iguazú, 2020.

## RESUMEN

Las proliferaciones masivas de cianobacterias son comunes en cuerpos de agua superficial en todo el mundo, siendo causantes de efectos adversos en ecosistemas acuáticos y la salud pública. Numerosas son las especies que desarrollan floraciones algales, correspondiendo la mayoría de ellas a la cianobacteria productora de microcistinas *Microcystis aeruginosa*. Entre los métodos utilizados para mitigar su desarrollo, han sido utilizados microorganismos ambientales con efectos cianocidas. Sabiendo que los microorganismos de ambientes antárticos son considerados fuente poco explorada de compuestos antimicrobianos, y datos acerca de su actividad contra cianobacterias son escasos o inexistentes, la búsqueda de propiedades cianocidas, resulta prometedora. Este estudio tuvo como objetivos la evaluación de la capacidad de bacterias Antárticas de inhibir el crecimiento de *M. aeruginosa* BCPUSP232 y de degradar microcistina-LR(MC-LR). Extractos acelulares de setenta y seis cepas bacterianas fueron inicialmente testadas en búsqueda de actividad cianocida. Las cepas no identificadas (UN) 62 y ES7, y *Psychromonas arctica* (ESH2-38) fueron capaces de inhibir el crecimiento de *M. aeruginosa*. Ocho cepas presentaron valores de MIC en el rango de 0.55 a 3.00 mg. mL<sup>-1</sup>, donde ES7 presentó la mejor actividad cianocida. *Arthrobacter* sp. 443 y UN 383 fueron las más eficientes degradando MC-LR, con 24.87 y 23.85%, respectivamente. Para nuestro conocimiento, estos datos representan el primer reporte de actividades cianocidas y de degradación de MC-LR por bacterias antárticas. Los resultados del presente estudio abren perspectivas para la futura aplicación como alternativa biotecnológica de biorremediación para mitigar las floraciones de cianobacterias y degradar microcistinas (MC-LR).

**Palabras clave:** Bacteria cianocida. CIM. Microcistina. Biodegradación. Microorganismo antártico. Extremotolerante.



SOSA, Gabriela; PASSARINI, Michel. **Inibição do crescimento de *Microcystis aeruginosa* e degradação da cianotoxina microcistina LR por extratos de microrganismos do continente antártico**. 70 p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

## RESUMO

As proliferações massivas de cianobactérias são comuns em corpos d'água superficiais ao redor do mundo, sendo responsáveis por efeitos adversos em ecossistemas aquáticos e na saúde pública. São numerosas as espécies que produzem florações de algas, sendo a maioria delas, causada pela cianobactéria produtora de microcistinas, *Microcystis aeruginosa*. Entre os métodos utilizados para mitigação do seu desenvolvimento, microrganismos ambientais com efeitos cianocidas vem sendo utilizados. Microrganismos de ambientes antárticos são considerados fontes pouco estudadas de compostos antimicrobianos. Informações sobre atividade biológica a partir de microrganismos antárticos contra cianobactérias, são escassos ou inexistentes. Desta forma, a busca por propriedades cianocidas em bactérias de ambientes frios, torna-se uma estratégia promissora. O presente estudo teve como objetivos a avaliação da capacidade de bactérias isoladas da Antártica em inibir o crescimento de *M. aeruginosa* BCPUSP232 bem como degradar microcistinas-LR. Extratos acelulares de setenta e seis isolados bacterianos foram inicialmente testados na busca por atividade cianocida. Os isolados não identificados (UN) 62 e ES7, e *Psychromonas arctica* (ESH2-38), foram capazes de inibir o crescimento de *M. aeruginosa*. Oito isolados apresentaram valores de MIC entre 0.55 a 3.00 mg. mL<sup>-1</sup>, sendo o isolado ES7, responsável pela melhor atividade cianocida. *Arthrobacter* sp. 443 e UN 383, foram os mais eficientes na degradação de MC-LR, com 24.87 e 23.85%, respectivamente. Para nosso conhecimento, estes dados representam o primeiro relato de atividades cianocidas e de degradação de MC-LR por bactérias isoladas do continente Antártico. Os resultados do presente estudo abrem perspectivas para futuras aplicações biotecnológicas de biorremediação, para mitigar o impacto das florações de cianobactérias bem como para degradação das microcistinas (MC-LR) produzidas.

**Palabras clave:** Bacteria cianocida. CIM. Microcistina. Biodegradación. Microorganismo antártico. Extremotolerante.

SOSA, Gabriela; PASSARINI, Michel. **Growth inhibition against *Microcystis aeruginosa* and degradation of microcystin-LR by bacteria isolated from Antarctica.** 70 p. Masters dissertation of Postgraduate degree in Biosciences – Federal University of Latin American Integration. Foz do Iguaçu, 2020.

### ABSTRACT

Cyanobacteria massive proliferations are common in freshwater bodies worldwide, causing adverse effects on aquatic ecosystems and public health. Numerous species develop blooms, most of them correspond to the toxic microcystin-producing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Among methods used to mitigate their development, environmental microorganisms with cyanocidal effect have been used. As microorganisms recovered from Antarctic environment can be considered an unexploited source of antimicrobial compounds and data about their activity against cyanobacteria are scant or inexistent, search for cyanocidal property can be a promising strategy. This study aimed to evaluate the capacity of Antarctic bacteria to inhibiting the proliferation of *M. aeruginosa* BCPUSP232 and to degrade microcystin-LR (MC-LR). Cell-free extracts of seventy-six bacterial strains were initially tested for cyanocidal activity. Unidentified (UN) strains 62 and ES7, and *Psychromonas arctica* (ESH2-38) were able to effectively lyse *M. aeruginosa*. Eight strains showed MIC ranging from 0.55 to 3.00 mg mL<sup>-1</sup>, with ES7 showing the best cyanocidal activity. *Arthrobacter* sp. 443 and UN 383, were the most efficient in degrading MC-LR, with 24.87 and 23.85% degradation, respectively. To our knowledge this is the first report of cyanocidal and MC-LR degradation activities by Antarctic bacteria, opening up perspectives for their future application as an alternative or supporting approach to help mitigate cyanobacterial blooms. These results open perspectives for their future application as a bioremediation biotechnological alternative to support approaches that aim to mitigate cyanobacterial blooms and degrade microcystins.

**Keywords:** Cyanocidal bacterium. MIC. Microcystin. Biodegradation. Antarctic microorganism. Extremotolerant.

# SUMARIO

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
2.1 <i>Calidad de agua, eutrofización artificial y floraciones de cianobacterias</i> .....	14
2.2 <i>Cianobacterias</i> .....	15
2.3 <i>Toxicidad de las floraciones</i> .....	17
2.4 <i>Cianotoxinas</i> .....	19
2.5 <i>Microcistinas</i> .....	20
2.6 <i>Métodos de control de floraciones</i> .....	23
2.6.1 <i>Atacar el problema de raíz: reducir la carga de nutrientes</i> .....	24
2.6.4 <i>Bacterias con potencial para degradar microcistinas</i> .....	26
2.6.5 <i>Bacterias con actividad cianocida</i> .....	28
2.7 <i>Microorganismos antárticos</i> .....	30
2.8 <i>Cianobacterias en el continente antártico</i> .....	31
2.9 <i>Microcistinas en el continente Antártico</i> .....	32
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS</b> .....	<b>35</b>
4.1 <i>Pregunta de investigación</i> .....	35
4.2 <i>Hipótesis</i> .....	35
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
5.1 <i>General</i> .....	36
5.2 <i>Específicos</i> .....	36
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
6.1 <i>Reactivación y cultivo de microorganismos utilizados en el estudio</i> .....	37
6.2 <i>Preparación de extractos bacterianos</i> .....	37
6.3 <i>Actividad cianocida en medio sólido</i> .....	38
6.4 <i>Actividad cianocida en medio líquido</i> .....	38

6.5 Concentración Inhibitoria Mínima (MIC).....	39
6.6 Degradación de Microcistina-LR (MC-LR) por filtrados bacterianos.....	40
6.7 Análisis estadístico de datos.....	41
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
7.1 Actividad cianocida en medio sólido .....	42
7.2 Actividad cianocida en medio líquido .....	44
7.3 Concentración inhibitoria mínima (MIC).....	47
7.4 Degradación de Microcistina-LR (MC-LR) .....	48
<b>8 DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>9 CONSIDERACIONES FINALES .....</b>	<b>55</b>
<b>10 REFERENCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

Cuando divisamos cuerpos de agua como lagos y embalses, con frecuencia los observamos con coloraciones de verde intenso a rojo, con espumas y olores desagradables. Lo que observamos es la presencia de grandes cantidades de biomasa de cianobacterias, consecuencia visible del fenómeno denominado eutrofización (LUUC; SKULBERG; UTKILEN, 1999; PÉREZ; SORACI; TAPIA, 2008). Esta situación ocurre y se replica cada vez con mayor frecuencia en la mayor parte de los países del mundo, acarreado consigo problemas ecológicos y de salud pública (HUISMAN et al., 2018). Entre las cianobacterias responsables de tales fenómenos, se destaca *Microcystis aeruginosa*, productora de potentes toxinas (microcistinas), causantes de enfermedad y muerte tanto en animales como seres humanos (MERILUOTO et al., 2017).

La necesidad de contar con herramientas que puedan aportar a una posible solución, ha impulsado y motivado la realización de estudios que abordan formas de mitigación de la proliferación de *M. aeruginosa* y la eliminación de microcistinas (HUISMAN et al., 2018). El desafío consiste en llegar a herramientas que produzcan los resultados esperados con el menor costo ecológico posible para los ecosistemas acuáticos. Es allí que los estudios buscando bacterias cianocidas se han posicionado y como resultado, numerosas bacterias aisladas de los mismos ambientes acuáticos templados, han sido estudiadas de forma extensa (EDWARDS; LAWTON, 2009; KORMAS; LYMPEROPOULOU, 2013). Sin embargo, como resultado de la revisión bibliográfica realizada en el presente estudio nos encontramos con la escasez o ausencia aún de registros de bacterias provenientes de ambientes polares.

*M. aeruginosa* tiene la particularidad de haber sido registrada en todo el mundo, excepto en la Antártida (HARKE et al., 2016). Las bacterias aisladas en el continente antártico poseen adaptaciones únicas, lo que las hace extremófilas, característica que comparten con las cianobacterias (VINCENT; QUESADA, 2012). Además, las bacterias antárticas, son poseedoras de un potencial poco explorado de producción de antimicrobianos aún en estudio (MARGESIN et al., 2008).

Es así que la conjunción de los factores citados, ha motivado el abordaje poco explorado para la realización del presente trabajo, que buscó efectos cianocidas y degradatorios de MC-LR por parte de bacterias aisladas de diversas muestras en el continente antártico (como sedimento marino, invertebrados, esponjas y estrellas de mar), en busca de sumar alternativas y aportar al conocimiento del potencial biotecnológico de las bacterias antárticas.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Calidad de agua, eutrofización artificial y floraciones de cianobacterias

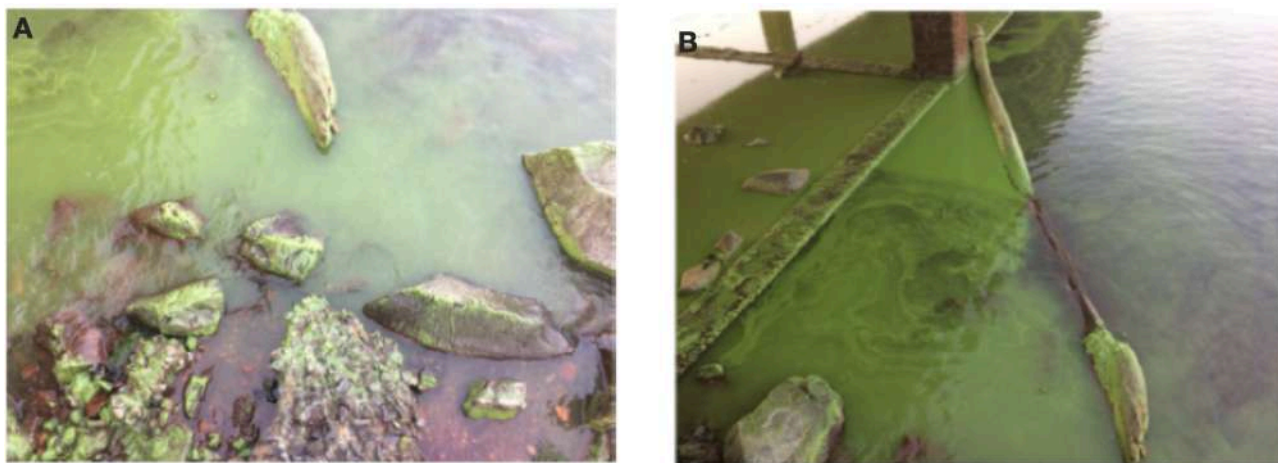
El término calidad de agua, hace referencia a la aptitud del agua para ser utilizada en varios usos o procesos, cada uso particular tendrá ciertos requerimientos y restricciones de las características físicas, químicas y biológicas del agua (MEYBECK et al., 1996). Los usos del agua de manera general pueden agruparse en abastecimiento para consumo humano, consumo animal, preservación de la vida acuática, recreación de contacto primario (contacto directo) y secundario (contacto indirecto), irrigación de cultivos, acuicultura, navegación y paisajismo. Los usos de agua, con requerimientos más exigentes de calidad, se encuentran relacionados a los usos de abastecimiento para consumo humano y contacto primario (CONAMA, 2000, 2005). En las legislaciones de Brasil y Paraguay, se realiza una clasificación de las aguas de acuerdo a la calidad necesaria para cada uso, así se agrupan en clases, siendo: i) clase especial, aguas destinadas para abastecimiento para consumo humano y para preservación de la vida acuática; ii) clase 1: aguas destinadas a consumo humano, preservación de la vida acuática, recreación con contacto primario, irrigación de hortalizas; iii) clase 2: aguas que pueden ser destinadas a consumo humano, preservación de la vida acuática, recreación con contacto primario, irrigación de hortalizas y acuicultura; iv) clase 3: aguas destinadas a consumo humano, irrigación de árboles, cereales y forraje, recreación de contacto secundario y consumo animal; v) clase 4: aguas que pueden ser destinadas a navegación y armonía paisajística (SEAM, 2002; CONAMA, 2005).

Las actividades humanas como la descarga de efluentes domésticos, industriales, urbanos y agrícolas en un complejo y dinámico proceso denominado eutrofización artificial, alteran cuantitativa y cualitativamente las características fisicoquímicas y biológicas de los cuerpos de agua. Este proceso se caracteriza por adicionar nutrientes, principalmente compuestos de fósforo y nitrógeno. Así, la eutrofización es la respuesta biológica al exceso de nutrientes (CODD, 2000) y tiene como consecuencia el quiebre del equilibrio ecológico, en otras palabras, el ecosistema produce más materia orgánica de la que es capaz de consumir y descomponer (BARTRAM; BALLANCE, 1996; ESTEVES; PEREIRA, 2011). La eutrofización en la mayor parte de los casos se evidencia por la presencia de biomasa visible de algas verdes y cianobacterias (Figura 1). Muchas especies de agua dulce pueden proliferar intensamente, sin embargo, las cianobacterias, al tener la capacidad de formar espumas densas, producir toxinas que

podrían acumularse en concentraciones que representen riesgos para la salud humana. Ya se han registrado casos de intoxicación en ganado, fauna y seres humanos (SIVONEN; JONES, 2003).

Existen numerosas especies de cianobacterias que desarrollan floraciones en ambientes de agua dulce, salobre o marina. Algunos autores inclusive han mencionado que todos los países del mundo han tenido o tendrán en algún momento de su historia floraciones (SIVONEN; JONES, 2003).

**Figura 1.** Fotografías de floraciones de *Microcystis* spp. en el embalse de Itaipu, zona urbana de la ciudad de Hernandarias, mes de setiembre 2017. (A) Floración con  $<500.000 \text{ cél.mL}^{-1}$ , (B) Floración con  $>5.10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$



**Fuente:** Laboratorios Ecológicos MARR.CE Itaipu

## 2.2 Cianobacterias

Las cianobacterias son organismos procariontes Gram-negativos, poseen clorofila a y su reserva glucídica es semejante al glucógeno. Difieren de las demás bacterias en la característica de ser principalmente fototróficas oxigénicas, es decir realizan fotosíntesis con liberación de oxígeno, además pueden ser mixotróficas (pueden obtener energía a partir de fotosíntesis o de compuestos orgánicos o inorgánicos), característica que les permite sobrevivir en condiciones de ausencia de luz (SIVONEN; JONES, 2003; HASELKORN, 2009; ESTEVES; SUZUKI, 2011). Son conocidas como los organismos productores de oxígeno más primitivos, con registros fósiles de apropiadamente 3,5 billones de años (SCHOPF, 2000). Frecuentemente, son los primeros organismos en colonizar áreas desnudas de tierra y vegetación. Adaptaciones como los

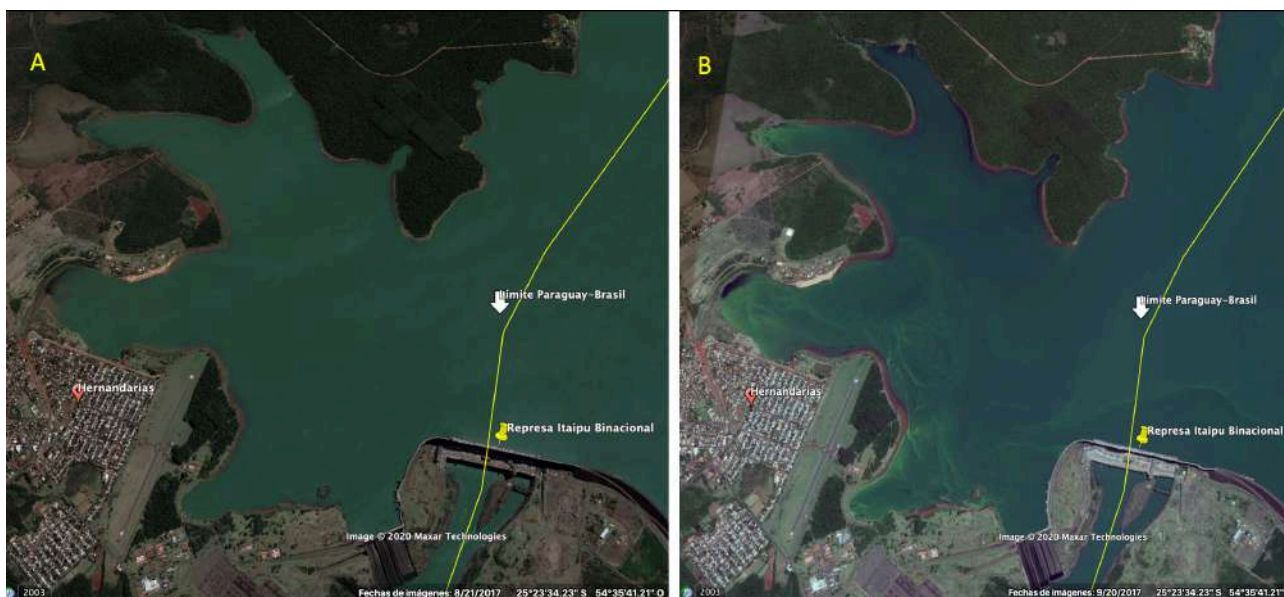
pigmentos que absorben luz ultravioleta y la habilidad de sobrevivir en extremos de temperatura, incrementan su habilidad de sobrevivir en ambientes expuestos, cenizas volcánicas, aguas termales, hielo y nieve. Muchas especies son capaces de vivir en suelo y otros hábitats terrestres, donde son importantes en el funcionamiento de procesos ecosistémicos y en el ciclo de nutrientes (LUUC; SKULBERG; UTKILEN, 1999; WHITTON; POTTS, 2000). Una propiedad resaltante de muchas especies de cianobacterias es la de poseer vesículas intracelulares de gas, lo cual les permite moverse a través de la columna de agua para poder aprovechar mejor la luz y nutrientes. Así, estos microorganismos poseen capacidad de regular su flotación y así buscar activamente profundidades con condiciones óptimas para su crecimiento (SIVONEN; JONES, 2003).

Los florecimientos de cianobacterias pueden ser en niveles miles de células a millones de células (Figura 1), por lo cual, se han establecido en diferentes países límites cuantitativos de células por unidad de volumen, a partir de los cuáles se puede definir si el fenómeno de aumento de biomasa corresponde o no a un florecimiento. En Brasil, se establece que se considera florecimiento a partir de 10.000 células de cianobacterias  $\text{mL}^{-1}$  de agua. La agencia ambiental de los Estados Unidos ha establecido el límite de 5.000 a 20.000 células  $\text{mL}^{-1}$ , dependiendo del estado. En Paraguay, no se cuenta con un límite establecido para tal fenómeno y en su defecto se sigue la recomendación de evitar contacto con aguas que contengan más de 100.000 cél  $\text{mL}^{-1}$  (SEAM, 2002; CONAMA, 2005; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2014).

Las floraciones, pueden extenderse por amplias superficies y volúmenes de agua, por lo cual es posible divisarlas desde satélites, ejemplos resaltantes se han registrado en el Lago Taihu de China en casi toda su extensión de  $\sim 2.400 \text{ km}^2$  (SHI et al., 2017). En Norte América el Lago Erie en el año 2011, se registró la mayor formación en su historia  $\sim 5.000 \text{ km}^2$  (MICHALAK et al., 2013). Actualmente, en el océano Báltico, ocurren floraciones de  $\sim 200.000 \text{ km}^2$  (KAHRU; ELMGREN, 2014). En Paraguay, en el 2012, se dio la mayor floración registrada en el Lago Ypacarai de  $60 \text{ km}^2$  (BENITEZ et al., 2015; LÓPEZ MOREIRA M. et al., 2018). En setiembre del 2017, en el embalse Itaipu, ciudad de Hernandarias, se registraron varios eventos de floración (Figura 2). Dependiendo de la región, la frecuencia de estos fenómenos puede ser anual, con duración de días a meses, hasta todo el año, en regiones tropicales y subtropicales (CHORUS; BARTRAM, 1999).



**Figura 2.** Imágenes satelitales del embalse de Itaipu, zona de la Costanera de la Ciudad de Hernandarias, Paraguay. (A) Fecha 21-08-2017 (B) Floración visible (coloración verdosa), 20-09-2017.



**Fuente:** GoogleEarthPro®.

Los problemas asociados a cianobacterias tienden a incrementarse y volverse más frecuentes en áreas donde se da un crecimiento desordenado de la población, acompañado de la falta de sistemas de alcantarillado y tratamiento de efluentes, bien como en regiones agrícolas donde el uso de fertilizantes es extenso y éstos luego de las lluvias son arrastrados a los cuerpos de agua (LUUC; SKULBERG; UTKILEN, 1999; CODD, 2000; HAMILTON; SALMASO; PAERL, 2016). Al afectar el tratamiento y suministro de agua, producir mortandad de peces, malos olores y problemas de salud, termina atrayendo la atención de las poblaciones, medios de comunicación y autoridades donde éstas ocurren. Así, los fenómenos de florecimientos de cianobacterias constituyen un problema con muchas aristas, social, ambiental y de salud pública, cuya solución es reclamada por la población afectada, sin embargo, la solución es lenta y en muchas ocasiones lleva a la toma de decisiones apresuradas e intervenciones infructuosas (CHORUS, 2001).

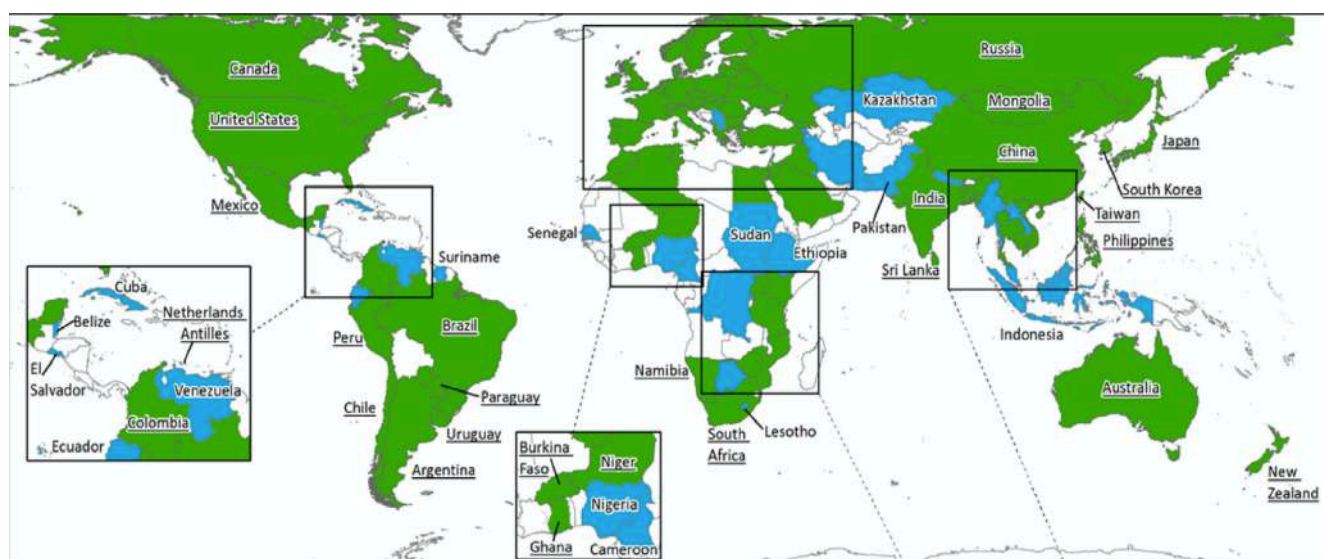
### 2.3 Toxicidad de las floraciones

El grupo de las cianobacterias posee cerca de 150 géneros y aproximadamente 2.000 especies. La mayor parte de ellas de agua dulce y al menos 46 de ellas con efectos tóxicos en vertebrados (GESSNER, 1972; SIVONEN; JONES, 2003),

siendo el género de mayor ocurrencia *Microcystis* spp. De las muestras analizadas de cianobacterias alrededor del mundo, 60% contenían toxinas (SIVONEN; JONES, 2003). Esta toxicidad es cambiante en tiempo y espacio, al tratarse de células fluctuantes, pudiendo éstas desplazarse con el viento y migrar en la columna de agua, lo cual hace probable que en ese momento y local dado no sea posible su detección, por las dificultades de toma de muestra, el volumen, forma y momento del día en que se realizan (CODD, 2000; SIVONEN; JONES, 2003; WATSON; RIDAL; BOYER, 2008).

La producción de cianotoxinas varía entre especies dentro de cada género. Una misma especie puede producir varios tipos de cianotoxinas existiendo, además, ecotipos no productores de cianotoxinas (CHORUS; BARTRAM, 1999; CODD et al., 1999). Respecto a la producción de toxinas, por razones no muy esclarecidas, temperaturas más cálidas favorecen el crecimiento de cepas de *Microcystis* productoras de toxinas (PAERL; OTTEN, 2013). Con el refinamiento de los métodos analíticos y los planes de monitoreo, el número de países en donde se han reportado cianotoxinas y el número de cianotoxinas descubiertas se incrementa cada año (CODD et al., 1999; MERILUOTO et al., 2017). Esto se representa en la Figura 3.

**Figura 3.** Países donde se han registrado floraciones de *M. eruginosa*. En blanco se indican los países en donde no se han hallado registros, en azul países donde se ha registrado floración y verde países donde se han registrado ambos eventos, floraciones y presencia de microcistinas.



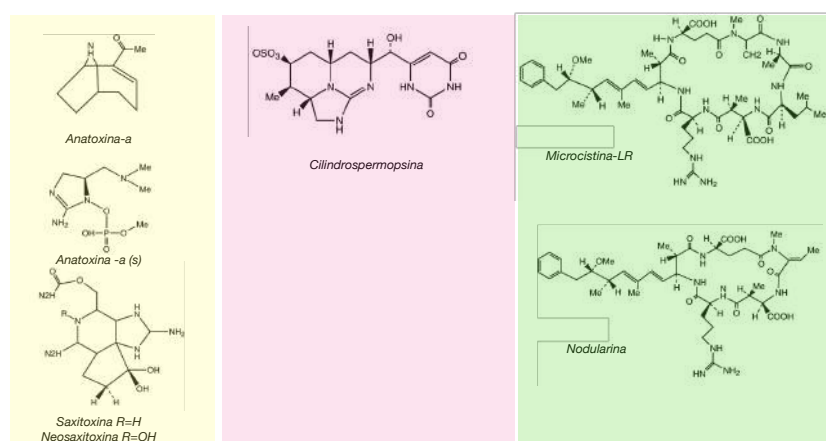
Fuente: HARKE et al., 2016

## 2.4 Cianotoxinas

Las cianotoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por varios géneros de cianobacterias. Siendo tóxicas para la mayor parte de los organismos eucariotas incluyendo algas, plantas, ganado y seres humanos (PAERL; OTTEN, 2013). No se encuentran completamente dilucidadas las razones por las cuáles se produce su síntesis (HUISMAN et al., 2018), sin embargo, existen indicios de que podrían tener un papel importante en la defensa contra predadores (JANG et al., 2003; HAIRSTON et al., 2010). En pruebas de laboratorio se ha demostrado que, de manera general, la síntesis de cianotoxinas depende tanto de factores ambientales como alopáticos y, es realizada en grandes complejos enzimáticos no ribosomales (HASELKORN, 2009). Si bien muchas especies de cianobacterias producen toxinas, su presencia en cantidades variables de células no necesariamente implica la producción de las mismas. Esto depende principalmente de las características del local donde se produce la floración, las condiciones de estrés y de los múltiples factores ambientales, entre ellos la temperatura del agua, pH, CO<sub>2</sub> y concentraciones de nutrientes (CALTEAU et al., 2014).

La elucidación e identificación estructural de varios grupos de cianotoxinas conocidas, permite de manera general, clasificarlas funcionalmente en grupos esquematizados en la Figura 4 (CHORUS; BARTRAM, 1999; SIVONEN; JONES, 2003), siendo ellos: a) tres tipos de neurotoxinas: i) anatoxina-a, ii) anatoxina-a(s), y iii) saxitoxinas, que por mecanismos diferentes son capaces de bloquear la transmisión neuronal; b) una citotoxina: cilindrospermosina; c) dos grupos de hepatotoxinas: i) microcistinas, y ii) nodularinas, potentes inhibidoras de las proteinfosfatasas.

**Figura 4.** Estructuras de los grupos de cianotoxinas clasificadas funcionalmente. Amarillo: neurotoxinas, rosa: citotoxina y verde: hepatotoxinas.



**Fuente:** CHORUS; BARTRAM (1999)

Las cianotoxinas listadas (Figura 4) son las que poseen efectos importantes sobre la salud humana, sin embargo, la lista de las mismas se incrementa con los nuevos descubrimientos (SIVONEN; JONES, 2003; CALTEAU et al., 2014). Investigaciones con extractos crudos y biomasa de cianobacterias han demostrado toxicidad substancial sobre hepatocitos y embriotoxicidad en peces, efectos no relacionados al contenido de cianotoxinas conocidas, hallazgos que inician la búsqueda de nuevas cianotoxinas responsables de tales efectos (CHORUS, 2001; ADÁMEK et al., 2011).

## 2.5 Microcistinas

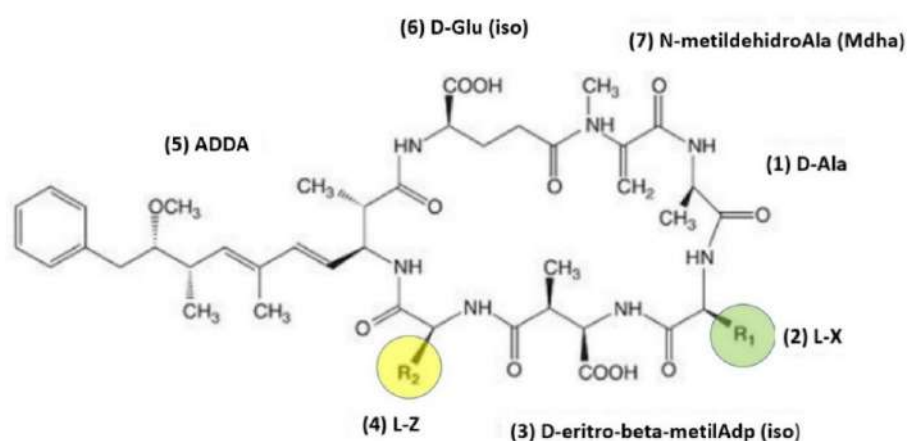
*Microcystis aeruginosa*, la especie más comúnmente hallada en floraciones mundialmente, produce péptidos cíclicos de potente acción hepatotóxica, denominados microcistinas (MC). Por haberse hallado por primera vez en este género, sin embargo, son producidas por una amplia variedad de géneros y de las cuáles se han aislado más de 248 variantes (CARMICHAEL; KAUP, 1990; CHORUS; BARTRAM, 1999; CODD et al., 1999; SIVONEN; JONES, 2003; BOOPATHI; KI, 2014; MERILUOTO et al., 2017). La producción de MC esta principalmente asociada a cianobacterias planctónicas formadoras de floraciones como *Microcystis* y *Planktothrix*. Sin embargo, también ha sido reportada su producción por especies bentónicas de géneros como *Oscillatoria*, o que habitan en simbiosis como líquenes (*Nostoc*). Las cianotoxinas han sido halladas en cuerpos de agua alrededor del mundo (LUUC; SKULBERG; UTKILEN, 1999).

Las MC se unen fuertemente a fosfatasa, resultando en un efecto muy tóxico para metazoos. En ratones, esta inhibición lleva al colapso y debilitación de vasos sanguíneos, provocando la muerte rápida del animal. Las mismas toxinas pueden provocar muerte en organismos acuáticos como peces e insectos y vertebrados (SIVONEN; JONES, 2003; HASELKORN, 2009). Son varias las cianotoxinas de importancia por sus potenciales efectos a la salud humana, destacándose las MC por los siguientes factores: *i)* alta frecuencia de su detección; *ii)* ser producida por varios géneros y especies de cianobacterias; *iii)* síntesis favorecida en climas cálidos coadyuvada por escenario de calentamiento global creciente y; *iv)* capacidad de los países de monitorearla con disponibilidad de técnicas y reactivos comerciales.

Las MC son una diversa familia de hepatotoxinas. Estructuralmente son heptapéptidos cíclicos que contienen una cadena específica de aminoácidos ácido 3-

amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4(E),6(E)-dienoico (ADDA), únicamente encontrada en MC y nodularinas (SIVONEN; JONES, 2003). En la Figura 5, los residuos de aminoácidos en las posiciones (2) X y (4) Z corresponden a las regiones de mayor variabilidad en las MC y el nombre correspondiente es indicado por el sufijo de dos letras, así, MC-LR contiene los aminoácidos leucina (L) y arginina (R) en las posiciones 2 y 4 respectivamente. MC-RR contiene dos residuos de arginina en dichas posiciones (MERILUOTO et al., 2017).

**Figura 5.** Estructura general de las microcistinas



Fuente: MERILUOTO et al., 2017

Este grupo de toxinas se destaca principalmente por unirse mediante enlace covalente de manera irreversible a proteinfosfatasas 1 y 2a (MACKINTOSH et al., 1990), y en consecuencia causar daño hepático severo, además de ser citotóxico, promotor tumoral, causar efectos pulmonares, neurológicos y reproductivos (CARMICHAEL; KAUP, 1990). Se han registrado muertes en una variedad de aves, peces y mamíferos como ovejas, perros, ganado e inclusive seres humanos (CHORUS; BARTRAM, 1999; CODD, 2000; SIVONEN; JONES, 2003). A nivel regional, se resalta que en Brasil, se han registrado en seres humanos casos de intoxicación por contacto recreacional, 2000 casos de gastroenteritis y 88 muertes por ingestión de agua de consumo (TEXEIRA et al., 1993; SIVONEN; JONES, 2003), y 56 muertes por el “Síndrome de Caruaru” resultado de su presencia en el agua de diálisis (JOCHIMSEN et al., 1998), totalizando 144 muertes. En Uruguay, en el año 2015, se reportó un niño menor de 2 años presentó severos síntomas gastrointestinales asociados a cianotoxinas, horas

después de tomar contacto con agua en una playa con floración (VIDAL et al., 2017). Para Paraguay no se encuentran registros.

En muchas ocasiones, los reportes de intoxicaciones por cianotoxinas son anecdóticos, y en numerosos casos la información epidemiológica referente a cianotoxinas no se encuentra disponible o se encuentra pobremente estandarizada con sistemas de reporte inadecuados o ausentes (CHORUS; BARTRAM, 1999). Estudios de cultivos de *Microcystis aeruginosa* han mostrado que más del 80% del pool total detectable de MC es de localización intracelular y que la liberación de las mismas al agua circundante ocurre durante la senescencia, el cambio al estado estacionario en la fase de crecimiento del cultivo y la fase de lisis celular (CODD; BELL; BROOKS, 1989; PARK et al., 1998). Estudios realizados por Park y colaboradores (1998), han encontrado que la concentración de MC intracelular es generalmente mayor que la extracelular, que durante la fase de crecimiento exponencial se encuentran las concentraciones intracelulares más elevadas y que en contraste, la concentración extracelular es elevada al final de las floraciones (PARK et al., 1998).

El agua tratada proveniente de plantas de tratamiento de agua, que poseen como fuente de abastecimiento lagos y embalses, los cuales presentan floraciones, presenta el serio riesgo de poseer MC y producir intoxicaciones en la población que la consume. Por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el monitoreo de los niveles de MC en agua tratada y valores guía para las MC en agua para consumo (CHORUS; BARTRAM, 1999). Así, el valor guía (GV, de sus siglas en inglés) para las MC-LR totales (intracelular más extracelulares) en agua de consumo, se establece en  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  y basado en este GV, la recomendación para el uso de aguas recreacionales (baño, natación, contacto secundario) derivado de estudios epidemiológicos, se establece en  $20.000 \text{ células mL}^{-1}$  de cianobacterias (CHORUS; BARTRAM, 1999; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2014; WHO, 2017). Ambas recomendaciones son adoptadas por varios países alrededor del mundo, entre ellos Brasil en las resoluciones de CONAMA 274/2000 y 357/2005, y Paraguay en la Resolución SEAM 222/2002 (CONAMA, 2000, 2005; SEAM, 2002; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2014).

La presencia de MC en el agua de abastecimiento, presenta varios desafíos para las plantas de tratamiento de agua. Dependiendo de la fase del ciclo de vida en la que se encuentre la célula, las cantidades de cianotoxinas intra y extracelulares son variables (PARK et al., 1998; WHO, 2017). La elevada biomasa satura los filtros y dificulta la operación (FALCONER et al., 2005) bien como, la estabilidad térmica, las MC

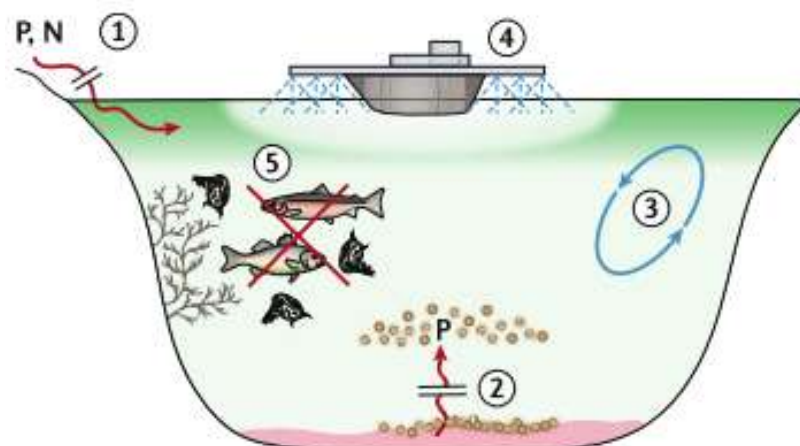
resisten el calentamiento y ebullición (CHORUS, 2001; SIVONEN; JONES, 2003). Los tratamientos simples de desinfección con compuestos de cloro y la ozonización, lisan las células liberando las cianotoxinas al agua tratada, aumentando su toxicidad (KENEFFICK et al., 1993; CHORUS; BARTRAM, 1999; WHO, 2017), sin embargo, los tratamientos convencionales pueden no eliminar las MC (CHORUS; BARTRAM, 1999), Así, las alternativas para eliminación de MC son costosas y presentan desafíos operacionales, como el ozono y carbón activado (WHO, 2017).

## 2.6 Métodos de control de floraciones

La necesidad de resolver los problemas ligados a las cianobacterias ha llevado al empleo de múltiples técnicas para combatir y evitar las floraciones, éstos se pueden resumir en métodos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, debido a los altos costos y efectos secundarios sobre el ecosistema del tratamiento con cianocidas químicos, además de la aceleración de liberación de toxinas por parte de las células de cianobacteria lisadas, hacen la utilización de éstos, poco aceptables por la población y organismos ambientales (CHORUS; BARTRAM, 1999; HUA et al., 2009; MATTHIJS et al., 2016). Por otro lado, los métodos biológicos son considerados más económicos, ambientalmente amigables y más aceptados por la población, dentro de los mismos se han utilizado y estudiado una gran variedad de organismos acuáticos basándose en fenómenos de depredación, parasitismo o la liberación de metabolitos que suprimen el crecimiento de cianobacterias (COBO, 2015).

Se han desarrollado varias estrategias, resumidas en la Figura 6 (WU; JOYCE; MASON, 2011; HUISMAN et al., 2018), para prevenir o suprimir los florecimientos de cianobacterias, de manera general son: *a)* manejo de los nutrientes, que ataca la raíz del problema a través de la reducción al mínimo de los aportes externos de nutrientes; *b)* adición de arcillas secuestradoras de fosfatos y bloqueo de los sedimentos, remueve nutrientes de la columna de agua y los almacena en el sedimento; *c)* mezcla artificial de lagos, suprime las cianobacterias fluctuantes; *d)* control químico, utilizado en situaciones de emergencias; *e)* manipulación de las cadenas tróficas acuáticas mediante remoción de peces planctívoros, incrementando las poblaciones de zooplancton, predadores de cianobacterias; *f)* utilización de boyas de ultrasonido que por diferentes mecanismos, causan el hundimiento y lisis de las células.

**Figura 6.** Estrategias de prevención y control de floraciones de cianobacterias, P: fósforo, N: Nitrógeno. (1) Reducción de aportes de nitrógeno y fósforo, (2) secuestro de fósforo del sedimento (3) mezcla artificial (4) control químico y (5) manipulación de cadenas tróficas acuáticas.



Fuente: HUISMAN et al., 2018

### 2.6.1 Atacar el problema de raíz: reducir la carga de nutrientes

La reducción de los aportes externos de nutrientes es la estrategia que ataca el gatillador de las floraciones, la eutrofización. Podría tomar décadas para que estas medidas sean exitosas, debido a los años de acumulación de nutrientes en los sedimentos (JEPPESEN et al., 2005; FASTNER et al., 2016). Un ejemplo que se destaca es el del río Thames de Londres, que, aplicando drásticas medidas de gestión, logró su recuperación en 60 años (FSI, 2018). En algunos lagos, la adición de arcillas secuestradoras de fósforo, remoción de sedimentos por dragado o bloqueo de los sedimentos, han sido aplicados para suprimir la recirculación de los compuestos de fósforo y así, acelerar la recuperación del lago (LÜRLING; FAASSEN, 2012). Estas medidas, en lagos rasos poco profundos donde los sedimentos son resuspendidos fácilmente por acción del viento y por peces iliófagos, podrían no ser efectivas por la reintroducción de nutrientes en la columna de agua (HUISMAN et al., 2018).

Todas estas medidas apoyadas simultáneamente con acciones enfocadas a la reducción del aporte de nutrientes, podrían llevar a una exitosa mitigación a largo plazo de los florecimientos (PAERL; OTTEN, 2013). Sin embargo, la principal dificultad se centra en las aristas políticas y sociales que afectan a la cuenca de un determinado cuerpo de agua, es decir, los municipios dentro de la cuenca deben estar comprometidos en la gestión, readecuación y fiscalización de las medidas. En Brasil, en el caso del río Tiete (LETICIA MORI, 2017) y en Paraguay, el caso del lago Ypacarai, se presentaron



dificultades similares: *i*) los municipios afectados en la cuenca, al ser gobernados por partidos políticos diferentes no presentaron voluntad de articular acciones, y si fueron articuladas se dieron parcialmente (DESIRÉ CABRERA, 2016); *ii*) no se avanzó o el avance fue insuficiente en el tratamiento de efluentes y éstos se continuaron vertiendo in natura al cuerpo de agua (STP, 2018); *iii*) no se gestionaron adecuadamente las ocupaciones y usos de suelo (LÓPEZ MOREIRA M. et al., 2018). Así, la estrategia de atacar el problema de raíz es la que presenta mayor dificultad de implementación.

### 2.6.2 Control químico

A lo largo de la historia, se han dado casos en los cuales la mayor parte de una población dada sufrió de severos síntomas gastrointestinales y hasta la muerte por beber agua que fue captada de cuerpos de agua con floraciones de cianobacterias. Uno de los primeros ejemplos registrados se dio en Palm Island, Australia en 1979, donde fue utilizado sulfato de cobre en el punto de captación para controlar el florecimiento de cianobacterias, luego de dicha intervención se dio una “misteriosa enfermedad” a la que llamaron síndrome de *Palm Island*, caracterizada por un cuadro severo similar a la hepatitis. Años después, se pudo demostrar que el sulfato de cobre provocó la lisis de células de cianobacterias, liberando las toxinas en grandes concentraciones al agua tratada (CODD et al., 1999; CARMICHAEL, 2001; PAERL; OTTEN, 2013).

La utilización de cianocidas químicos como el sulfato de cobre y otros, no se aconseja debido a su persistencia ambiental y efectos tóxicos sobre otros organismos acuáticos (MATTHIJS et al., 2016). Además, éstos producen lisis celular y liberación de cianotoxinas exacerbando los problemas de calidad de agua (KENEFFICK et al., 1993). El tratamiento con peróxido de hidrógeno ha demostrado ser altamente efectivo para la eliminación selectiva de las cianobacterias ya que no afecta significativamente a los demás organismos acuáticos siendo, además, degradado luego de unos días a agua y oxígeno molecular, sin embargo, luego de esta degradación las cianobacterias vuelven a colonizar (DRÁBKOVÁ et al., 2007; MATTHIJS et al., 2012; LÜRLING; MENG; FAASSEN, 2014).

### 2.6.3 Control biológico

Una de las principales interrogantes respecto a las floraciones de cianobacterias es por qué las mismas aparecen y desaparecen de forma natural de

sistemas acuáticos. Para este comportamiento no se han encontrado explicaciones satisfactorias (LEGRAND et al., 2003). Los agentes biológicos juegan un papel importante de control en la regulación y terminación de floraciones (SIGEE et al., 1999). Modelos sugieren que la abundancia, estructura y composición de las comunidades de algas pueden explicarse por diferentes factores abióticos como turbidez, caudal, temperatura, gases disueltos y bióticos como depredación, competencia e infecciones (SOMMER et al., 1986; HUISMAN et al., 2018). También se considera importante la presencia de factores endógenos, como la producción de toxinas y moléculas bioactivas, lo cual podría afectar la sucesión de algas (ELERT; JÜTTNER, 1996; WOLFE, 2000; LEGRAND et al., 2003). Infecciones virales y fúngicas pueden causar colapsos rápidos de las biomásas de cianobacterias, pero raramente el efecto es duradero (VAN WICHELEN et al., 2016). Las bacterias, a su vez, en un buen número de casos, lisan a las cianobacterias actuando de forma diferente en función de los niveles de población, de los nutrientes y del estado del agua (RASHIDAN; BIRD; SIGEE et al., 1999). Así, la lisis puede darse por adhesión bacteriana, mediante la formación de compuestos extracelulares, o endobiosis (IMAMURA et al., 2001; AHN et al., 2003; NAKAMURA et al., 2003; AIYAR et al., 2017)

En interacciones entre microalgas y bacterias, uno o más compuestos bioactivos inhiben el crecimiento de organismo competidor. Algunas sustancias son capaces de producir inhibición del crecimiento mediante mecanismos que produzcan lisis total o parcial de células. Entre estas moléculas bioactivas podemos encontrar: *i*) sustancias químicas como lípidos, péptidos o enzimas las cuáles son comúnmente secretadas por plantas acuáticas, macro y microalgas, cianobacterias, bacterias y virus (LEGRAND et al., 2003; DEMUEZ; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; BALLESTEROS, 2015).

#### 2.6.4 Bacterias con potencial para degradar microcistinas

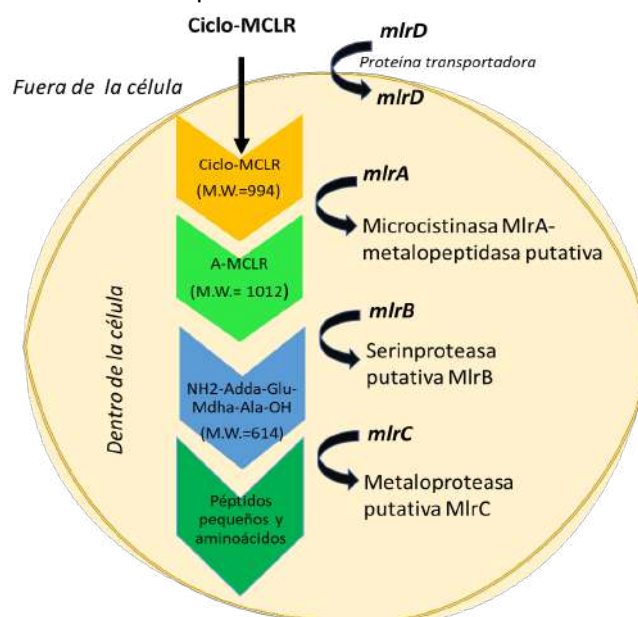
Debido a que la biodegradación es apuntada como principal vía de degradación de las MC, los métodos biológicos surgen como alternativa prometedora para el tratamiento de aguas (EDWARDS; LAWTON, 2009; ZHANG; PAN; YAN, 2010; ZHANG; YAN; PAN, 2011; LUO et al., 2013). A la fecha han sido estudiadas alrededor de 20 bacterias individuales, en consorcios o en biofilms, aislados de cursos de agua superficiales en embalses, sedimentos, lagunas de aguas residuales y filtros de arena (KORMAS; LYMPEROPOULOU, 2013; MASSEY; ZHANG; YANG, 2018). Una lista en detalle de más de 44 cepas de bacterias ambientales con capacidad de degradar

microcistinas se puede encontrar en revisiones de Kormas y colaboradores (2013) y Massey y colaboradores (2018, 2020). La mayor parte de las ellas, pertenecientes a las clases  $\beta$ -proteobacteria ( $\approx 40\%$ ) y Actinobacteria ( $\approx 20\%$ ). Cuando se utilizaron bacterias en condiciones originales o en consorcio, la degradación de las MC resultó ser lenta, y de manera contrastante, aislados bacterianos purificados realizaron la degradación con mayor rapidez. Esta información, junto con el conocimiento de que se ha observado degradación completa de la cianotoxina por microbiota natural lleva a inferir que, si bien la degradación en ambientes naturales ocurre con frecuencia, el proceso es lento (MANAGE; EDWARDS; LAWTON, 2009).

El mecanismo de degradación conocido de MC, fue dilucidado en estudios genotípicos de miembros de la familia Sphingomonadaceae, donde se evidenció la existencia de genes específicos que intervienen en la degradación de las MC. El cluster *mlr* incluye a los genes *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* y *mlrD*, los cuáles codifican al menos tres enzimas intracelulares en la bacteria *Sphingomonas* sp. ACM-3962 (BOURNE et al., 1996). La enzima que rompe la estructura cíclica a través del clivaje del enlace peptídico ADDA-Arg es codificada por *mlrA*, el gen de mayor importancia en el cluster, debido a que la estructura cíclica es la que confiere estabilidad a la molécula y adicionalmente provoca una reducción sustancial de la toxicidad de la cianotoxina (BOURNE et al., 1996; KORMAS; LYMPEROPOULOU, 2013). En la ruta de degradación descrita por los autores esquematizada en la Figura 7, primeramente, la enzima codificada por el gen *mlrA*, realiza una ruptura hidrolítica de la estructura cíclica de MC-LR. La molécula lineal MC-LR resultante a continuación es hidrolizada secuencialmente por peptidasas codificadas por los genes *mlrB* y *mlrC*. Por otro lado, el gen *mlrD*, codifica una proteína sin actividad hidrolítica, que permitiría el transporte de la MC y/o sus productos de degradación dentro y fuera de la célula (BOURNE et al., 1996).

La mayor parte de las bacterias degradadoras de MC forman parte del género *Sphingomonas*, sin embargo, la capacidad de degradar microcistinas no es generalizada en este género, por ello se ha sugerido teniendo en cuenta análisis de 16S rRNA, que esta capacidad fue adquirida evolutivamente por transferencia de genes (SAITO et al., 2003). Por otro lado, Manage y colaboradores (2009), realizaron el primer hallazgo de bacterias sin el cluster *mlr* con capacidad de degradar MC, las bacterias aisladas pertenecientes al filo Actinobacteria, incluidos géneros *Arthrobacter.*, *Brevibacterium*, y *Rhodococcus*, fueron capaces de degradar MC por una ruta diferente aún en estudio (MANAGE et al., 2009).

**Figura 7.** Ruta de degradación de microcistina LR y la formación de intermediarios de menor toxicidad producidos por *Sphingomonas* sp. ACM-3962. M.W.: peso molecular.



Fuente: Adaptado de BOURNE et al. (1996) y KORMAS et al. (2013)

### 2.6.5 Bacterias con actividad cianocida

Las bacterias además de ser importantes patógenos algales, juegan un rol importante en el reciclaje de nutrientes y transformación de energía en ecosistemas acuáticos (VERSCHUERE et al., 2000). Por ello se han estudiado extensamente como herramientas cianocidas mayormente en procesos de mitigación de florecimientos de algas (DEMUEZ; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; BALLESTEROS, 2015). La lisis de cianobacterias por bacterias fue reportada por primera vez en 1967 (SHILO, 1967) y desde entonces, numerosas bacterias con capacidad cianocida han sido estudiadas (NDLELA et al., 2018) principalmente de los filos Proteobacteria, Bacteroidetes y Alfarproteobacteria, debido a que comúnmente se encuentran en floraciones de *Microcystis* y *Anabaena* (EILER; BERTILSSON, 2004; QIN et al., 2011; KIM; SON; JEONG, 2015; NDLELA et al., 2018). Entre las bacterias que acompañan a las floraciones, frecuentemente se da una sucesión natural, donde algunas familias son representativas del inicio y otras de las etapas finales de la floración (TIAN; YANG; ZHANG, 2007; SHI et al., 2009). Así, miembros de los filos Proteobacteria, Bacteroidetes y Alfarproteobacteria son más abundantes en el inicio y pico de las floraciones, cuando los agregados de células son menores (CAI et al., 2014). Por otro lado, al final de la floración,

cuando se dan los mayores agregados celulares de cianobacterias, se da un incremento de bacterias predadoras pertenecientes a lo filo Firmicutes (particularmente pertenecientes al género *Bacillus*), presentando además capacidad de degradar cianotoxinas (SHUNYU et al., 2006; ZHANG; PAN; YAN, 2010; CAI et al., 2014).

Los mecanismos mediante los cuáles las bacterias producen lisis en algas, y de manera similar en cianobacterias, pueden darse por depredación, infección o producción de compuestos alelopáticos, y de acuerdo a Kodama y colaboradores (2006), se clasifican en (i) directos: que requieren contacto bacteria-alga y (ii) indirectos: en los cuales las bacterias producen o sintetizan un compuesto o sustancia que libera al medio circundante, y luego éste ataca a la célula algal. Los efectos líticos resultantes de estos mecanismos a su vez, son fuertemente dependientes de la densidad de bacterias y algas (SHAO et al., 2014).

Se han reportado alrededor de 120 *taxa* de microorganismos con capacidad de afectar negativamente la proliferación de *M. aeruginosa*, incluyendo bacterias, virus, hongos, protistas, otras cianobacterias y microalgas eucariotas (VAN WICHELEN et al., 2016; NDLELA et al., 2018). En estudios realizados en búsqueda de bacterias degradadoras de *Microcystis* (MLB por sus siglas en inglés), en las últimas décadas, se han reportado 33 géneros pertenecientes a Proteobacteria (n=19), Bacteroidetes (n=5), Actinobacteria (n=5) y Firmicutes (n=4), y en muchos casos, el rol ecológico o mecanismos mediante los cuáles se produce la degradación son aún desconocidos (VAN WICHELEN et al., 2016). Entre las bacterias MLB con mecanismos conocidos, algunas con modo de vida parasitario infectan las células de cianobacterias para luego producir lisis (CAIOLA; PELLEGRINI, 1984; VAN WICHELEN et al., 2016), otras por adhesión a la superficie de las células disminuyendo la disponibilidad de luz para realizar fotosíntesis o por agregación celular resultante de la producción aumentada de polisacáridos extracelulares (NAKAMURA et al., 2003). Se han identificado varios compuestos inhibitorios excretados por bacterias como aminoácidos, péptidos, enzimas, esteroides, pigmentos, glicolípidos y compuestos volátiles. Ozaki y colaboradores (2008) demostraron que *Brevibacillus* puede inducir en *Microcystis* la producción de b-ciclocitral, un compuesto volátil que programa a la cianobacteria la autólisis. Especies de *Aquimarina*, de manera similar, producen muerte celular en *Microcystis* mediante inducción de síntesis endógena de peróxido de hidrógeno a través de la secreción de una oxidasa de L-aminoácidos. Se ha observado también que ciertos metabolitos producidos por MLB pueden producir disminución de la síntesis de MC o su degradación (WU et al., 2011). Las principales bacterias con actividad cianocida versus *M. aeruginosa* son, de

manera general, aisladas de ambientes templados acuáticos, sedimentos, filtros de arena y asignadas a los géneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Rhodococcus* (MANAGE; KAWABATA; NAKANO, 2000; LEE et al., 2010; KANG; PARK; HAN, 2012; LUO et al., 2013; SHAO et al., 2014).

## 2.7 Microorganismos antárticos

Las regiones polares, por sus características de frío extremo, mitad del año con ausencia de luz, 99% de superficie cubierta por hielo y nieve, son consideradas las regiones más hostiles y poco estudiadas del mundo (JORQUERA; GRAETHER; MARUYAMA, 2019). La Antártida, rodeada por el océano austral, es el continente más alto, seco y frío del mundo. Su clima extremo y separaciones geográficas hacen a estos ecosistemas polares los últimos ambientes prístinos relativamente no afectados por la actividad humana (SCAR, 2020). Sin embargo, las regiones polares no se encuentran exentas de vida, sino por el contrario albergan las formas de vida más extraordinarias por sus sorprendentes adaptaciones. La mayor parte son microbianas, las cuales sobreviven y reproducen en todo tipo de hábitats, incluyendo rocas y suelo, lagos, sedimento, nieve e inclusive hielo (CLARKE, 2012).

La diversidad de ecosistemas acuáticos en el continente antártico es tal, que abarca desde diminutas inclusiones en el hielo, estanques de deshielo medianos a grandes ríos. En el verano, más de 700 ríos, estanques y lagos pueden cubrir el continente. Las temperaturas en los grandes cuerpos de agua, ya sean estacionales o permanentes, son usualmente estables a través del año, rondando los 5°C. En cambio, cuerpos de agua menores pueden fluctuar a lo largo del día y estacionalmente, con temperaturas en el rango debajo del punto de congelamiento y encima de 20°C, dependiendo de la radiación solar y el flujo de calor a los que se exponen (GREEN, 2009). Las láminas basales de estos ecosistemas, son usualmente heterotróficas y dominadas por procesos anaeróbicos de reducción de nitratos y sulfatos (VINCENT; QUESADA, 2012) y se encuentran compuestas principalmente por bacterias pertenecientes a Alfa, Beta, Gama-proteobacterias, Actinobacterias y Bacterioides (VARIN et al., 2012). Estas características únicas y la gran diversidad de estos microorganismos hacen que posean gran potencial biotecnológico que sigue siendo estudiado (MARGESIN et al., 2008).

Son escasos los estudios de bacterias de origen antártico con capacidad cianocida, entre ellos se destaca el descubrimiento de una bacteria cianocida del género

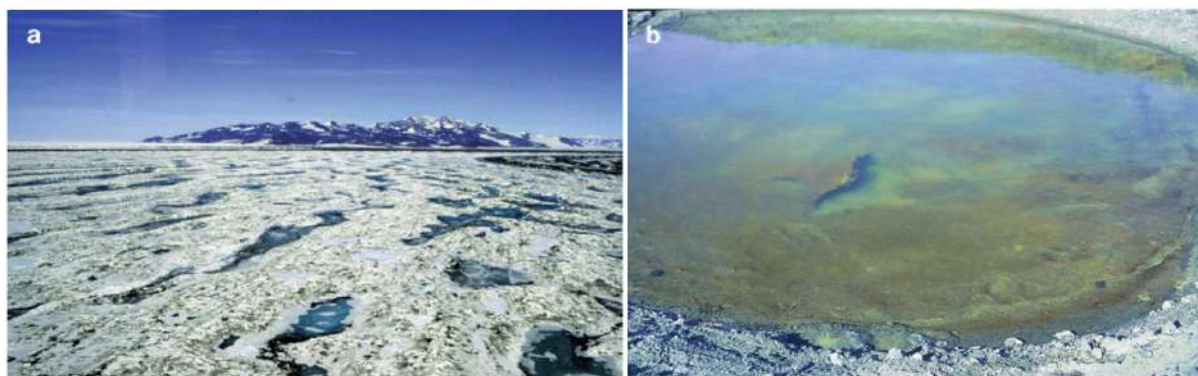
*Microbacterium*, que fue capaz de inhibir el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis salina* y de la microalga *Choricistis minor* (IVANOVA; STOYANCHEVA; POUNEVA, 2014). Y el hallazgo las bacterias cianocidas, *Ulvibacter* y *Psychroserpens* en sedimentos tomados en el frente polar antártico en el final de una floración algal (EMIL RUFF et al., 2014). Otro ejemplo de probable actividad inhibitoria es el del estudio realizado en el lago con elevada carga de nutrientes Heywood en Signy Island, Antártica, donde la población de bacterias pasó la transición de dominancia de cianobacterias a dominancia de Actinobacterias y alfa-proteobacteria marina (PEARCE et al., 2005). El filo Actinobacteria conformado por bacterias Grampositivas en su mayoría mesofilicas y especies psicotolerantes presentes en ambientes polares, es un grupo de organismos conocido por producir una amplia gama de metabolitos secundarios y ser uno de los más estudiados por su potencial biotecnológico (WHITE; WYNN-WILLIAMS; RUSSELL, 2000; GOMEZ-ESCRIBANO; BIBB, 2012; RAMPELOTTO, 2016). Varias especies de actinobacterias antárticas producen potentes antibióticos macrólidos, eficaces contra bacterias Gram-positivas y negativas (RAMPELOTTO, 2016). Estos podrían ser potenciales inhibidores de cianobacterias debido a que en estudios realizados por (DIAS et al., 2015), las cianobacterias presentaron sensibilidad al grupo de aminoglucósidos, tetraciclina y norfloxacina.

A pesar de estos indicios promisorios en el transcurso de esta revisión bibliográfica, no se han encontrado estudios que aborden la capacidad inhibitoria de extractos de bacterias del continente antártico sobre cianobacterias ambientales de la región subtropical.

## 2.8 Cianobacterias en el continente antártico

A pesar de la creencia generalizada de que las temperaturas cálidas (>20°C) son óptimas para el crecimiento de las cianobacterias, éstas han logrado establecer dominancia y suceso adaptativo en Antártida, particularmente en ambientes acuáticos como lagos y estanques a través de la formación de películas o tapetes microbianos, como puede apreciarse en la Figura 8 (QUESADA; VINCENT, 2012). Los ecosistemas antárticos se encuentran dominados por microorganismos procariotas y en particular por cianobacterias fotosintéticamente activas (PANDEY et al., 2004; SINGH; ELSTER, 2007).

**Figura 8.** Imágenes de estanques de deshielo en McMurdo Ice-Shelf. (a) vista aérea del “hielo sucio”; (b) detalle de uno de los estanques, donde son visibles los tapetes de cianobacterias cubriendo el fondo.



Fuente: QUESADA; VINCENT, (2012)

Las cianobacterias poseen adaptaciones que les permiten colonizar diversos ambientes, características como la capacidad de sobrevivir en un rango amplio de temperaturas, ser capaces de realizar fijación de nitrógeno, reducir azufre, sobrevivir en condiciones de déficit de nutrientes, oxígeno y poseer pigmentos fotosintéticos. Se han hallado cianobacterias en la mayor parte de las regiones del mundo incluyendo las regiones árticas (MERILUOTO et al., 2017). En regiones polares, han desarrollado estrategias adaptativas para colonizar ambientes con bajas temperaturas, tolerar la desecación, ciclos de congelamiento-descongelamiento, oscuridad total y radiación solar continua, encontrándose cianobacterias con características psicotolerantes en regiones árticas, sub-árticas y antárticas (TANG2; TREMBLAY; VINCENT, 1997). Por ello, aunque en medio de un debate continuo, algunos autores afirman que algunas especies de cianobacterias son endémicas en regiones antárticas (ZAKHIA et al., 2008).

En el continente antártico, se han encontrado cianobacterias con potencial de producir MC (JUNGBLUT; NEILAN, 2010). Los tapetes de cianobacterias en varios estudios registraron dominancia de Oscillatoriales como *Phormidium* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp. y *Leptolyngbya* sp., Nostocales como *Nostoc* spp. y *Nodularia* sp., siendo las especies de los órdenes Chroococales y Stigonematales menos frecuentes (TANG2; TREMBLAY; VINCENT, 1997; WOOD et al., 2008; JUNGBLUT; NEILAN, 2010; VINCENT; QUESADA, 2012; KLEINTEICH et al., 2014).

## 2.9 Microcistinas en el continente Antártico

Son escasos los estudios disponibles acerca de la toxicidad de las cianobacterias en regiones polares como la Antártica. El primer registro de la cianotoxina



microcistina fue en tapetes bentónicos en estanques del McMurdo Ice Shelf (HITZFELD et al., 2000). Sorprendentemente en un estudio realizado sobre muestras de cianobacterias en la expedición de Captain Scott's 'Discovery' (1901-1904), Jungblut y colaboradores encontraron microcistinas y metabolitos relacionados, siendo el registro de mayor antigüedad (>100 años) de cianotoxinas en la región del estudio. Sin embargo, en los estudios mencionados, no se han podido atribuir a especies específicas de cianobacterias la producción de microcistinas (JUNGBLUT et al., 2018).

Se ha registrado la presencia de MC en estanques de deshielo en Antártida continental, en varios cuerpos de agua superficial en la península Antártida, Adelaide Island y otras localidades, sugiriendo la probabilidad de una amplia distribución de la toxina en el continente (HITZFELD et al., 2000; WOOD et al., 2008; ZAKHIA et al., 2008; KLEINTEICH et al., 2014). En un estudio realizado por Kleintech y colaboradores (2014), se encontraron MC en 26 de 27 tapetes de cianobacterias estudiados. Destacando que los niveles de MC encontrados en los locales estudiados resultaron ser bajos (valor más alto  $303 \text{ ng g}^{-1}$ ) en comparación con los niveles encontrados en localidades templadas (arriba de  $10 \cdot 10^6 \text{ ng g}^{-1}$  de masa seca) (LUUC; SKULBERG; UTKILEN, 1999; JUNGBLUT et al., 2006; WOOD et al., 2008; KLEINTEICH et al., 2013).

En este escenario, en el cual las cianotoxinas microcistinas se encuentran en contacto con microorganismos antárticos, se presentan alternativas e incógnitas de si el potencial de degradar cianotoxinas y efectos cianocidas contra cianobacterias podrían estar presentes. Por ello, el empleo de microorganismos antárticos surge como una alternativa prometedora y poco estudiada para las aplicaciones que utilicen biotecnología en la recuperación de lagos y lagunas con floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas.

### 3 JUSTIFICATIVA

Los problemas relacionados a las floraciones de cianobacterias quizás tengan un origen tan antiguo, que resulte difícil datarlos, así Shilo (1967) sugirió que la historia natural de las aguas venenosas ya fue mencionada en la biblia, como una de las plagas de Egipto "*todas las aguas que había en el Nilo se convirtieron en sangre. Y los peces que había en el Nilo murieron y el río se corrompió, de manera que los egipcios no podían beber agua del Nilo*". En la actualidad, las cianobacterias, y entre ellas la más común *M. aeruginosa*, siguen siendo una de las principales amenazas para la calidad del agua, causando serios problemas a la salud pública en todo el mundo (LUUC; SKULBERG; UTKILEN, 1999; MERILUOTO et al., 2017).

Numerosos esfuerzos se han llevado y se llevan a cabo para el desarrollo de conocimiento que aporte a concretar soluciones a las floraciones de las cianobacterias y sus efectos tóxicos (PAERL; OTTEN, 2013). Sin embargo, al momento de la redacción de este trabajo y pese al amplio potencial biotecnológico de las bacterias de origen antártico, no se encuentran reportes de estudios realizados en búsqueda de estas actividades en bacterias de origen antártico contra *M. aeruginosa* y microcistina-LR. Las bacterias de origen antártico, se diferencian de las bacterias de ambientes templados en que al estar adaptadas a ambientes extremos, poseen vías en muchos casos únicas de metabolismo (JORQUERA; GRAETHER; MARUYAMA, 2019). Surge así, como alternativa poco explorada, el abordaje empleando microorganismos de localidades donde floraciones de *M. aeruginosa* aún no se han reportado. Asociada a la necesidad de estudios, el presente trabajo sentó parte importante de su justificativa en la escasez e inclusive, ausencia de trabajos similares.

## 4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

### 4.1 Pregunta de investigación

¿Extractos acelulares de bacterias antárticas pueden presentar actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* y/o degradar la cianotoxina microcistina LR?

### 4.2 Hipótesis

Las bacterias antárticas producen metabolitos secundarios y/o enzimas capaces de inhibir el crecimiento de la cianobacterias *Microcystis aeruginosa* y/o degradar la cianotoxina Microcistina LR.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 General

Investigar la capacidad de extractos acelulares de bacterias del continente Antártico aisladas de diversas muestras ambientales incluyendo suelo, sedimento e invertebrados marinos, de inhibir el crecimiento de cianobacterias tóxicas *Microcystis aeruginosa* y/o degradar las cianotoxinas microcistina LR.

### 5.2 Específicos

- Reactivar y obtener extractos de 200 bacterias ambientales del continente Antártico.
- Investigar la capacidad de los extractos de bacterias antárticas para inhibir el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* BCPUSP232 en medios sólido y líquido.
- Determinar los valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los extractos con actividades positivas.
- Investigar la capacidad de los extractos de bacterias antárticas para degradar la cianotoxina microcistina LR.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Reactivación y cultivo de microorganismos utilizados en el estudio

Para los experimentos, fue utilizada la cianobacteria clonal, no axénica *Mirocystis aeruginosa* BCP USP232 (BITTENCOURT-OLIVEIRA; OLIVEIRA; PINTO, 2011), obtenida de la Colección Brasileña de Cianobacterias de la Universidad de São Paulo (BCCUSP). La cepa fue cultivada axenicamente en medio de cultivo comercial optimizado para cianobacterias BG11 (Gifco®) a 25°C, bajo iluminación continua de aproximadamente  $6 \times 10^3$  lux y utilizada en la fase exponencial de crecimiento (4to día de cultivo). El crecimiento del cultivo fue evaluado diariamente midiendo densidad celular (células mL<sup>-1</sup>) utilizando hemocitómetro (Neubauer Improved, BOECO®, Germany) con auxilio de microscopio de acuerdo al método descrito por (KARLSON; CUSACK; BRESNAN, 2010). La densidad celular inicial de *M. aeruginosa* utilizada en los experimentos fue de aproximadamente  $2.0 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>.

Fueron reactivadas inicialmente doscientas cepas bacterianas de muestras antárticas, logrando crecimiento de setenta y seis de ellas a 20 °C. Las bacterias purificadas preservadas inicialmente a -80 °C en glicerol 20% fueron obtenidas de la Colección de Microorganismos Ambientales e Industriales (CBMAI) del Centro de Investigaciones Pluridisciplinar de Química, Biología y Agricultura (CPQBA) de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP). Las bacterias seleccionadas fueron aisladas de muestras provenientes de sedimento marino, biopelículas de suelo, invertebrados marinos, suelo, esponja marina y estrellas de mar (Anexo I), colectadas durante la expedición Antártica en el verano austral de 2013/2014 por el equipo brasileño MycoAntar, con metodologías descritas por (SILVA et al., 2018).

### 6.2 Preparación de extractos bacterianos

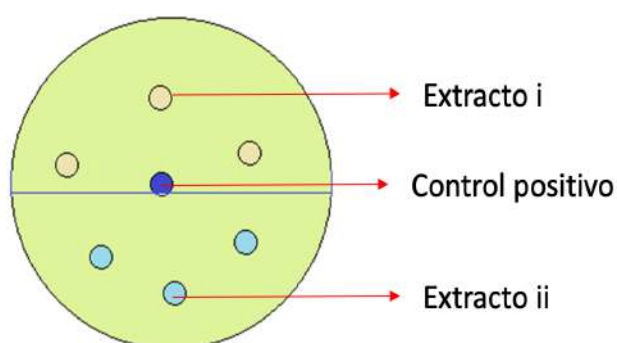
Cada cepa bacteriana fue inoculada en medio NB (extracto de carne 1.0 g, extracto de levadura 2.0 g y peptona 5.0 g, composición por litro) por 14 días a 20°C, con agitación continua en frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo. Las células bacterianas fueron estandarizadas y ajustadas a una densidad óptica OD 650 nm de 0.08 con medio de cultivo NB. Se realizó posteriormente la separación de las células del medio extracelular mediante centrifugación a 6.000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue filtrado a través de filtros estériles de membrana de 0.45 µm de tamaño

de poro (designado como filtrado). Los filtrados resultantes fueron cultivados en placas conteniendo agar con medio NA (medio NB con la adición de  $15 \text{ gL}^{-1}$  agar) para verificar ausencia de células viables en el mismo. Luego cada filtrado fue conservado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### 6.3 Actividad cianocida en medio sólido

La actividad cianocida de los extractos bacterianos en medio sólido se realizó utilizando el método *soft-agar overlayer method* (SAO) (UCHIDA et al., 1998). Aproximadamente, 5 mL de células de cianobacteria ( $2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) fueron mezclados con 5 mL de agar tibio a 0.08% (p/v), luego esta mezcla se vertió sobre una placa de Petri conteniendo 10 mL de agar 1.2% (p/v) solidificado. Una vez que la capa conteniendo las cianobacterias solidificó, fueron colocados, separados regularmente sobre el medio discos de papel de filtro estériles (6 mm diámetro) embebidos con 200  $\mu\text{L}$  de cada filtrado (Figura 9). Medio NA (medio NB con la adición de  $15 \text{ gL}^{-1}$  agar) estéril y  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ , fueron utilizados como control negativo y positivo, respectivamente. Las placas fueron incubadas a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  por diez días. La actividad cianocida fue evaluada mediante la medición del diámetro (mm) de la zona de inhibición (DIZ). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

**Figura 9.** Esquema que ilustra la disposición de los discos de filtrados bacterianos en la placa para prueba de efectos cianocidas en medio sólido.



### 6.4 Actividad cianocida en medio líquido

Un volumen de 100 mL del medio concentrado y estandarizado de *M.aeruginosa* en medio BG-11, conteniendo  $2 \times 10^6$  células  $\cdot\text{mL}^{-1}$ , fue transferido a un frasco estéril de 250 mL (LEE et al., 2010). Luego, una alícuota de 10 mL de cada filtrado

de bacterias fue añadido de manera individual al frasco conteniendo el cultivo de cianobacterias. Medio NB sin extractos bacterianos fue utilizado como control negativo. Los frascos fueron incubados bajo iluminación continua de  $6 \times 10^3$  lux y a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  por diez días. La densidad de cianobacterias fue monitoreada cada 24 horas mediante conteos de células bajo microscopio. De manera a mantener un error dentro del 10%, se realizaron conteos de al menos 400 células. Todos los experimentos fueron conducidos por triplicado. El efecto cianocida (%) de cada filtrado sobre *M. aeruginosa* fue calculado de la siguiente manera:

$$Efecto\ cianocida = \frac{1 - Tt}{2Ct} \times 100$$

Donde T es la densidad de cianobacterias con el tratamiento de filtrado bacteriano, C es la densidad de cianobacterias en el control negativo y t es el tiempo en días (JUNG et al., 2008).

En la Figura 12, se puede visualizar el aspecto macroscópico de los cultivos al final del experimento, en las imágenes es posible divisar de manera macroscópica el cambio de coloración y la sedimentación de las células de los tratamientos respecto al control.

## 6.5 Concentración Inhibitoria Mínima (MIC)

La MIC de los extractos bacterianos sobre *M. aeruginosa* fue determinada utilizando el método de dilución estándar descrito por (ELOFF, 1998) y adaptado a las condiciones de cultivo específicas del estudio. Los extractos bacterianos fueron preparados a partir de suspensiones celulares, ajustados a  $OD\ 650\ \text{nm} \cong 0.08$  con 50 mL de medio NB fresco e incubados por diez días a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente los cultivos celulares fueron lisados en Polytron, y la fase acuosa fue extraída con diclorometano (3x30mL) en embudo de decantación. El conjunto de fases orgánicas fue secado con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, filtrado y secado hasta evaporación completa del solvente con auxilio de rotavapor. El residuo fue resuspendido en 1 mL de dimetilsulfóxido (SETTE et al., 2006).

Los inóculos para los ensayos fueron preparados diluyendo cada extracto con medio BG11. Fueron utilizadas placas de cultivo celular de 96 pocillos. Para cada cepa bacteriana, dos soluciones stock fueron testadas, las mismas fueron diluidas y transferidas al primer pocillo. Fueron realizadas diluciones seriadas de manera a contener

concentraciones en el rango de  $1-0078 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Stock A). Extractos, sin diluciones también fueron utilizados (Stock B, Tabla 3). En cada pocillo de la microplaca, fueron colocadas alícuotas de  $100 \mu\text{L}$  del medio de cultivo BG-11, luego fueron dispensados  $100 \mu\text{L}$  de la solución stock correspondiente en cada fila (1 al 11), seguidos de diluciones seriadas ( $\frac{1}{2}$ ) de la columna A a la H, de la microplaca. En paralelo,  $100 \mu\text{L}$  del medio BG-11 fue añadido a la fila número 12, como control negativo. Finalmente,  $100 \mu\text{L}$  de inóculo de *M. aeruginosa* con una densidad celular inicial aproximada de  $2 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$  fueron agregados a cada uno de los pocillos de la microplaca. Las placas fueron incubadas a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  bajo iluminación continua de  $6 \times 10^3 \text{ lux}$  por 12 días, estableciéndose los tiempos de medición fueron 3,6,9 y 12 días.

La concentración inhibitoria mínima fue determinada mediante mediciones de densidad óptica DO a  $450 \text{ nm}$  y por adición de  $20 \mu\text{L}$  de solución acuosa  $0.5\%$  TTC (cloruro de trifeníl tetrazolio, Merck®) al final del experimento. La concentración inhibitoria mínima MIC fue definida como la concentración más baja en la cual el extracto bacteriano produjo inhibición visible del crecimiento de *M. aeruginosa*. TTC no se fija a células muertas.

## 6.6 Degradación de Microcistina-LR (MC-LR) por filtrados bacterianos

La habilidad de cada filtrado bacteriano de degradar MC-LR (CAS 101043-37-2, Millipore®, USA) fue investigada utilizando  $2 \text{ mL}$  de mezcla de reacción en viales de vidrio ámbar (ThermoFischer®). Se procedió a agregar  $400 \mu\text{L}$  de MC-LR de concentración inicial  $10 \text{ ppb}$  a  $1600 \mu\text{L}$  de filtrado bacteriano en cada vial, de manera a que la concentración final sea  $2 \text{ ppb}$ . El experimento fue realizado en una incubadora BOD (WTW TS/606-4) a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  en condiciones de oscuridad, de manera a prevenir la degradación de la toxina. Durante el experimento, fueron colectadas muestras a los 3, 6 y 9 días, rotuladas y almacenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para su análisis posterior.

La concentración de la cianotoxina MC-LR fue luego determinada mediante Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), que emplea anticuerpos policlonales mediante el ensayo colorimétrico del tipo competitivo (Figura 16) de acuerdo al método EPA 546 (ZAFFIRO; ROSENBLUM; WENDELKEN, 2016). Fue utilizado el kit comercial Microcystin-ADDA ELISA (Abraxis®, Warminster, PA). La absorbancia fue medida utilizando un lector de placas ELISA (Stat Fax 4200, Awareness®, USA) a  $450 \text{ nm}$ . Todas las determinaciones fueron realizadas en triplicado.



## 6.7 Análisis estadístico de datos

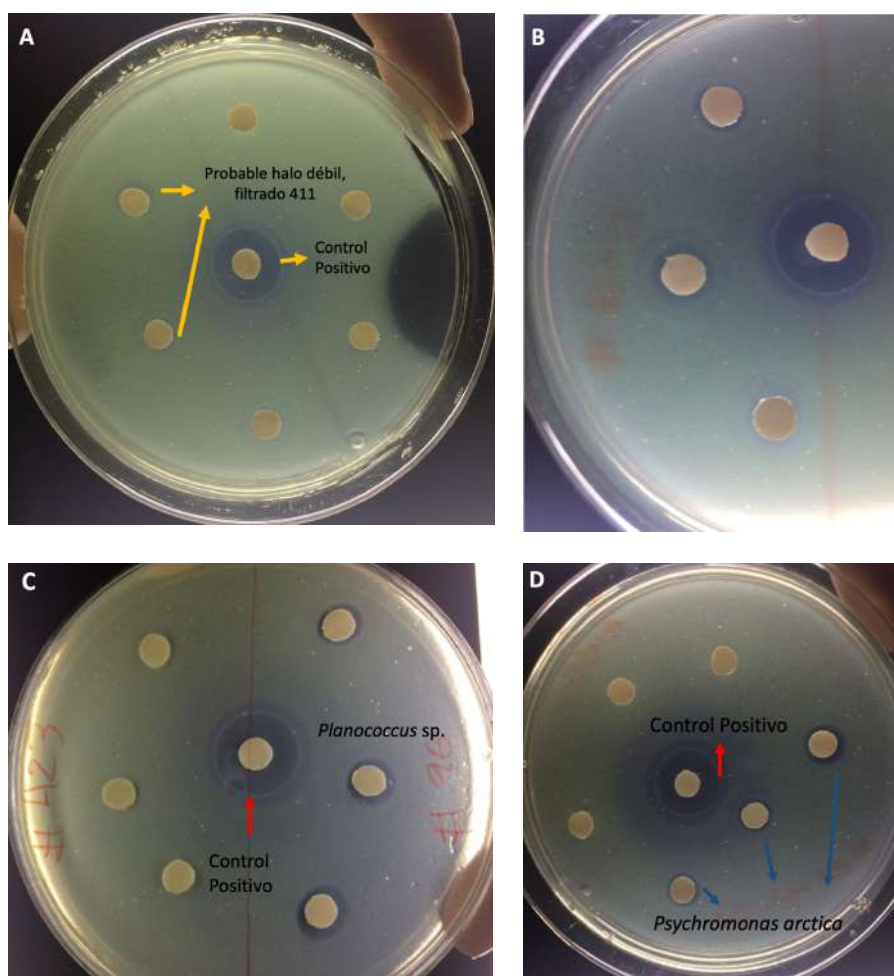
Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y la distribución de los datos obtenidos, fue testada utilizando la prueba de Shapiro Wilk. Para los efectos específicos sobre el crecimiento de *M. aeruginosa*, ANOVA de un factor o Kruskal-Wallis, de acuerdo a cada caso, fueron utilizados para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos. El test de Dunnet *post hoc* auxilió en la separación de as diferencias significativas entre medias. Todos los análisis fueron realizados con un 5% de nivel de significancia y utilizando el software PAleontological STatistics (PAST®) v.3.25 (HAMMER, 1999).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Actividad cianocida en medio sólido

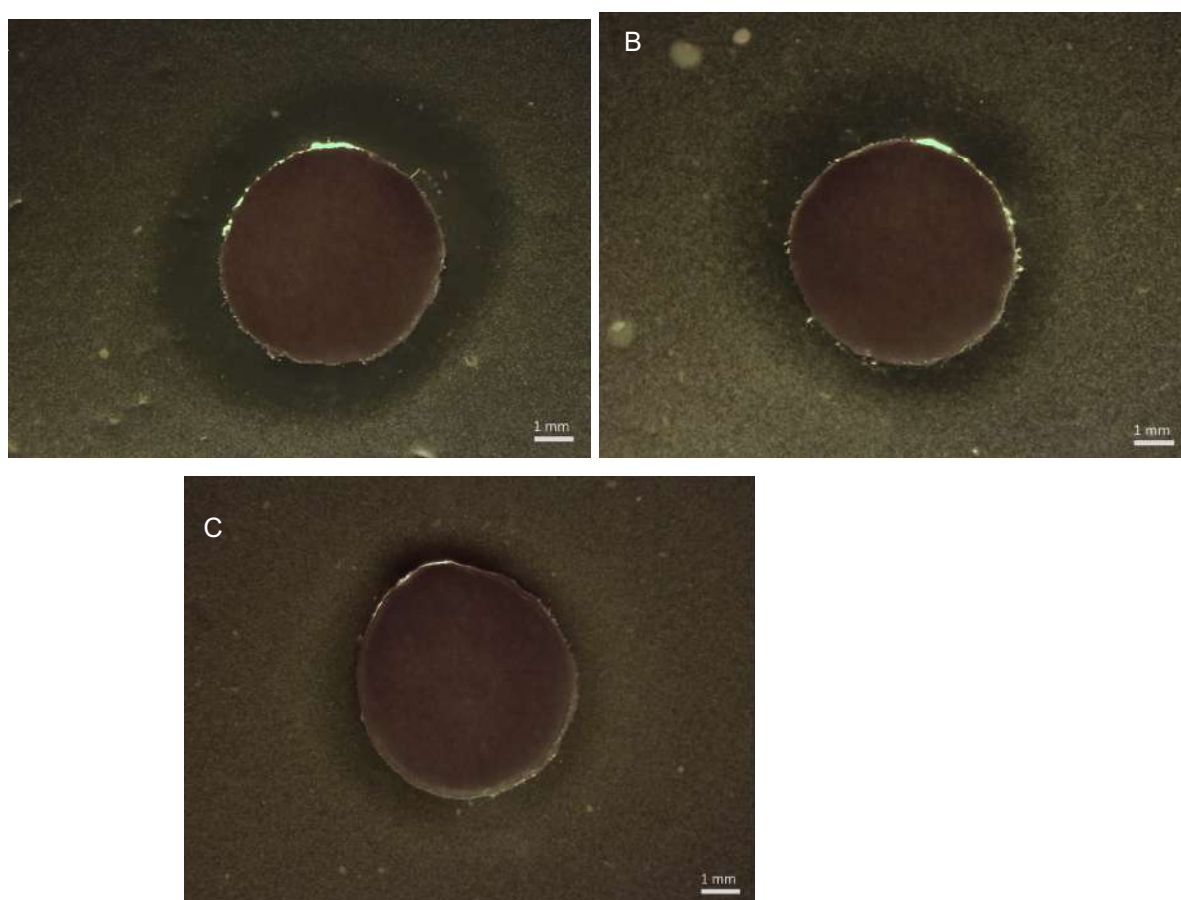
Se realizó la reactivación de 200 cepas de bacterias criopreservadas de acuerdo a lo descrito en la sección materiales y métodos, se logró la reactivación de 76 de las mismas para la posterior preparación de filtrados. Primeramente, los 76 filtrados fueron utilizados en la prueba de efecto cianocida en medio sólido, arrojando como resultado 4 cepas positivas y 7 con halos muy débiles o dudosos (Figura 10A-B), totalizando 11 cepas seleccionadas bajo los criterios mencionados para pruebas posteriores. Como resultado, 11 de las 76 bacterias ensayadas presentaron algún tipo de actividad que se detalla en las secciones siguientes.

**Figura 10.** Imágenes de la placa de cultivo en medio sólido con resultados de la prueba de filtrado bacterianos. (A) Imagen de la placa completa del filtrado 411 (No identificado), donde se indica el control positivo en el centro y a la izquierda los discos con el filtrado 411 (B) Acercamiento de la imagen A, donde se aprecia, un halo débil; (C) Placa del filtrado 96, *Planococcus* sp. y (D) Placa del filtrado ESH2-38, *Psychromonas arctica*.



En búsqueda de actividad cianocida, 76 filtrados bacterianos fueron testados mediante su impregnación en discos estériles que fueron colocados por triplicado junto con controles positivos y negativos en placas conteniendo una camada de *M. aeruginosa* como se muestra en la disposición representada en la Figura 9. La lista de las bacterias utilizadas en esta etapa, se encuentra detallada según identificación, sustrato y lugar de colecta en el Anexo I.

**Figura 11.** Microfotografías de los diámetros de zonas de inhibición (DIZ) de filtrados bacterianos en medio sólido con *M. aeruginosa*. Imágenes tomadas con lupa estereoscópica Leica S9i y objetivo 4X, las barras de escala representan 1 mm. (A) *Planococcus* sp. (Filtrado 96); (B) *Psychromonas arctica* (ESH2-38) y (C) 62 (no identificado).



Como resultado, cuatro filtrados bacterianos (62, ES7, 96 y *Psychromonas arctica* ESH2-38) fueron caracterizadas con actividad positiva, es decir con halo de inhibición alrededor de los discos, detectable bajo lupa estereoscópica Leica S9i (4X), exhibiendo una zona clara en el tapete de cianobacterias (Tabla 1 y Figura 10 C-D). El registro de los diámetros de inhibición fue realizado mediante medición de los halos (Figura 11). Otros siete filtrados, presentaron halos dudosos, que de igual manera fueron incluidos en las pruebas sucesivas de manera a confirmar o descartar posibles actividades que la resolución del test no haya podido evidenciar.

**Tabla 1.** Efecto cianocida (%) de filtrados bacterianos contra *M. aeruginosa* BCPUSP232 en medio sólido.

Bacteria	Identificación	Actividad cianocida en medio sólido (DIZ/±SD)
62	NI	7.7±0.2
96	<i>Planococcus</i> sp.	8.2±0.2
99	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND
359	NI	ND
383	NI	ND
411	NI	ND
417	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	ND
423	<i>Arthrobacter</i> sp.	ND
443	<i>Arthrobacter</i> sp.	ND
ES7	NI	11.2±0.8
ESH2-38	<i>Psychromonas arctica</i>	7.9±0.6

DIZ: diámetro de la zona de inhibición en mm; NI: bacteria no identificada; ND: no detectado. SD: desvío estándar.

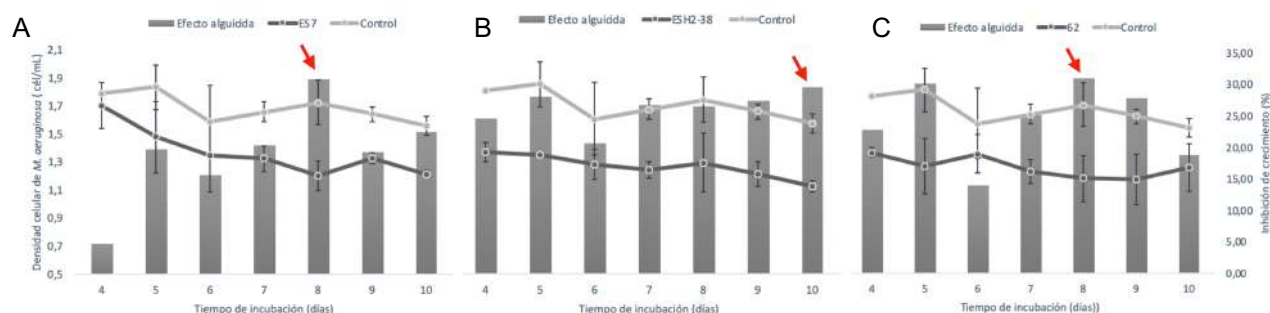
## 7.2 Actividad cianocida en medio líquido

La actividad cianocida de los filtrados bacterianos fue evaluada en cultivos líquidos de *M. aeruginosa* (Figura 12). Entre ellos, nueve filtrados bacterianos mostraron efectos significativos sobre el crecimiento de *M. aeruginosa*, con 95% de nivel de significancia (Tabla 2). De los 4 filtrados con actividad positiva previa en medio sólido, entre ellos, los filtrados ES7, ESH2-38 (*Psychromonas arctica*) y 62, presentaron efecto cianocida en medio líquido (Figura 13).

**Figura 12.** Fotografías del aspecto macroscópico de tratamientos de filtrados bacterianos al final del experimento. Es posible observar un cambio de coloración del cultivo y acumulación de biomasa en el fondo de los frascos de cultivo (día 10). (A) Control; (B) Filtrado ES7; (C) Filtrado 359.



**Figura 13.** Efecto cianocida en medio líquido de los filtrados con actividad positiva previa en medio sólido (A) ES7 (no identificado) (B) ESH2-38 (*Psychromonas arctica*) Y (C) 62 (no identificado).



Los niveles máximos de efecto cianocida registrados de los filtrados evaluados se encontraron en el rango de 24-33.5 %, (Tabla 2), donde en la mayor parte de los mismos (5/9 tratamientos), el pico se presentó al octavo día de incubación.

**Tabla 2.** Efecto cianocida (%) de filtrados bacterianos contra *M. aeruginosa* BCPUSP232 en cultivos líquidos.

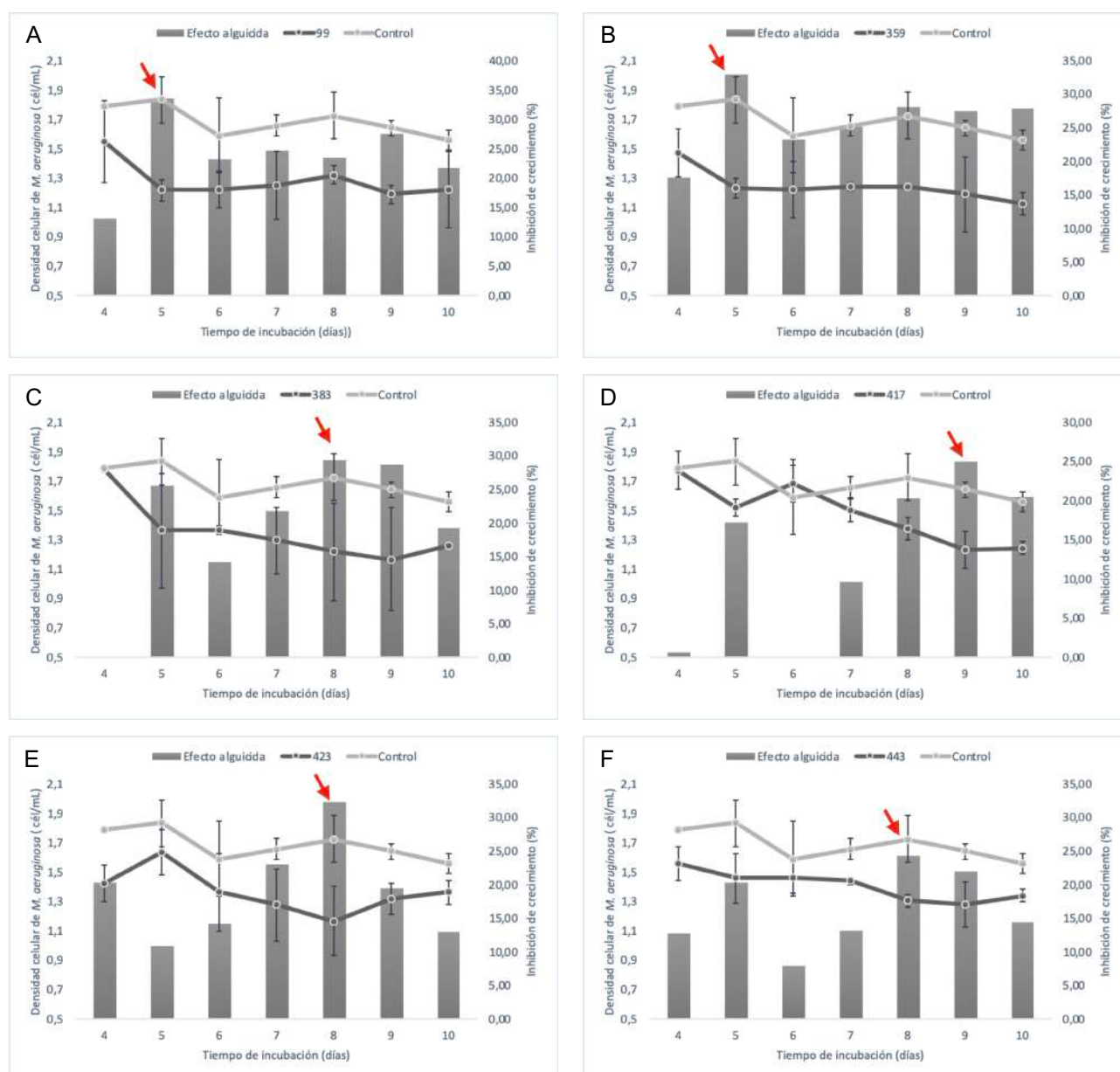
Bacteria	Identificación	Máximo efecto cianocida ( $\pm$ SD) medio líquido*	Tiempo (días)
62	NI	31.0 $\pm$ 9.8	8
96	<i>Planococcus</i> sp.	ND	-
99	<i>Pseudomonas</i> sp.	33.52 $\pm$ 3.8	5
359	NI	33.0 $\pm$ 3.7	5
383	NI	29.3 $\pm$ 19.3	8
411	NI	ND	-
417	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	25 $\pm$ 7.5	9
423	<i>Arthrobacter</i> sp.	32.3 $\pm$ 13.8	8
443	<i>Arthrobacter</i> sp.	24.3 $\pm$ 2.5	8
ES7	NI	30.3 $\pm$ 6.2	8
ESH2-38	<i>Psychromonas arctica</i>	28.7 $\pm$ 2.6	10

\*Valores de efecto cianocida (%) como media de tres replicas medidas  $\pm$ SD. El test de Kruskal-Wallis fue utilizado para determinar la significancia de las diferencia entre los tratamientos y los grupos control ( $H=11.94$ ,  $p=0.002541$ ); ANOVA de un factor con test Dunnet *post hoc* ( $F=7.347$ ,  $p=7.8 \times 10^{-5}$ ) fueron utilizados para determinar la existencia de significancia entre las diferencias de los aislados en el tiempo de incubación entre los controles y tratamientos (\*  $p<0.05$ ). SD: desvío estándar; NI: No identificado; ND: No detectado.

De entre los filtrados con resultado dudoso en medio sólido, seis de los mismos arrojaron resultados positivos en medio líquido (Tabla 2). Los filtrados de cepas de *Arthrobacter* sp. (423 y 443), presentaron actividades en medio líquido de 32.3 y 24.3%

respectivamente, al 8vo día de incubación. Las cepas no identificadas 383 y 417, presentaron actividades a partir del día 5 del experimento, presentando sus respectivos picos de 29.3 y 25 % entre los días 8 y 9 de incubación. Finalmente, las cepas 99 (*Pseudomonas* sp.) y 359 (no identificada), presentaron los mayores efectos cianocidas 33,52 y 33 % respectivamente, ambos al quinto día de incubación. Los citados efectos, fueron disminuyendo gradualmente hasta el final del experimento (Tabla 2 y Figura 14).

**Figura 14.** Efecto cianocida en medio líquido de los filtrados con actividad positiva previa en medio sólido (A) 9, *Pseudomonas* sp.; (B) 359 (no identificado); (C) 383 (no identificado); (D) 417, *Rhodococcus yunnanensis*; (E) 423 *Arthrobacter* sp. y (F) 443 *Arthrobacter* sp. Los valores fueron determinados por conteo directo bajo microscopio en un tiempo de incubación de 10 días. Las flechas rojas indican el mayor efecto cianocida observado en el periodo de incubación. Los datos son resultado de la media de tres réplicas de ensayo  $\pm$ SD. SD: desviación estándar.

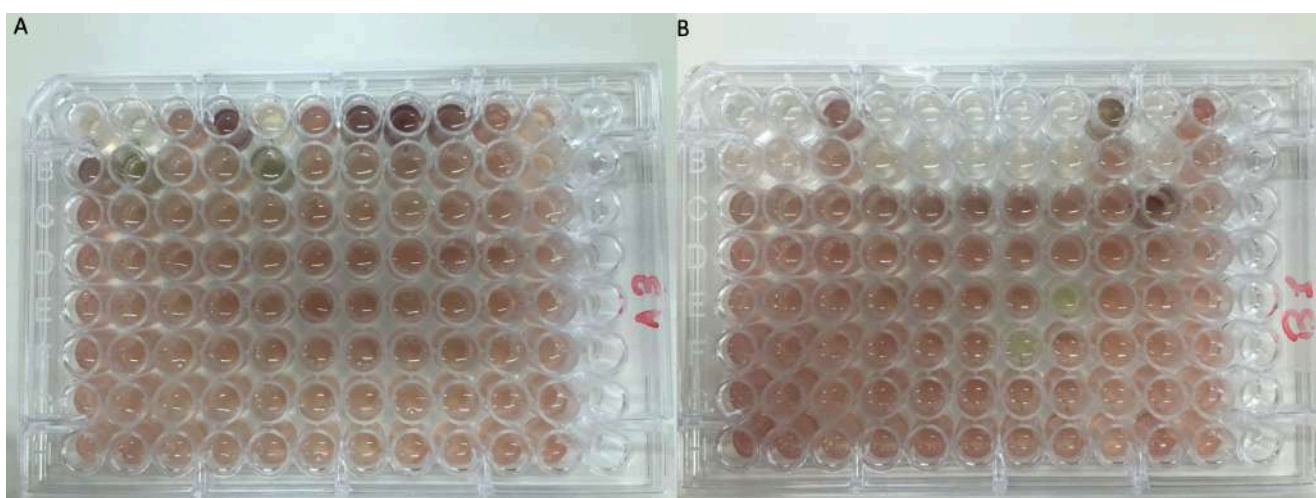


### 7.3 Concentración inhibitoria mínima (MIC)

De manera a conocer las concentraciones de extractos bacterianos capaces de producir efecto cianocida en medio líquido, fue realizada la determinación de MIC contra *M. aeruginosa* con densidad celular de  $2 \cdot 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>. Al final del experimento se colocó solución acuosa 0.5% TTC (cloruro de trifenil tetrazolio), de manera a visualizar la viabilidad de las células de cianobacterias. Los pocillos con coloración rojiza presentaban células vivas y, en cambio pocillos sin coloración o con disminución de ella respecto al control (columna 11), se consideraron como células no viables. La columna 12 de la microplaca, fue utilizada para el blanco de la reacción, conteniendo únicamente medio BG11 (Figura 16).

Todos los resultados listados en la Tabla 3, representan los valores de las densidades óptica DO 450 nm expresadas en porcentaje de inhibición de crecimiento respecto al control negativo (sin tratamiento, columna número 11). Para cada extracto, se testaron dos soluciones stock: *i*) Stock A, con concentraciones de 1-0.078 mg.mL<sup>-1</sup>; y *ii*) Stock B con concentraciones mayores detallados en la Tabla 3 (Figura 15.A-B). De los 11 extractos testados, 8 arrojaron resultados positivos de efecto cianocida (Tabla 3).

**Figura 15.** Microplacas con concentraciones de extractos en Prueba de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC). Cada columna corresponde a un extracto bacteriano y sus diluciones, columna 11 control negativo (sin adición de extracto) y 12 blanco (medio de cultivo BG11). Fue adicionado TTC (2,3,5- cloruro de trifeniltetrazolio) en todos los pocillos. TCC no produce coloración con células muertas. (A) Stock A con rango de conentraciones 1-0.078 mg.mL<sup>-1</sup>; (B) Stock B concentraciones más altas, referidas en Tabla 3. Pocillos con ausencia de coloración se consideran con actividad cianocida positiva (células muertas de *M.aeruginosa*).



*M. aeruginosa* resultó particularmente susceptible al extracto de la cepa 62 (no identificada), exhibiendo una substancial reducción de densidad celular ( $93.96 \pm 0.1\%$ ) luego de la exposición a  $1.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de extracto.

Extractos de *Arthrobacter* sp. (aislado 443) y de las bacterias no identificadas ES7 y 383, presentaron valores de MIC por debajo de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Por otro lado, los valores de MIC de las bacterias no identificadas 62 y 359, *Arthrobacter* sp. (423 y 411) y *Rhodococcus yunnanensis* (417) fueron mayores a  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

**Tabla 3.** Resultados del ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima de los filtrados bacterianos contra *M. aeruginosa*. \*Resultados expresados como media de tres replicas medidas  $\pm$ SD. Donde SD: Desvío Estándar; NI: No identificado; ND: No Detectado

Bacteria	Identificación	Rango MIC testado ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Inhibición de crecimiento MIC $*\pm$ SD ( $\% \pm$ SD)	MIC ( $\text{mg mL}^{-1}$ )
62	NI	1.1-0.008	$93.96 \pm 0.1$	1.1
96	<i>Planococcus</i> sp.	ND	ND	ND
99	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
359	NI	4.6-0.036	$44.41 \pm 0.1$	2.3
383	NI	1.5-0.012	$55.78 \pm 0.1$	0.75
411	NI	8.1-0.063	$51.96 \pm 0.1$	3.5
417	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	7-0.055	$51.96 \pm 0.1$	3.5
423	<i>Arthrobacter</i> sp.	5.9-0.0046	$35.73 \pm 0.1$	1.48
443	<i>Arthrobacter</i> sp.	3.4-0.026	$19.67 \pm 0.2$	0.85
ES7	NI	2-0.0156	$44.99 \pm 0.1$	0.55
ESH2-38	<i>Psychromonas arctica</i>	ND	ND	ND

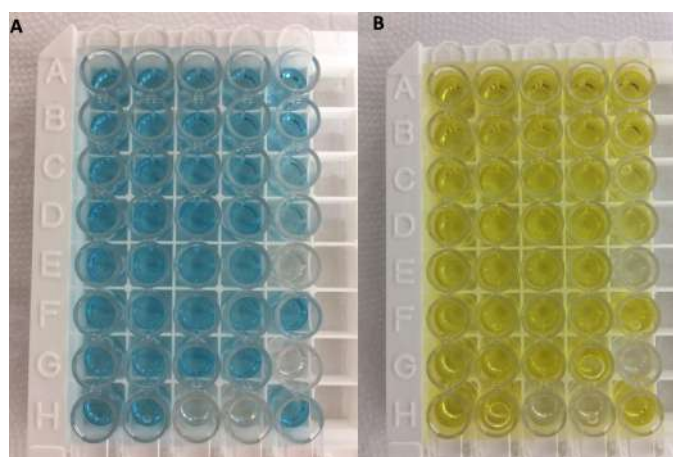
#### 7.4 Degradación de Microcistina-LR (MC-LR)

Fue evaluada la capacidad de 11 filtrados bacterianos de degradar la cianotoxina MC-LR a una concentración inicial de 2 ppb. En la figura 16 es posible visualizar las reacciones colorimétricas de las microplacas de ELISA. Fueron tomadas muestras a los 3, 6 y 9 días, mostrándose los resultados en la Figura 17. Los filtrados bacterianos utilizados fueron seleccionados a partir de las pruebas cianocidas en medio

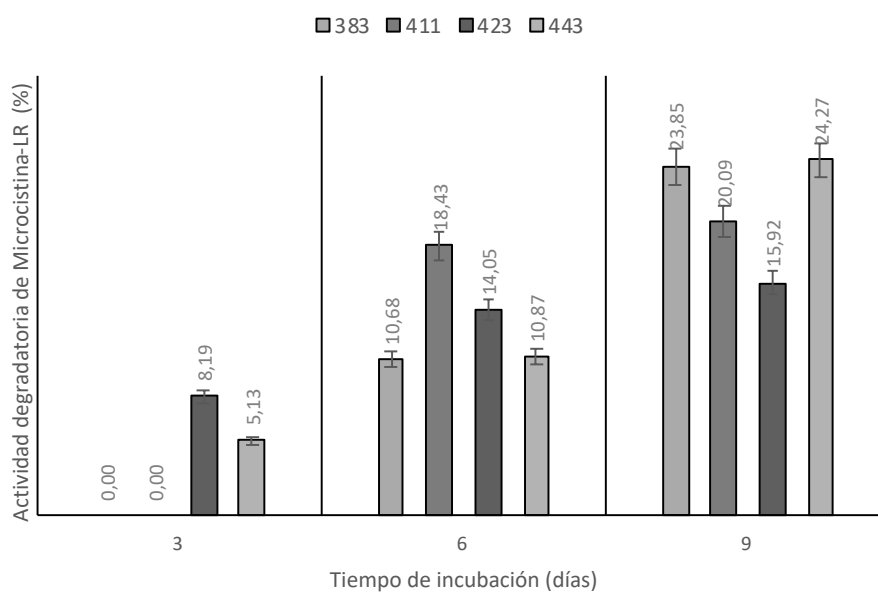


sólido y líquido. De los mismos, cuatro filtrados, dos cepas de *Arthrobacter* sp. (423 y 443) y dos no identificadas (383 y 411), fueron capaces de eliminar MC-LR en las condiciones del experimento (Tabla 4). La reducción de MC-LR expresada como actividad degradatoria (%) respecto al control, para cada tratamiento se muestra en la Tabla 4.

**Figura 16.** Fotografías de las microplacas de ELISA utilizadas para la cuantificación de Microcistina-LR. (A) Coloración luego de la adición del sustrato, los pocillos sin coloración son indicativos de presencia de toxina en la muestra (prueba competitiva); (B) Coloración al final del ensayo, luego de la adición de la solución de parada de reacción (solución stop, ácido clorhídrico).



**Figura 17.** Disminución de la concentración de microcistinas-LR por filtrados bacterianos expresados como actividad degradatoria (%). Condiciones del experimento, ausencia de luz, 20 °C. Las cepas 423 y 443 corresponden a cepas de *Arthrobacter* sp.; 383 y 411 (no identificadas).

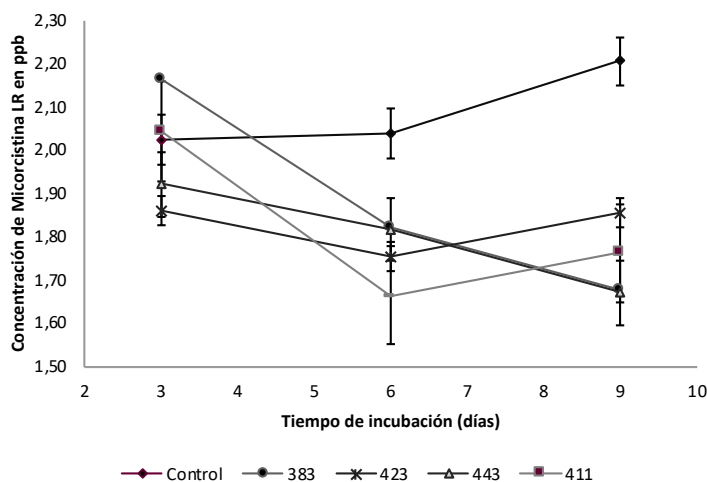


**Tabla 4.** Resultados del ensayo de degradación de microcistina LR por filtrados bacterianos. MC-LR con concentración inicial de 2 ppb \*Resultados expresados como media de tres replicas medidas  $\pm$ SD. Donde SD: Desvío Estándar. NI: No identificado; ND: No Detectado; MC-LR: Microcistina-LR.

Bacteria	Identificación	Degradación de MC-LR* ( $\pm$ SD) (%)
62	NI	ND
96	<i>Planococcus</i> sp.	ND
99	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND
359	NI	ND
383	NI	23.9 $\pm$ 11.3
411	NI	20.1 $\pm$ 4.5
417	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	ND
423	<i>Arthrobacter</i> sp.	15.9 $\pm$ 9.5
443	<i>Arthrobacter</i> sp.	24.3 $\pm$ 5.50
ES7	NI	ND
ESH2-38	<i>Psychromonas arctica</i>	ND

La concentración de MC-LR del control (sin tratamiento) no presentó disminución en el periodo de estudio (Figura 18). Las actividades de degradación, aumentaron del día 3 a 9 del experimento. En los filtrados con actividad positiva, se visualizó el máximo efecto en el día 9 del experimento. Las eficiencias de degradación variaron entre las bacterias ensayadas, siendo los filtrados de las bacterias 383 (no identificado) y 443 (*Arthrobacter* sp.), las de mayor eficiencia con 23.85% y 24.87% respectivamente, logrando una concentración final de 1.6 ppb (Figura 18). En el tercer día de experimentación, los filtrados de las bacterias 411 y 423 (*Arthrobacter* sp.), exhibieron una leve actividad (8.19 y 5.13%), incrementando gradualmente a 20.09% y 15.92%, respectivamente, en el noveno día.

**Figura 18.** Cambios en la concentración de microcistinas-LR en ppb por tratamientos con diferentes filtrados bacterianos. Los datos representan las medias  $\pm$  SE. SE: Error standard.



## 8 DISCUSIÓN

Los mecanismos de lisis algal por bacterias son clasificados en directos e indirectos, de acuerdo a Kodama y colaboradores (2006). Siendo los mecanismos directos aquellos que requieren del contacto bacteria-alga, mientras que los indirectos involucran la producción por parte de las células bacterianas de compuestos o sustancias que son liberadas al medio circundante, donde luego atacan a la célula algal produciendo su lisis. En el presente estudio, todos los ensayos fueron realizados con extractos bacterianos acelulares y las actividades cianocidas y de degradación de MC-LR fueron evaluadas.

Como resultado, tres de los setenta y seis filtrados bacterianos ensayados, correspondientes a las bacterias 62, ES7 y *Psychromonas arctica* ESH2-38, fueron capaces de producir lisis de *M. aeruginosa* en cultivos líquidos y sólidos (Tablas 1 y 2). Adicionalmente, ocho bacterias presentaron actividad cianocida en medio líquido, y cuatro presentaron efectos degradatorios de MC-LR (Tabla 4). La fuerza de las respuestas inhibitorias fue evaluada mediante ensayos de MIC (Tabla 3), donde ocho extractos bacterianos inhibieron el crecimiento de *M. aeruginosa* con diferentes sensibilidades.

Recientemente, pocos géneros de bacterias (e.g. *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*) fueron reportados con capacidad de degradar MC (MANAGE; EDWARDS; LAWTON, 2009; MASSEY; ZHANG; YANG, 2018). A pesar de que algunos de los géneros previamente informados como *Arthrobacter* y *Rhodococcus* coinciden con géneros bacterianos en el presente estudio, para nuestro conocimiento, es el primer reporte de actividades cianocidas y de degradación de MC-LR por parte de bacterias de origen antártico.

El género *Planococcus*, se encuentra comprendido por veintinueve especies reconocidas (EUZEBY, 1997; PARTE et al., 2020), de las cuáles dos han sido aisladas de ambientes antárticos, específicamente en muestras de tapetes de cianobacterias (REDDY et al., 2002). A pesar de que ninguna de las especies ha sido reportada como poseedora de propiedades cianocidas, resultados del presente estudio demuestran que filtrados de la bacteria *Planococcus* sp. aislado 96, proveniente de muestras de sedimento marino, exhibieron actividad cianocida en medio sólido (DIZ  $8.2 \pm 0.2$  mm). El filtrado 99, correspondiente a *Pseudomonas* sp., cuyos extractos acelulares ya mostraron actividades antimicrobianas, antiproliferativas y antiparasíticas, en estudios realizados por Silva y colaboradores (2018). En este estudio, mostró capacidad de inhibir levemente el crecimiento de *M. aeruginosa* en medio líquido  $27.4 \pm 3.7\%$ , no siendo detectada capacidad de degradar MC-LR. Estos resultados, se

contraponen a los de un estudio de Kang y colaboradores (2012), en donde cepas de *Pseudomonas* spp. mostraron capacidad de lisar el 90% de las células de *M. aeruginosa* en co-cultivo y condiciones de baja densidad de cianobacterias, sin embargo, este efecto no fue observado con cianobacterias en alta densidad ( $10^6$  células mL<sup>-1</sup>). Por ello, podemos proponer la hipótesis de que los compuestos responsables por las actividades degradatorias de MC y cianocidas, en las condiciones experimentales, podrían encontrarse en concentraciones por debajo de las necesarias para observar un efecto importante, que este, es dependiente de la densidad de cianobacterias y como lo observado por Kang y colaboradores (2012), los compuestos activos podrían ser producidos por las bacterias como resultado de mecanismos de supervivencia y, por lo tanto, para su síntesis sea necesaria la interacción bacteria-alga.

En bacterias pertenecientes al género *Sphingomonas*, la degradación de microcistinas, participa un *cluster* de cuatro genes (*mlrA*, *mlrB*, *mlrC* y *mlrD*). El gen *mlrA* codifica la enzima microcistinasa (MlrA), capaz de clivar la molécula cíclica de MC convirtiéndola en molécula lineal menos tóxica. MlrB y MlrC, pueden hidrolizar la MC-LR. Por otro lado, MlrD participa como transportador de oligopeptidos (WANG et al., 2019). Estudios pioneros de *Rhodococcus* sp., aislados de muestras de aguas superficiales, demostraron que estas bacterias, pudieron degradar MC por un mecanismo alternativo, independiente del *cluster* de genes *mlr* (MANAGE et al., 2009). Poco después, Lee y colaboradores (2010), reportaron que exudados de *Rhodococcus* sp., presentaron efectos cianobactericidas contra *M. aeruginosa* en el orden de 75-97%. *Rhodococcus yunnanensis*, que previamente fue asociado con actividad degradatoria de naftaleno (ANAN'INA et al., 2011), en el presente estudio presentó baja actividad inhibitoria en medio líquido, confirmada por el elevado valor de MIC (3.50 mg mL<sup>-1</sup>). Con la concentración mencionada, el filtrado exhibió una reducción de crecimiento de  $51.96 \pm 0.1\%$ , respecto al control negativo, y contrariamente a lo observado en los estudios citados previamente, no fue detectable actividad degradatoria de MC-LR.

A partir del primer registro de degradación de MC por parte de bacterias, nueve cepas pertenecientes al género *Arthrobacter*, aisladas de aguas superficiales han sido estudiadas (MANAGE; EDWARDS; LAWTON, 2009; LAWTON et al., 2011). En el presente estudio, reportamos dos cepas de *Arthrobacter* sp. (423 y 443) con actividad cianocida contra *M. aeruginosa* y de degradar MC-LR. Específicamente, la cepa 443, exhibió la mayor capacidad degradatoria de MC-LR, en las condiciones experimentales del estudio (24.27%) y el menor valor de MIC (0.85 mg.mL<sup>-1</sup>). En el mismo sentido, la cepa 423, presentó un efecto cianocida de  $32.3 \pm 13.8 \%$ , con un valor de MIC de 1.48

mg.mL<sup>-1</sup>. Los valores de degradación de MC observados se encontraron en el mismo orden de magnitud que aquellos observados por Lawton y colaboradores (2011). *Psychromonas arctica* (ESH2-38), aislada de estrella marina, exhibió un halo de inhibición en medio sólido de 7.9±0.6 mm en el tamizaje de actividad cianocida en medio sólido, y un efecto cianocida en medio líquido de 28.7±2.6 %. No se han encontrado otros reportes de actividades cianocidas y de degradación de MC-LR para esta especie en el transcurso de la revisión bibliográfica.

Entre las bacterias seleccionadas en este estudio, cinco (62, 359, 383, 411 y ES7), no cuentan con identificación taxonómica, a pesar de ello, se realiza la divulgación de sus actividades debido a los interesantes resultados exhibidos en los experimentos. Así, los filtrados de las bacterias 62, 383 y ES7 presentaron actividades positivas en todos los experimentos, con valores de MIC de 1.1; 0.75 y 0.55 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Entre ellas, la aislado 62, pudo inhibir fuertemente el crecimiento de *M. aeruginosa* en 94%. Las bacterias 359 y 411 (aisladas a partir de invertebrado marino), presentaron actividades cianocidas en medio líquido con altos valores de MIC, de 2.30 y 3.50 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Sugiriendo que sus actividades de inhibición contra *M. aeruginosa*, si bien se encuentran presentes, resultaron ser significativamente bajas en las condiciones experimentales. Es importante realizar la aclaración de que las 5 cepas productoras de compuestos cianocidas serán caracterizadas molecularmente.

Los ambientes acuáticos donde ocurren floraciones de cianobacterias, contienen una vasta biodiversidad bacteriana, sin embargo, meta-análisis realizados por Kormas y colaboradores (2013), resaltan que, dentro de la misma, existen pocas especies que posean el gen *mlrA*, responsable del potencial de degradación de microcistinas. La mayor parte de las mismas integrantes proteobacteria (alfa y beta) y actinobacterias. Inclusive, el descubrimiento de Actinobacterias con la ausencia de los genes *mlr*, abrió posibilidades de la existencia de otros genes y mecanismos involucrados en la degradación de microcistinas (MANAGE et al., 2009). Respecto a los ambientes de los cuáles proceden las mismas, la mayor parte proviene de lagos eutróficos (68% de las bacterias reportadas), siendo escasas las bacterias provenientes de suelo o sedimento (probablemente debido al hábito anaeróbico o aeróbico facultativo), como *Paucibacter toxivorans* (KORMAS; LYMPEROPOULOU, 2013) y *Streptomyces* sp. (LUO et al., 2013). Al momento de la presente revisión, no hemos encontrado reportes de bacterias provenientes de sustratos como invertebrados, estrellas de mar y esponjas de mar, en el mismo sentido, no hemos encontrado reportes de bacterias de ambientes fríos.

En este estudio, la mayor parte de las bacterias con actividades cianocidas y/o de degradación de MC-LR, pertenecen al filo Actinobacteria, siendo *Arthrobacter* (n=2) y *Rhodococcus* (n=1), entre ellos cepas provenientes de suelo y esponja marina. En segundo lugar, Proteobacteria como *Psychromonas arctica* (aislada de estrella marina) y *Pseudomonas* sp. y Firmicutes, del género *Planococcus* sp. (de sedimento marino). Estas bacterias, provenientes de esponjas e invertebrados marinos podrían cumplir un rol en la defensa de estos organismos respecto a cianotoxinas, hipótesis que podría ponerse a prueba en estudios futuros que aborden el fenómeno observado desde una perspectiva de relaciones ecológicas. Por ello, creemos que los datos resultantes de este trabajo, confirman la existencia de microorganismos con las actividades estudiadas en diversos sustratos, de ecosistemas donde no se ha registrado presencia previa de *M. aeruginosa* y provenientes de ambientes polares escasamente estudiados. Las sustancias producidas por estas bacterias de ambiente polar, demostraron ser eficaces contra *M. aeruginosa* de climas templados de ocurrencia extremadamente distante. Es así que los datos obtenidos y las actividades observadas dan sustento la hipótesis inicial del presente trabajo, colocando a las bacterias antárticas en los registros como poseedoras de actividades cianocidas y de degradación de MC-LR.

## 9 CONSIDERACIONES FINALES

El presente trabajo, buscó abordar el problema de las floraciones empleando microorganismos ambientales de origen antártico, también el efecto de los mismos sobre la toxina de mayor ocurrencia, la microcistina-LR. En el mismo, se tuvo como objetivos explorar la capacidad de extractos acelulares de 76 cepas de bacterias de inhibir o reducir la proliferación de *M. aeruginosa* BCP USP232 productora de microcistinas y, además, conocer si los extractos poseen capacidad de degradar microcistina-LR.

Esta investigación, presenta información que creemos podrá dar inicio a mayores y más complejos estudios de las bacterias antárticas *versus* cianobacterias de ocurrencia subtropical. A pesar de que algunos de los efectos observados fueron leves, el hallazgo de los mismos coloca cuestionamientos que, para hallazgo de sus respuestas obliga a llevar a cabo investigaciones más profundas referentes a actividades cianocidas, como la evaluación de los metabolitos formados productos de la degradación de MC-LR por bacterias antárticas. Estudios necesarios para comprender en detalle los mecanismos moleculares e identificar los compuestos involucrados. De manera a describir, de forma preliminar los trabajos que se encuentran en perspectiva, podemos listar: i) identificación de compuestos resultantes de la degradación de MC-LR por parte de extractos de bacterias antárticas, ii) estudios de actividades cianocidas y/o de degradación de MC en condiciones de co-cultivo o con extractos intracelulares, iii) búsqueda del cluster de genes *m/r* en bacterias antárticas con actividad degradatoria de MC-LR, iv) identificación de las sustancias o compuestos químicos responsables por las actividades, v) pruebas en mesocosmos, vi) estudios del rol ecológico de las sustancias o compuestos. De esta forma, podemos decir que las bacterias aisladas del continente Antártico, se colocan en perspectiva como herramientas promisorias para estudios futuros como parte del acervo de herramientas biotecnológicas para el tratamiento de los recursos hídricos afectados por *M. aeruginosa* alrededor del mundo.

## 10 REFERENCIAS

- ADÁMEK, Z. et al. Screening assessment of cyanobacterial embryotoxicity to Japanese medaka, *Oryzias latipes* (Actinopterygii: Beloniformes: Adrianichthyidae). **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 41, n. 4, p. 293–299, 2011.
- AHN, C.-Y. et al. Selective control of cyanobacteria by surfactin-containing culture broth of *Bacillus subtilis* C1. **Biotechnology letters**, v. 25, n. 14, p. 1137–42, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967000>>. Acesso em: 21 out. 2018.
- AIYAR, P. et al. Antagonistic bacteria disrupt calcium homeostasis and immobilize algal cells. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2017. Disponível em: <[www.nature.com/naturecommunications](http://www.nature.com/naturecommunications)>. Acesso em: 11 jul. 2020.
- ANAN'INA, L. N. et al. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 309–316, ago. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21503712/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.
- BARTRAM, J.; BALLANCE, R. **Water quality monitoring: a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes**. London: United Nations Environment Programme and the World Health Organization, 1996.
- BENITEZ, G. et al. **Influencia de factores ambientales sobre la biodiversidad de cianobacterias en el Lago Ypacarai Libro de resúmenes IV Congreso Paraguayo de Recursos Hídricos** Asunción Asociación Paraguaya de Recursos Hídricos, 2015.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; PINTO, E. Diversidade de genótipos produtores de microcistinas em linhagens brasileiras de microcystis (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 209–216, fev. 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-69842011000100030&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842011000100030&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 22 jul. 2020.
- BOOPATHI, T.; KI, J. S. Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. **Toxins**, v. 6, n. 7, p. 1951–1978, 2014.
- BOURNE, D. G. et al. Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4086–4094, 1996.
- CAI, H. et al. Bacterial Community Composition of Size-Fractioned Aggregates within the Phycosphere of Cyanobacterial Blooms in a Eutrophic Freshwater Lake. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e102879, 21 ago. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0102879>>. Acesso em: 13 out. 2020.
- CAIOLA, M. G.; PELLEGRINI, S. Lysis of *Microcystis aeruginosa* (Kütz) by *Bdellovibrio*-like bacteria. **Journal of Phycology**, v. 20, n. 4, p. 471–475, 1 dez. 1984. Disponível em:



<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.0022-3646.1984.00471.x>>. Acesso em: 8 dez. 2020.

CALTEAU, A. et al. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014.

CARMICHAEL, S. W.; KAUP, A. **Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins: Isolation and characterization**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a224751.pdf>>.

CARMICHAEL, W. W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 7, n. 5, p. 1393–1407, 3 set. 2001. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20018091095087>>. Acesso em: 20 out. 2018.

CHORUS, I. **Cyanotoxins : occurrence, causes, consequences**. Berlin: Springer, 2001.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 1999.

CLARKE, A. Life at extremes: environments, organisms and strategies for survival. In: BELL, E. (Ed.). **Antarctic Science**. Wallingford: Cambridge University Press, 2012. 25p. 470–470.

COBO, F. Métodos de control de las floraciones de cianobacterias en aguas continentales. **Limnetica**, v. 34, n. 1, p. 247–268, 2015.

CODD, G. et al. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **European Journal of Phycology**, v. 34, n. 4, p. 405–415, 1999.

CODD, G. A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. **Ecological Engineering**, v. 16, n. 1, p. 51–60, 2000.

CODD, G. A.; BELL, S. G.; BROOKS, W. P. Cyanobacterial Toxins in Water. **Water Science and Technology**, v. 21, n. 3, p. 1–13, 1 mar. 1989. Disponível em: <<https://iwaponline.com/wst/article/21/3/1-13/23563>>. Acesso em: 20 out. 2018.

CONAMA. **Resolução CONAMA nº 274** Agência Nacional de Águas Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2000.

CONAMA. **Resolução Conama Nº 357** Agência Nacional de águas, , 2005. . Disponível em: <[http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO\\_CONAMA\\_n\\_357.pdf](http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf)>.

DEMUEZ, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Cianocidal microorganisms and secreted algicides: New tools to induce microalgal cell disruption. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1615–1625, 1 dez. 2015.

DESIRÉ CABRERA. Más “proyectos” para recuperar el lago Ypacaraí. **ABC color digital**, 31 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.abc.com.py/nacionales/mas-proyectos-para-recuperar-el-lago-1514091.html>>. Acesso em: 21 out. 2018.

DIAS, E. et al. Assessing the antibiotic susceptibility of freshwater Cyanobacteria spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 799, 11 ago. 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00799/abstract>>. Acesso em: 26 out. 2018.

DRÁBKOVÁ, M. et al. Selective effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cyanobacterial photosynthesis. **Photosynthetica**, v. 45, n. 3, p. 363–369, set. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11099-007-0062-9>>. Acesso em: 21 out. 2018.

EDWARDS, C.; LAWTON, L. A. Chapter 4 Bioremediation of Cyanotoxins. In: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Adv Appl Microbiol, 2009. 67p. 109–129.

EILER, A.; BERTILSSON, S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1228–1243, 1 dez. 2004. Disponível em: <<https://sfamjournals-onlinelibrary-wiley.ez350.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2004.00657.x>>. Acesso em: 13 out. 2020.

ELERT, E. Von; JÜTTNER, F. Factors influencing the allelopathic activity of the planktonic cyanobacterium *Trichormus doliolum*. **Phycologia**, v. 35, n. 6S, p. 68–73, 3 nov. 1996. Disponível em: <<http://www.phycologia.org/doi/abs/10.2216/i0031-8884-35-6S-68.1>>. Acesso em: 27 out. 2018.

ELOFF, J. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 08, p. 711–713, 4 dez. 1998. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-957563>>. Acesso em: 12 ago. 2020.

EMIL RUFF, S. et al. Indications for algae-degrading benthic microbial communities in deep-sea sediments along the Antarctic Polar Front. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 108, p. 6–16, 1 out. 2014.

ESTEVES, F. de A.; PEREIRA, F. M. Eutrofização artificial. In: **Fundamentos de Limnologia**. 3ra. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011. p. 826.

ESTEVES, F. de A.; SUZUKI, M. S. Comunidade fitoplanctônica. In: **Fundamentos de Limnologia**. 3ra. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011. p. 826.

EUZEBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 590–592, 1997.

FALCONER, I. et al. Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 1, p. 43–50, 30 abr. 2005. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/2/1/43>>. Acesso em: 20 out. 2018.

FASTNER, J. et al. Combating cyanobacterial proliferation by avoiding or treating inflows with high P load—experiences from eight case studies. **Aquatic Ecology**, v. 50, n. 3, p. 367–383, 23 set. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10452-015-9558-8>>. Acesso em: 20 out. 2018.

FSI. **Thames - Freshwater information**. Disponível em: <<http://fis.freshwatertools.eu/index.php/thames.html>>. Acesso em: 21 out. 2018.

GESSNER, F. BOHUSLAV FOTT: Algenkunde. 2. Auflage. - Mit 303 Abb. VEB Gustav Fischer verlag Jena 1971. 581 Seiten. 58, - DM. **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v. 57, n. 1, p. 175–176, 1 jan. 1972. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/iroh.19720570117>>. Acesso em: 17 out. 2020.

GOMEZ-ESCRIBANO, J. P.; BIBB, M. J. Streptomyces coelicolor as an Expression Host for Heterologous Gene Clusters. **Methods in Enzymology**, v. 517, p. 279–300, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124046344000140>>. Acesso em: 26 out. 2018.

GREEN, W. J. **Polar Lakes and Rivers - Limnology of Arctic and Antarctic Aquatic Ecosystems**. New York: Cambridge University Press, 2009. v. 21

HAIRSTON, A. N. G. et al. Natural Selection for Grazer Resistance to Toxic Cyanobacteria : Evolution of Phenotypic Plasticity ? Published by : Society for the Study of Evolution Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2680352> NATURAL SELECTION FOR GRAZER RESISTANCE TO TOXIC CYANO. **Society**, v. 55, n. 11, p. 2203–2214, 2010.

HAMILTON, D. P.; SALMASO, N.; PAERL, H. W. Mitigating harmful cyanobacterial blooms : strategies for control of nitrogen and phosphorus loads. **Aquatic Ecology**, v. 50, n. 3, p. 351–366, 2016.

HAMMER, Ø. **Hammer, Ø., Harper, D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis Palaeontologia Electronica** , 1999.

HARKE, M. J. et al. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, v. 54, p. 4–20, 1 abr. 2016.

HASELKORN, R. Cyanobacteria. **Current biology : CB**, v. 19, n. 7, p. R277-8, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982209005533>>.

HITZFELD, B. C. et al. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Toxicon**, v. 38, p. 1731–1748, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010100001033%5Cnpapers://aff512a5-579d-44ca-9504-d5ff894b570f/Paper/p206>>.

HUA, X.-H. et al. Selective inhibition of the cyanobacterium, *Microcystis*, by a *Streptomyces* sp. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 10, p. 1531–5, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557309>>.

HUISMAN, J. et al. Cyanobacterial blooms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 471–483, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>>.

IMAMURA, N. et al. An Efficient Screening Approach for Anti-Microcystis Compounds Based on Knowledge of Aquatic Microbial Ecosystem. **The Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 7, p. 582–587, 25 jul. 2001. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/54.582?from=CrossRef>>. Acesso em: 21 out. 2018.

IVANOVA, J.; STOYANCHEVA, G.; POUNEVA, I. Lysis of Antarctic algal strains by bacterial pathogen. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 997–1005, 2014.

JANG, M. H. et al. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. **Freshwater Biology**, v. 48, n. 9, p. 1540–1550, 2003.

JEPPESEN, E. et al. Lake responses to reduced nutrient loading - an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. **Freshwater Biology**, v. 50, n. 10, p. 1747–1771, 1 out. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2427.2005.01415.x>>. Acesso em: 20 out. 2018.

JOCHIMSEN, E. M. et al. Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873–878, 26 mar. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516222>>. Acesso em: 20 out. 2018.

JORQUERA, M. A.; GRAETHER, S. P.; MARUYAMA, F. Editorial: Bioprospecting and biotechnology of extremophiles. In: **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. [s.l.] Frontiers Media S.A., 2019. 7p. 204.

JUNG, S. W. et al. *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 offers species-specific biological control of winter algal blooms caused by freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 186–195, jul. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2008.03733.x>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

JUNGBLUT, A. D. et al. Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 271–278, 1 mar. 2006.

JUNGBLUT, A. D. et al. Microcystins, BMAA and BMAA isomers in 100-year-old Antarctic cyanobacterial mats collected during Captain R.F. Scott's Discovery Expedition. **European Journal of Phycology**, v. 53, n. 2, p. 115–121, 3 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670262.2018.1442587>>. Acesso em: 9 jul. 2020.

JUNGBLUT, A. D.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial Mats of the Meltwater Ponds on the McMurdo Ice Shelf (Antarctica). Springer, Dordrecht, 2010. p. 499–514.

KAHRU, M.; ELMGREN, R. Multidecadal time series of satellite-detected accumulations of cyanobacteria in the Baltic Sea. **Biogeosciences**, v. 11, n. 13, p. 3619–3633, 4 jul. 2014. Disponível em: <<https://www.biogeosciences.net/11/3619/2014/>>. Acesso em: 19 out. 2018.

KANG, Y. H.; PARK, C. S.; HAN, M. S. *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 a useful bacterium capable of lysing *Microcystis aeruginosa* cells and degrading microcystins. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1517–1525, 29 fev. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-012-9812-6>>. Acesso em: 9 ago. 2020.

KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis** (B. Karlson, Ed.). Paris: UNESCO, 2010. . Disponível em: <<https://repository.oceanbestpractices.org/handle/11329/303>>. Acesso em: 22 jul. 2020.

KENEFICK, S. L. et al. Toxin Release from *Microcystis Aeruginosa* after Chemical Treatment. **Water Science and Technology**, v. 27, n. 3–4, p. 433–440, 1 fev. 1993.

Disponível em: <<https://iwaponline.com/wst/article/27/3-4/433-440/4821>>. Acesso em: 21 out. 2018.

KIM, Y. S.; SON, H. J.; JEONG, S. Y. Isolation of an algicide from a marine bacterium and its effects against the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and other harmful algal bloom species. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 511–517, 1 ago. 2015.

KLEINTEICH, J. et al. Potent toxins in Arctic environments - Presence of saxitoxins and an unusual microcystin variant in Arctic freshwater ecosystems. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 2, p. 423–431, 25 nov. 2013.

KLEINTEICH, J. et al. Diversity of toxin and non-toxin containing cyanobacterial mats of meltwater ponds on the Antarctic Peninsula: A pyrosequencing approach. **Antarctic Science**, v. 26, n. 5, p. 521–532, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0954102014000145>>. Acesso em: 14 out. 2020.

KODAMA, M.; DOUCETTE, G. J.; GREEN, D. H. Relationships Between Bacteria and Harmful Algae. In: GRANÉLI, E.; TURNER, J. (Ed.). **Ecology of Harmful Algae**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 243–255.

KORMAS, K. A.; LYMPEROPOULOU, D. S. Cyanobacterial Toxin Degrading Bacteria: Who Are They? **BioMed Research International**, v. 2013, p. 12, 2013. Disponível em: <<http://dx.>>.

LAWTON, L. A. et al. Novel bacterial strains for the removal of microcystins from drinking water. **Water Science and Technology**, v. 63, n. 6, p. 1137–1142, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21436548/>>. Acesso em: 12 ago. 2020.

LEE, Y. K. et al. Cyanobactericidal effect of *Rhodococcus* sp. isolated from eutrophic lake on *Microcystis* sp. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 11, p. 1673–1678, 18 jul. 2010. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-010-0350-5>>. Acesso em: 22 jul. 2020.

LEGRAND, C. et al. Allelopathy in phytoplankton - Biochemical, ecological and evolutionary aspects. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 406–419, 2003. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2216/i0031-8884-42-4-406.1>>. Acesso em: 8 jul. 2020.

LETICIA MORI. Por que São Paulo ainda não conseguiu despoluir o rio Tietê? - BBC News Brasil. **BBC News Brasil**, p. 1, 4 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-42204606>>. Acesso em: 20 out. 2018.

LÓPEZ MOREIRA M., G. et al. Eutrophication, Research and Management History of the Shallow Ypacaraí Lake (Paraguay). **Sustainability**, v. 10, n. 7, p. 2426, 11 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2071-1050/10/7/2426>>. Acesso em: 21 out. 2018.

LUO, J. et al. Isolation and Identification of Cyanocidal Compound from *Streptomyces* and Cyanocidal Mechanism to *Microcystis aeruginosa*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76444, 3 out. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076444>>. Acesso em: 26 out. 2018.

LÜRLING, M.; FAASSEN, E. J. Controlling toxic cyanobacteria: Effects of dredging and phosphorus-binding clay on cyanobacteria and microcystins. **Water Research**, v. 46, n. 5,

p. 1447–1459, 1 abr. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137447>>. Acesso em: 21 out. 2018.

LÜRLING, M.; MENG, D.; FAASSEN, E. J. Effects of hydrogen peroxide and ultrasound on biomass reduction and toxin release in the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*.

**Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3260–3280, 2014.

LUUC, R. M.; SKULBERG, M. O.; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. Ginebra: E & FN Spon, 1999. 1p. 400.

MACKINTOSH, C. et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letters**, v. 264, n. 2, p. 187–192, 21 maio 1990. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2890%2980245-E>>. Acesso em: 20 out. 2018.

MANAGE, P. M. et al. Isolation and Identification of Novel Microcystin-Degrading Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6924–6928, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

MANAGE, P. M.; EDWARDS, C.; LAWTON, L. A. Biodegradation of Microcystin-LR by Natural Bacterial Populations. In: OBAYASHI, Y. et al. (Ed.). **Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Environmental Research in Asia**. Tokyo: TERRAPUB, 2009. p. 277–285.

MANAGE, P. M.; KAWABATA, Z.; NAKANO, S. Ichi. Cyanocidal effect of the bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 22, n. 2, p. 111–117, 8 set. 2000.

MARGESIN, R. et al. (ed.). **Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

MASSEY, I. Y.; ZHANG, X.; YANG, F. Importance of bacterial biodegradation and detoxification processes of microcystins for environmental health. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 21, n. 6–8, p. 357–369, 17 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10937404.2018.1532701>>. Acesso em: 8 jul. 2020.

MATTHIJS, H. C. P. et al. Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1460–1472, 1 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112924>>. Acesso em: 21 out. 2018.

MATTHIJS, H. C. P. et al. Existing and emerging cyanocidal compounds: new perspectives for cyanobacterial bloom mitigation. **Aquatic Ecology**, v. 50, n. 3, p. 443–460, 16 set. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10452-016-9577-0>>. Acesso em: 21 out. 2018.

MERILUOTO, J. et al. **Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis**. Chichester: John Wiley & sons Ltd., 2017.

MEYBECK, M. et al. Water quality. In: BARTRAM, J.; BALLANCE, R. (Ed.). **Water quality monitoring: a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes**. 1. ed. London: E&FN Spon, 1996. p. 366.

MICHALAK, A. M. et al. Record-setting algal bloom in Lake Erie caused by agricultural and meteorological trends consistent with expected future conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 16, p. 6448–52, 16 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23576718>>. Acesso em: 19 out. 2018.

NAKAMURA, N. et al. A novel cyanobacteriolytic bacterium, *Bacillus cereus*, isolated from a Eutrophic Lake. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 95, n. 2, p. 179–84, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233388>>. Acesso em: 21 out. 2018.

NDLELA, L. L. et al. Bacteria as biological control agents of freshwater cyanobacteria: is it feasible beyond the laboratory? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 23, p. 9911–9923, 1 dez. 2018.

OZAKI, K. et al. Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds. **Chemosphere**, v. 71, n. 8, p. 1531–1538, abr. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18179811/>>. Acesso em: 8 dez. 2020.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 995–1010, 2013.

PANDEY, K. D. et al. Cyanobacteria in Antarctica: ecology, physiology and cold adaptation. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 50, n. 5, p. 575–84, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15559974>>. Acesso em: 22 out. 2018.

PARK, H. D. et al. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic microcystis species in a hypertrophie lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, n. 1, p. 61–72, 1998.

PARTE, A. C. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 23 jul. 2020.

PEARCE, D. A. et al. Significant changes in the bacterioplankton community structure of a maritime Antarctic freshwater lake following nutrient enrichment. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3237–3248, 1 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207907>>. Acesso em: 22 out. 2018.

PÉREZ, D. S.; SORACI, A. L.; TAPIA, M. O. Cianobacterias y cianotoxinas: rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. **Anal Acta Veterinaria**, v. 28, n. 7000, p. 48–56, 2008.

QIN, Q. L. et al. Comparative genomics reveals a deep-sea sediment-adapted life style of *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. **ISME Journal**, v. 5, n. 2, p. 274–284, fev. 2011.

QUESADA, A.; VINCENT, W. F. Cyanobacteria in the Cryosphere: Snow, Ice and Extreme Cold. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. (Ed.). **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 387–399.

RAMPELOTTO, P. H. **Biotechnology of extremophiles : advances and challenges**. Switzerland: Springer, 2016.

RASHIDAN, K. K.; BIRD, D. F. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 2, p. 97–105, [s.d.]Disponível em: <<https://link-springer-com.ez350.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s002480000074>>. Acesso em: 21 out. 2018.

REDDY, G. S. N. et al. Planococcus antarcticus and Planococcus psychrophilus spp. nov. isolated from cyanobacterial mat samples collected from ponds in Antarctica. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 6, n. 3, p. 253–61, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072961>>. Acesso em: 16 ago. 2020.

SAITO, T. et al. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, mlrA, from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 2, p. 271–276, 12 dez. 2003.

SCAR. **The Scientific Committee on Antarctic Research**. Disponível em: <<https://www.scar.org/>>. Acesso em: 11 jul. 2020.

SCHOPF, J. W. The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage. In: **The Ecology of Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 13–35.

SEAM. **Resolucion 222/2002**AsunciónSecretaría del Ambiente Paraguay, , 2002. . Disponível em: <[http://archivo.seam.gov.py/sites/default/files/resolucion\\_222\\_02.pdf](http://archivo.seam.gov.py/sites/default/files/resolucion_222_02.pdf)>.

Sette LD, Passarini MRZ, Delarmelina C, et al (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World J Microbiol Biotechnol** 22:1185–1195. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9160-2>

SHAO, J. et al. Interactions between cianocidal bacteria and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: Lytic characteristics and physiological responses in the cyanobacteria. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 469–476, 28 fev. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13762-013-0205-4>>. Acesso em: 14 out. 2020.

SHI, K. et al. Long-term MODIS observations of cyanobacterial dynamics in Lake Taihu: Responses to nutrient enrichment and meteorological factors. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40326, 11 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep40326>>. Acesso em: 19 out. 2018.

SHI, L. et al. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1581–1590, 1 jan. 2009.

SHILO, M. Formation and Mode of Action of Algal Toxins. **Bacteriological Reviews**, v. 31, n. 3, p. 180–193, 1967.



SHUNYU, S. et al. Lysis of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacterium) by a bacterium *Bacillus cereus*. **Biological Control**, v. 39, n. 3, p. 345–351, 1 dez. 2006.

SIGEE, D. C. et al. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. **Hydrobiologia**, v. 395/396, n. 0, p. 161–172, 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1017097502124>>. Acesso em: 21 out. 2018.

SILVA, T. R. et al. Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. **Polar Biology**, v. 41, n. 7, p. 1521, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00300-018-2300-y>>.

SINGH, S. M.; ELSTER, J. Cyanobacteria in Antarctic Lake Environments. Springer, Dordrecht, 2007. p. 303–320.

SIVONEN, K.; JONES, G. Algae and cyanobacteria in fresh water. In: **Guidelines for safe recreational water environments Volume 1: Coastal and fresh waters**. [s.l.: s.n.]1p. 136–58.

SOMMER, U. et al. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. 1986.

STP. **Presentaron primer Plan Nacional de Agua y Saneamiento**. Disponível em: <<http://www.stp.gov.py/v1/presentaron-primer-plan-nacional-de-agua-y-saneamiento/>>. Acesso em: 17 out. 2018.

TANG2, E. P. Y.; TREMBLAY, R.; VINCENT, W. F. Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: are high-latitude mat-formers adapted to low temperature? **J. Phycol**, v. 33, p. 171–181, 1997.

TEXEIRA, M. da G. L. C. et al. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. 1993. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/26993>>. Acesso em: 20 out. 2018.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.-Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, n. 2, p. 197–213, 1 ago. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x>>. Acesso em: 13 out. 2020.

UCHIDA, H. et al. A Coupled Assay System for the Lysis of Cyanobacteria. **Japanese Journal of Water Treatment Biology**, v. 34, n. 1, p. 67–75, 1998.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Policies and Guidelines Highlights What is the regulatory status of HABs in the US**. Ccl. Disponível em: <<https://www.epa.gov/nutrient-policy-data/guidelines-and-recommendations>>. Acesso em: 17 out. 2018.

VAN WICHELEN, J. et al. The common bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* is prone to a wide array of microbial antagonists. **Harmful Algae**, v. 55, p. 97–111, 1 maio 2016. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez350.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1568988315301682?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 out. 2018.

VARIN, T. et al. Metagenomic analysis of stress genes in microbial mat communities from Antarctica and the high Arctic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 549–559, 15 jan. 2012. Disponível em: <<http://metagenomics.nmpdr.org/>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655–671, 1 dez. 2000. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC99008/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC99008/?report=abstract)>. Acesso em: 26 ago. 2020.

VIDAL, F. et al. Recreational Exposure during Algal Bloom in Carrasco Beach, Uruguay: A Liver Failure Case Report. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 267, 31 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/9/9/267>>. Acesso em: 20 out. 2018.

VINCENT, W. F.; QUESADA, A. Cyanobacteria in high latitude lakes, rivers and seas. In: **Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**. [s.l.] Springer Netherlands, 2012. 9789400738553p. 371–385.

WANG, J. et al. Microcystin-LR degradation and gene regulation of microcystin-degrading *Novosphingobium* sp. THN1 at different carbon concentrations. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6691742/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC6691742/?report=abstract)>. Acesso em: 24 set. 2020.

WATSON, S. B.; RIDAL, J.; BOYER, G. L. Taste and odour and cyanobacterial toxins: impairment, prediction, and management in the Great Lakes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 65, n. 8, p. 1779–1796, 2008. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/F08-084>>.

WELLS, M. L. et al. Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. **Harmful Algae**, v. 49, p. 68–93, 1 nov. 2015.

WHITE, P. L.; WYNN-WILLIAMS, D. D.; RUSSELL, N. J. Diversity of thermal responses of lipid composition in the membranes of the dominant culturable members of an Antarctic fellfield soil bacterial community. **Antarctic Science**, v. 12, n. 03, p. 386–393, 6 set. 2000. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0954102000000432](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0954102000000432)>. Acesso em: 26 out. 2018.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **Introduction to the Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

WHO. **Guidelines for Drinking-Water Quality: Fourth Edition Incorporating the First Addendum**. [s.l.] World Health Organization, 2017.

WOLFE, G. V. The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: Constraints, mechanisms, and impacts. **Biological Bulletin**, v. 198, n. 2, p. 225–244, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10786943/>>. Acesso em: 8 jul. 2020.

WOOD, S. A. et al. Widespread distribution and identification of eight novel microcystins in antarctic cyanobacterial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7243–7251, 1 dez. 2008. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>. Acesso em: 9 jul. 2020.

WU, X.; JOYCE, E. M.; MASON, T. J. The effects of ultrasound on cyanobacteria. **Harmful Algae**, v. 10, n. 6, p. 738–743, 1 set. 2011. Disponível em: <<https://www->

sciencedirect.ez350.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1568988311000710?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2018.

WU, Y. et al. Allelopathic control of cyanobacterial blooms by periphyton biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 604–615, mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21054736/>>. Acesso em: 8 dez. 2020.

ZAFFIRO, A.; ROSENBLUM, L.; WENDELKEN, S. **Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay** United States Environmental Protection Agency, , 2016. . Disponível em: <<https://www.epa.gov/dwanalyticalmethods/method-546-determination-total-microcystins-and-nodularins-drinking-water-and>>. Acesso em: 8 ago. 2020.

ZAKHIA, F. et al. Cyanobacteria in cold ecosystems. **Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology**, p. 121–135, 2008.

ZHANG, M. L.; YAN, H.; PAN, G. Microbial degradation of microcystin-LR by *Ralstonia solanacearum*. **Environmental Technology**, v. 32, n. 15, p. 1779–1787, 1 nov. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22439565/>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

ZHANG, M.; PAN, G.; YAN, H. Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis* sp. USTB-05. **Journal of Environmental Sciences**, n. 2, p. 168–175, 2010. **and cyanotoxin analysis**. Chinchester: John Wiley & sons Ltd., 2017.

## ANEXOS

Anexo I. Cepas utilizadas en el estudios con datos de lugares de colecta y tipo de muestra de aislamiento.

Cepa	Identificación (16S rRNA)	Local	Datos de localización GPS	Fuente
34		Deception Island	S 62°58'788" W 60°33'464"	
39	UN	Punta Hannah Livingston Island	S 62°39'149" W 60°38'230"	
47	<i>Arthrobacter</i> sp.			
49	<i>Arthrobacter</i> sp.	Deception Island	S 62°58'788" W 60°33'464"	
53	UN			
58	<i>Microbacterium testaceum</i>			
59				
62	UN	Punta Hannah Livingston Island	S 62°39'149" W 60°38'230"	
63				
66				
69	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	King George Island	S 62°05'948" W 58°23'622"	
71	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.			Sedimento marino
72				
73	UN			
74		Martel Bay, King George Island	S 62°08'862" W 58°29'267"	
75				
76	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.			
77	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.			
95	<i>Marinobacterium rhizophilum</i>			
96	<i>Planococcus</i> sp.	Deception Island	S 62°58'788" W 60°33'464"	
99	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Martel Bay, King George Island	S 62°08'862" W 58°29'267"	
103	<i>Sulfitobacter litoralis</i>			
104	<i>Sulfitobacter donghicola</i>	King George Island	S 62°05'948" W 58°23'622"	
110	<i>Arthrobacter</i> sp.			
111	UN			
112	<i>Arthrobacter</i> sp.	Half Moon Island	S 62°35'511" W 59°54'095"	Biopelícula de suelo
114	UN			

115	<i>Sulfitobacter litoralis</i>			
122	<i>Paenibacillus lautus</i>	King George Island	S 62°05'948" W 58°23'622"	
128	Unaffiliated Alphaproteobacteria			
129	<i>Roseovarius halocynthiae</i>			
132	<i>Flavobacterium</i> sp	Punta Hannah Livingston Island	S 62°39'149" W 60°38'230"	
165	<i>Flavobacterium</i> sp.			
200				
207	UN	Deception Island	S 62°58'788" W 60°33'464"	Sedimento marino
209				
221	<i>Arthrobacter</i> sp.			
222	<i>Microbacterium testaceum</i>	Punta Hannah Livingston Island	S 62°39'149" W 60°38'230"	
223	UN			
231	<i>Sulfitobacter litoralis</i>	Martel Bay, King George Island	S 62°08'862" W 58°29'267"	
237	UN	Deception Island	S 62°58'788" W 60°33'464"	
254	<i>Leifsonia antarctica</i>	King George Island—Punta Turret	S 62°05'092" W 57°56'763"	Suelo saturado de agua 4 °C
268	<i>Leifsonia antarctica</i>			
355	<i>Arthrobacter</i> sp.			
356	<i>Arthrobacter</i> sp.	Half Moon Island	S 62°35'511" W 59°54'095"	Biopelícula de suelo
357				
359	UN			
366	<i>Arthrobacter</i> sp.	King George Island—Punta Turret	S 62°05'092" W 57°56'763"	Suelo saturado de agua 4 °C
381		Punta Hannah—Livingston island	S 62°39'149" W 60°38'230"	Invertebrado marino
383	UN			
386		King George Island—Punta Turret	S 62°05'092" W 57°56'763"	Suelo saturado de agua 4 °C
408	<i>Arthrobacter</i> sp.			
409	<i>Psychrobacter</i> sp.	Punta Hannah—Livingston island	S 62°39'149" W 60°38'230"	Invertebrado marino
411	UN			
417	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	Punta Hannah—Livingston Island	S 62°39'149" W 60°38'230"	E esponja marina
419				
421	UN	King George Island—Punta Turret	S 62°05'092" W 57°56'763"	Suelo saturado de agua 4 °C
422	<i>Psychrobacter</i> sp.			

423	<i>Arthrobacter</i> sp.			
424	<i>Arthrobacter</i> sp.			
425	<i>Cellulophaga fucicola</i>			
426	<i>Rhodococcus</i> sp.			Suelo saturado de agua 1.6 °C
427	<i>Carnobacterium</i> sp.			
428	UN			
442	<i>Sporosarcina aquimarina</i>			Suelo saturado de agua 4 °C
443	<i>Arthrobacter</i> sp.			
445	<i>Psychrobacter</i> sp.			
450	<i>Arthrobacter</i> sp.	Punta Hannah—Livingston island	S 62°39'149" W 60°38'230"	Invertebrado marino
452	UN			
458	<i>Curtobacterium</i> sp.	Punta Hannah—Livingston Island	S 62°39'149"W 60°38'230"	Esponja marina
28R-4	UN			
ES1-20				
ES2-3	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Half Moon Island	S 62°35'511" W 59°54'095"	Estrella marina
ES7	UN			
ES8	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.			
ESH2-38	<i>Psychromonas arctica</i>			

---

UN No identificado

Adaptada de SILVA et al. (2018)