

APLICACIÓN DE TÉCNICAS CLÁSICAS DE MICROSCOPIA Y BASADAS EN ADN PARA EL ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES DE MICROORGANISMOS Y CIANOBACTERIAS DEL SEDIMENTO EN EL EMBALSE RINCÓN DEL BONETE- URUGUAY

María Teresa Federici¹, Natalia Rigamonti², Pablo Rovira¹, Pablo Torres¹, Sofía Martínez¹, Graciela Ferrari², Claudia Simón¹, Luis Aubriot³, Verónica Ciganda¹ ¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria- INIA, Uruguay mfederici@inia.org.uy ² Laboratorio Tecnológico del Uruguay- LATU, Uruguay ³ Universidad de la República- Uruguay

Keywords: cianobacterias, qPCR, ARNr

Introducción. Las cianobacterias pueden producir cianotoxinas altamente tóxicas para la salud humana y animal. Si bien éstas se asocian al período estival, en Uruguay en los últimos años se han registrado durante todo el año, especialmente en los cuerpos de agua lénticos como lagunas, tajamares y embalses (Bonilla y col., 2021). Muchas especies pueden mantenerse en colonias o formas de resistencia asociadas al sedimento (Chorus, 2021).

El objetivo de este trabajo fue el estudio de las poblaciones de cianobacterias y microorganismos asociados al sedimento utilizando 3 metodologías distintas: microscopía óptica, secuenciación del gen 16S ARNr, y qPCR

Métodos. Se tomaron muestras de sedimento en 4 sitios del embalse próximos a distintos usos de suelo predominante: forestal, agrícola y ganadero (campo natural), y un monte nativo. Se extrajo ADN (kit DNAeasy PowerSoil- Qiagen) a partir de dichas muestras, y se realizó la secuenciación del gen 16S ARNr en la empresa MacroGen, Inc. (República de Corea). Por otro lado, se utilizó qPCR para detectar los genes 16S ARNr, *mycE/ndaF* (microcistinas), saxitoxinas (*sxtA*) y cilindrospermopsina (*cyrA*), utilizando el kit *CyanoDTECT* (Phytoxigene), así como microscopía óptica para el recuento de células e identificación taxonómica de cianobacterias.

Resultados y discusión.

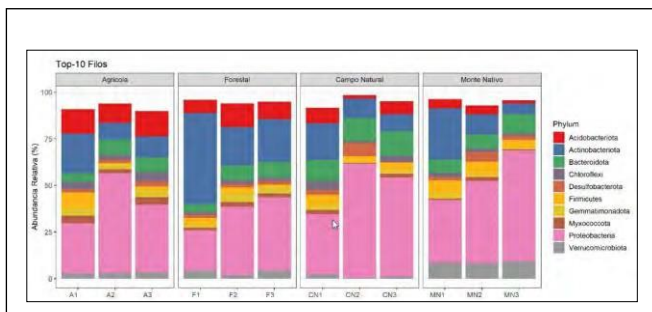


Fig. 1 Composición relativa de los 10 filos más abundantes en el sedimento de los sitios: A: Agrícola, CN: Campo natural, F: Forestal, MN: monte nativo

Los filos predominantes en todas las muestras fueron Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota y Bacteroidetes. El filo Cyanobacteria tuvo una baja representación (1,4%): 0,51, 0,39, 1,31 y 1,75% de los microbiomas del sitio agrícola, campo natural, sitio

forestal y monte nativo, respectivamente.

| | Campo natural | Monte nativo | Forestal | Agrícola |
|------------------------------------|---------------|--------------|----------|----------|
| Microscopía óptica (cel/ml) | | | | |
| Cianobacterias: especies | | | | |
| <i>Kormvophoron crassum</i> | | 105,00 | | 231,00 |
| <i>Phormidium ornatum</i> | | | 689 | 74,00 |
| <i>Planktolyngbya limnetica</i> | | 4449,00 | 23,00 | |
| <i>leptolyngbya cf vaderiana</i> | | | 712,00 | 305,00 |
| Densidad total en 250g | 0,00 | 4554,00 | 712,00 | 305,00 |
| Densidad total en gramos | 0,0 | 18,2 | 2,8 | 1,2 |
| qPCR - gen 16S ARNr (n°copias/gr.) | 6,39E+05 | 6,43E+06 | 6,77+E06 | 8,07+E06 |

Fig. 2 Derecha: abundancia relativa del filo Cyanobacteria por sitio de muestreo A: agrícola; CN: sitio campo natural; F: Forestal, MN: monte nativo. Izquierda: resultados de microscopía óptica y de qPCR (gen 16S ARNr).

La abundancia relativa de las cianobacterias fue mayor en los sitios próximos al uso forestal y monte nativo, que en el sitio agrícola y campo natural. A través de microscopía óptica se lograron identificar distintas especies en todas las muestras menos en las de campo natural, sin embargo, se logró detectar cianobacterias totales mediante la amplificación del gen 16S ARNr en todos los sitios. Asimismo, se amplificaron los genes de *sxtA* y *cyrA*, indicando la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas, o la persistencia de ADN en el sedimento de algunos sitios.

Conclusiones. A través de la secuenciación del gen 16S ARNr se observaron diferencias en la diversidad y composición del microbioma del sedimento en el embalse, en enero de 2021, encontrándose una baja representación de las cianobacterias en todos los sitios de muestreo. La técnica qPCR fue efectiva para la detección de cianobacterias totales, recomendándose como *screening* primario, de forma complementaria a la identificación taxonómica mediante microscopía óptica, o secuenciación del gen 16S ARNr, técnica más sensible e informativa.

Agradecimientos. A los Institutos INIA y LATU con sus respectivas autoridades por la cofinanciación del Proyecto: “Desarrollo y Aplicación de nuevas herramientas moleculares y espectrales para el estudio de las comunidades de cianobacterias en aguas continentales: estudio de caso Embalse Rincón del Bonete”, proyecto marco del trabajo aquí presentado.

Referencias.

- Bonilla, S. (2021). Toxic cyanobacterial blooms compromise the use of the Río Negro water. *INNOTECH N°22* (e577):1-27
- Chorus, I. & Welker, M. (2021). Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. *CRC Press. WHO Sec. Ed.*