



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Ambientales
Programa de Magíster en Ciencias Ambientales

Título

**“Presencia de cianotoxinas del tipo Microcistinas y
Nodularinas, en lagos del Centro-Sur de Chile”**



Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Ambientales

Johanna Elizeth Beltrán Concha

CONCEPCIÓN-CHILE
2026



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Ambientales
Programa de Magíster en Ciencias Ambientales

**“Presencia de cianotoxinas del tipo Microcistinas y
Nodularinas, en lagos del Centro-Sur de Chile”**

Tesis para optar al grado de

Magíster en Ciencias Ambientales



Johanna Elizeth Beltrán Concha

Profesor Guía: Dr. Roberto Urrutia

Profesor Co-Guía: Dr. Alberto Araneda

Dpto. de Sistemas acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales

Universidad de Concepción

CONCEPCIÓN-CHILE

2026

© 2026 Johanna Elizeth Beltrán Concha

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento. La tesis de Magister titulada “Presencia de cianotoxinas del tipo Microcistinas y Nodularinas, en lagos del Centro-Sur de Chile” de la Srta. Johanna Elizeth Beltrán Concha realizada en la Facultad de Ciencias ambientales de la Universidad de Concepción ha sido aprobada por la siguiente Comisión Evaluadora:

Dr. Roberto Urrutia

Profesor guía

Facultad de Ciencias Ambientales,
Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile
de la Universidad de Concepción

Dr. Alberto Araneda

Profesor guía

Departamento de Sistemas acuáticos
Facultad de Ciencias Ambientales
de la Universidad de Concepción



Dra. Allisson Astuya

Miembro de la comisión evaluadora

Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
de la Universidad de Concepción

Dr. Ricardo Barra

Miembro de la comisión evaluadora

Departamento de Sistemas Acuáticos
Facultad de Ciencias Ambientales
de la Universidad de Concepción

Dra. Lien Rodríguez

Evaluador externo

Facultad de Ingeniería
de la Universidad San Sebastián

Dr. Alberto Araneda

Director del programa

Facultad de Ciencias Ambientales,

Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile

de la Universidad de Concepción



Agradecimientos

A mi familia.

Se agradece el financiamiento otorgado por:

Proyecto ANID/FONDAP/1523A0001





INDICE GENERAL

Agradecimientos	5
Índice de tablas	9
Índice de figuras	9
Resumen	1
Introducción.....	3
1.1 Factores que afectan la producción de cianobacterias	5
1.1.1 Disponibilidad de Nutrientes (Fósforo y Nitrógeno)	5
1.1.2 Temperatura	6
1.1.3 Hidrología, estratificación y Luz	6
1.1.4 Factores químicos	7
1.2 Cianotoxinas	8
1.3 Vías de exposición a cianotoxinas y normativa internacional	10
1.4 Métodos para la determinación de cianotoxinas	15
1.4.1 Bioensayos	15
1.4.2 Métodos bioquímicos	16
1.4.3 Métodos cromatográficos	16
1.4.4 Métodos moleculares	17
1.4.5 Métodos para análisis <i>in situ</i>	17
1.5 Cepas productoras y no productoras	18
1.6 Presencia de cianobacterias y cianotoxinas en Chile.....	19
2. Preguntas de investigación	21
3. Hipótesis	22
4. Objetivo general	23
5. Objetivos específicos	23

6. Metodología.....	24
7. Bibliografía.....	29
Capítulo I.....	36
Abstract.....	37
1. Introduction.....	38
2. Materials and Methods.....	40
2.1. Collection of Water Samples	40
2.2. Sample Collection and the Analysis of Cyanobacteria	43
2.3. Cyanotoxin Analysis	43
2.4. Data Analysis	44
3. Results.....	45
4. Discussion.....	54
5. Conclusions.....	58
6. References.....	59
7. Conclusión general	68



Índice de tablas

Tabla 1. Límites de exposición WHO,2020.	11
Tabla 2. Límites de exposición fijados por distintos países. Villalobos et al.,2025.....	12
Tabla 3. Condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de cianotoxinas por HPLC DAD.	27

Índice de figuras

Figura 1. Cromatograma obtenido de la inyección de los estándares puros de 2mg/l de MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA y Nodularina	28
Figura 2. Contrastación de espectros de estándares puros de MC-RR, MC-LR y MC-YR frente a muestra positiva de Laguna Grande de San Pedro para las mismas variantes de MC.	29





Resumen

Las floraciones de cianobacterias y la potencial generación de cianotoxinas representan un riesgo tanto para la salud humana como para los ecosistemas acuáticos. La presencia de estas proliferaciones algales nocivas (HABs) ha sido documentada en diversas fuentes de agua dulce en Chile durante la última década; sin embargo, existe menor información científica respecto a la generación de cianotoxinas. Este estudio evaluó la presencia de microcistinas y nodularina en siete cuerpos de agua mesotróficos y eutróficos del centro de Chile (tres sistemas lacustres urbanos: Avendaño, Lo Galindo y Laguna Grande de San Pedro; tres sistemas periurbanos: Llanhue, Vichuquén y Torca; y el estero Llico), mediante un programa de monitoreo realizado entre octubre de 2022 y abril de 2023. En cada campaña de muestreo se midieron parámetros físicoquímicos in situ, incluyendo pH, conductividad eléctrica y temperatura del agua, mientras que las concentraciones de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) se determinaron a partir de muestras recolectadas. Las microcistinas y la nodularina fueron analizadas mediante HPLC-DAD para cinco variantes (MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA y nodularina). Se detectaron cianotoxinas en todos los cuerpos de agua estudiados, excepto en la laguna Avendaño. La variante MC-LR fue la más frecuente. Las concentraciones más altas de microcistinas se registraron en otoño de 2023 en la Laguna Grande de San Pedro (407.5 µg/L de microcistinas totales), mientras que la nodularina se detectó en bajas concentraciones y exclusivamente en sistemas con alta conductividad. La ocurrencia de cianotoxinas mostró una débil correspondencia con la abundancia de cianobacterias, pero se asoció a bajas relaciones N:P en la mayoría de las detecciones positivas. Cabe destacar que la presencia de altas concentraciones

de toxinas en sistemas mesotróficos cuestiona la suposición convencional de que el riesgo por cianotoxinas está determinado únicamente por condiciones eutróficas. Estos resultados confirman la presencia de cepas productoras de cianotoxinas en los cuerpos de agua estudiados y destacan la necesidad de integrar la dinámica de nutrientes, la estructura de la comunidad de cianobacterias y el análisis multicongénere de toxinas en los programas de monitoreo. Asimismo, evidencian que los sistemas mesotróficos pueden constituir fuentes emergentes de producción de cianotoxinas, lo que subraya la necesidad de fortalecer las estrategias de evaluación y gestión del riesgo.

Palabras clave: cianobacterias; estado trófico; floraciones algales; microcistinas; nodularina.



1. Introducción

Originadas en el periodo precámbrico las cianobacterias son uno de los grupos de microorganismos más antiguos del planeta y se les reconoce como originadoras de la atmósfera oxidante que hoy conocemos. Las cianobacterias son un grupo muy flexible en su capacidad adaptativa a una gran variedad de ambientes diferentes, soportando temperaturas tan bajas como las del ártico, así como también temperaturas mucho más altas en manantiales calientes y alcalinos, esta es una característica muy importante para su supervivencia y las hace parte de la familia de los organismos termófilos (Pescheck, 2011). Este grupo es único en cuanto a su fisiología, tolerancia a condiciones extremas, flexibilidad adaptativa y plasticidad morfológica y ecológica. El crecimiento masivo de estas cianobacterias o microalgas, conocidas como floraciones algales nocivas (FAN) producen toxinas potencialmente dañinas y su frecuencia e intensidad se ven fuertemente influenciadas, por el aumento en las concentraciones de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, así como también la temperatura (Dolman et al., 2012) Huang et al., 2021) (Beaulieu, 2013). Todas estas variables pueden verse agudizadas debido a las condiciones generadas por el cambio climático, siendo así, el calentamiento global un potente catalizador para la expansión de estas floraciones (Huang et al., 2021).

Cada especie de cianobacterias presente en el hábitat acuático es capaz de producir potentes toxinas, sin embargo, dentro de la misma especie, pueden existir cepas productoras y no productoras. Tres grupos de sustancias tóxicas pueden encontrarse en distintas floraciones de cianobacterias: lipopolisacáridos, alcaloides y péptidos cíclicos. Los lipopolisacáridos son constituyentes de la pared celular de bacterias Gram negativas, y son por lo tanto comunes a todas

las cianobacterias. En cuanto a los alcaloides estos son metabolitos secundarios producidos solo por algunas cianobacterias y se caracterizan por generar actividad neurotóxica, por otro lado, los péptidos cíclicos, que incluyen las Microcistinas (heptapéptidos) y Nodularinas (pentapéptidos) son también metabolitos secundarios, pero fundamentalmente hepatotóxicos (Chorus, 1999).

La evidencia científica disponible indica que estas toxinas producidas por cianobacterias han sido la causa de casos de intoxicación por agua tanto en animales como en humanos. Una revisión bibliográfica de los casos reportados a nivel mundial entre 1800 y 2001, publicada por Wood en el 2016, indica que dos tercios de las intoxicaciones documentadas han ocurrido en Europa y estados unidos, siendo perros y ganado los que generan la mayoría de las intoxicaciones animales por cianotoxinas. En estados unidos 18 estados se adhirieron al Sistema de Floraciones de Algas Nocivas "Una Salud" y entre 2016 y 2018 registraron 389 enfermedades humanas y al menos 413 enfermedades animales atribuibles a eventos de floración de algas nocivas, (Roberts et al., 2020). En el caso de humanos, al menos la mitad de los casos presentados por Roslyn Wood ,2016 están asociados a actividades recreacionales, sin embargo, uno de los más lamentables conocidos a nivel mundial es el ocurrido en un centro diálisis en la ciudad de Caruaru, Brasil, donde fueron atribuidas 52 muertes a la exposición intravenosa de Microcistinas y Cilindrospermopsinas a través del agua de diálisis contaminada. (Carmichael et al., 2001). Específicamente respecto a Microcistinas y Nodularinas se suma también la preocupación debido a evidencia científica que ha demostrado que pueden actuar como promotores tumorales, esto debido a la inhibición de

enzimas clave en la regulación celular (Fujiki & Suganuma, 2011; Nishiwaki-Matsushima et al., 1992; Ohta et al., 1994).

1.1 Factores que afectan la producción de cianobacterias

1.1.1 Disponibilidad de Nutrientes (Fósforo y Nitrógeno)

La eutrofización, caracterizada por altas concentraciones de fósforo (P) y nitrógeno (N), es el predictor más fuerte de la abundancia cianobacteriana (Pham et al., 2017), (Rigosi et al., 2014). En el estudio de Pham et al., 2017 en el reservorio tropical Dau Tieng, se indica que el fósforo total (PT) controla de manera directa tanto la biomasa como las concentraciones de microcistinas. Se han identificado valores superiores a 0.10 mg/L o 0.125 mg/L como valores críticos de (PT), que desencadenan aumentos drásticos en la fluorescencia de la ficocianina y la dominancia de géneros como *Microcystis* (Zhang et al., 2020, Kuo et al., 2018).

El nitrógeno también desempeña un papel crucial, especialmente en la relación NT: PT. Relaciones bajas de NT:PT suelen favorecer a las cianobacterias frente a otros grupos de algas (Kuo et al., 2018). Además, la limitación de nitrógeno puede dar ventaja competitiva a géneros fijadores de nitrógeno como *Dolichospermum* y *Anabaena*, especialmente cuando el fósforo es abundante (>0.03 mg/L) (Jansen, 2023).

1.1.2 Temperatura

La temperatura es un motor dominante que interactúa con los nutrientes para potenciar las floraciones. Las cianobacterias suelen tener temperaturas óptimas de crecimiento más altas que otras algas, situándose frecuentemente entre los 25 °C y 35 °C (Visser et al., 2016, Park et al., 2022). Un estudio realizado por Zhang et al. en 2020, demuestra, por ejemplo, la dominancia marcada de *Microcystis* sobre *Dolichospermum* cuando se supera el umbral de 17 °C en lago Chaohu, China. Existen también otros taxones como *Radiocystis fernandoi*, especie morfológicamente muy similar a *Microcystis aeruginosa* y también productora de microcistinas, que se ha demostrado incrementa significativamente su tasa de crecimiento al superar los 25 °C (Jacinavicius et al., 2016). Sin embargo, existen estudios con opiniones disímiles en este aspecto, uno de ellos es el trabajo de Bonilla et al. (2023), el cual se basa en la revisión de 464 lagos que abarcan una superficie norte-sur de 14.000 km en las Américas. Los datos obtenidos en este estudio relacionan débilmente la temperatura con la biomasa de cianobacterias, desplazando a la temperatura y al calentamiento global como un factor predominante en la generación de cianobacterias potencialmente tóxicas.

1.1.3 Hidrología, estratificación y Luz

Las condiciones físicas del cuerpo de agua son determinantes. Una columna de agua estable y estratificada favorece a las cianobacterias que poseen mecanismos de regulación de flotabilidad, permitiéndoles posicionarse óptimamente en el gradiente de luz y nutrientes (Rigosi et al., 2014 y Jansen 2023). La transparencia del agua (Secchi) se correlaciona negativamente con la

abundancia de cianobacterias, indicando que el sombreado propio de las floraciones puede limitar a otros competidores fotosintéticos (Kuo et al., 2018). Por otro lado, la frecuencia de riego y el contenido hídrico del suelo son factores positivos clave para el desarrollo de costras biológicas dominadas por cianobacterias en sistemas terrestres (Bu et al., 2014).

1.1.4 Factores químicos

La química del agua modula el entorno en el que las cianobacterias compiten y producen toxinas.

Las cianobacterias muestran una especial tolerancia y preferencia por condiciones alcalinas. Muchas especies prosperan en rangos de pH entre 7 y 9, y algunas incluso toleran niveles de pH de hasta 11 (Park et al., 2022, Abbasi et al., 2019). Además, se ha observado que el aumento del pH puede estar vinculado a una menor competencia por fósforo y a mecanismos internos de almacenamiento de nutrientes (Okechukwu y Onyema, 2013)

El aumento de las concentraciones de CO₂ atmosférico y disuelto puede estimular las floraciones nocivas, especialmente de especies fijadoras de nitrógeno, cuya actividad se ve potenciada bajo condiciones de mayor temperatura y alto CO₂ (Visser et al., 2016). Sin embargo, bajo condiciones de alcalinidad extrema, la disponibilidad de CO₂ puede volverse una limitante para la actividad fotosintética si no existen mecanismos eficientes de concentración de carbono (Park et al., 2022).

La presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), influye en la selección de cepas. Se ha demostrado que concentraciones crecientes de radicales de oxígeno favorecen a las cepas tóxicas de *Microcystis* sobre las no tóxicas, sugiriendo que las microcistinas podrían desempeñar un papel protector contra el estrés oxidativo a altas temperaturas (Dziallas and Grossart, 2011, Zhang et al., 2020).

1.2 Cianotoxinas

Las cianotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por diversas especies de cianobacterias durante proliferaciones algales nocivas (Harmful Algal Blooms, HABs).

Desde un punto de vista toxicológico, las cianotoxinas se clasifican en función de su órgano diana y mecanismo de acción en hepatotoxinas, citotoxinas y neurotoxinas. Entre las más relevantes se encuentran las microcistinas (MC), la cilindrospermopsina (CYN), la nodularina (NOD) y las anatoxinas (ATX), las cuales han sido ampliamente estudiadas debido a su frecuencia de ocurrencia y efectos adversos en humanos y animales (WHO,2020).

Las microcistinas constituyen el grupo más común y estudiado de cianotoxinas. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición potente y selectiva de las proteínas fosfatasas serina/treonina PP1 y PP2A, lo que conduce a una alteración en la regulación de la fosforilación celular. Esta disrupción provoca la desorganización del citoesqueleto, estrés oxidativo y la inducción de apoptosis y necrosis celular. El hígado es el principal órgano diana, debido a la captación activa de estas toxinas por transportadores específicos de hepatocitos. Clínicamente, la exposición aguda a microcistinas puede causar daño hepático

severo, incluyendo hemorragia intrahepática e insuficiencia hepática, mientras que la exposición crónica se ha asociado con inflamación hepática, fibrosis y promoción tumoral, sugiriendo un posible rol en procesos carcinogénicos (Machado et al., 2016).

La cilindrospermopsina presenta un mecanismo de acción más complejo y menos dilucidado. Se ha demostrado que inhibe la síntesis proteica a nivel ribosomal, además de inducir estrés oxidativo y requerir bioactivación metabólica hepática para ejercer plenamente su toxicidad. A diferencia de las microcistinas, exhibe un perfil de toxicidad sistémico, afectando múltiples órganos, incluyendo hígado, riñones y sistema hematológico. En humanos, la exposición se ha asociado con daño hepático, nefrotoxicidad y alteraciones hematológicas (WHO, 2020).

La nodularina comparte similitudes estructurales y funcionales con las microcistinas, incluyendo la inhibición de proteínas fosfatasas PP1 y PP2A. En consecuencia, su mecanismo de acción también implica la disrupción del citoesqueleto y la inducción de daño celular en hepatocitos. Sus efectos incluyen hepatotoxicidad aguda, proliferación celular y promoción tumoral, aunque la evidencia disponible es más limitada en comparación con microcistinas y los resultados no son concluyentes (Machado et al., 2016).

Finalmente, las anatoxinas, particularmente la anatoxina-a y sus análogos, son neurotoxinas de acción rápida que actúan como agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina en la unión neuromuscular. Esto genera una despolarización sostenida que deriva en bloqueo neuromuscular funcional,

manifestado, debilidad progresiva y, en casos severos, parálisis respiratoria y muerte por asfixia (WHO, 2020).

1.3 Vías de exposición a cianotoxinas y normativa internacional

Existe una diversidad de vías de exposición a Cianotoxinas, estas incluyen la ingesta directa de agua contaminada, el contacto durante actividades recreacionales como, natación y deportes acuáticos, la inhalación de aerosoles y la ingesta de alimentos contaminados (Chorus & Bartram, 1999; Backer et al., 2010). La multiplicidad de estas rutas implica desafíos importantes en la evaluación del riesgo y en la definición de estándares regulatorios.

En el contexto recreacional, las principales vías de exposición corresponden a la ingestión accidental de agua y al contacto dérmico. La evidencia indica que la ingesta involuntaria constituye la vía predominante y, en consecuencia, la base de la mayoría de los criterios normativos. Por ejemplo, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA, 2019) establece valores guía para microcistinas en aguas recreacionales basados en escenarios de exposición incidental. Respecto de la exposición dérmica sigue siendo un aspecto menos considerado, esto en base al hecho de que el tamaño de estas moléculas dificulta el ingreso a través de la vía dérmica (Butler et al., 2012; Nielsen & Jiang, 2020), sin embargo, estudios recientes sugieren que no puede descartarse completamente, especialmente bajo condiciones que comprometen la integridad de la piel (Nielsen & Jiang, 2020).

Adicionalmente, la exposición a cianotoxinas a través de la cadena alimentaria ha sido ampliamente documentada. La bioacumulación en organismos acuáticos y la transferencia a cultivos irrigados con aguas contaminadas

constituyen vías indirectas relevantes, con potencial impacto en la salud humana (Corbel et al., 2014; Weralupitiya et al., 2022).

En términos regulatorios, la Organización Mundial de la Salud ha establecido valores guía para cianotoxinas en agua potable, los cuales fueron actualizados en su versión más reciente de las guías WHO, 2020 para aguas potables y WHO 2023 para aguas recreacionales (Tabla 1). Estos valores se basan principalmente en evaluaciones toxicológicas de exposición crónica, considerando la microcistina-LR como el compuesto de referencia. Sin embargo, existe una creciente tendencia a incluir otras cianotoxinas y escenarios de exposición, particularmente en aguas recreacionales. Esta tendencia ha llevado a que algunos países incluyan también en sus normativas nacionales límites de exposición tanto para aguas potables como para aguas recreacionales (Tabla 2) siguiendo la tendencia de los límites establecidos por la Organización Mundial de la Salud.

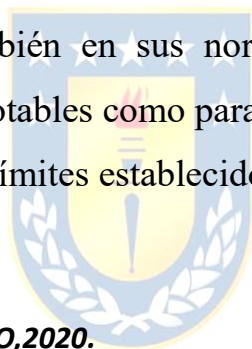


Tabla 1. Límites de exposición WHO, 2020.

Uso del agua	Directrices	Biovolumen (mm ³ /l)	Clorofila a (µg/l)	Abundancia (Cel/ml)	Microcistina (µg/l)
Consumo	Nivel de vigilancia	< 0,3	< 1	< 5000	<1
	Nivel 1 (Limitado riesgo a la salud)	0,3 – 4	1 – 12	5000-60000	1
	Nivel 2 (Elevado riesgo a la salud)	4 – 8	12 – 24	60000-120000	12
Recreacional	Nivel de vigilancia	1 – 4	3 – 12	-	-
	Nivel 1 (Limitado riesgo a la salud)	4 – 8	12 – 24	60000-120000	-
	Nivel 2 (Elevado riesgo a la salud)	> 8	>24	120000	24

Tabla 2. Límites de exposición fijados por distintos países. Villalobos et al.,2025.

País/Organización	Cianotoxina	Agua potable (µg/L)	Agua recreacional (µg/L)
WHO	Microcystin-LR	1.0	24.0
WHO	Cylindrospermopsin	0.7	6.0
WHO	Saxitoxins	3.0	30.0
WHO	Anatoxin-a	3.0	60.0
USEPA	Microcystin	0.3–1.6	<8.0
USEPA	Cylindrospermopsin	0.7–3.0	<15.0
USEPA	Saxitoxins	0.3–1.6	8.0
USEPA	Anatoxin-a	0.7–3.0	15.0
EU	Microcystin-LR	1.0	-
China	Microcystin-LR	1.0	ND
Australia	Microcystin	1.3	≤10.0
Australia	Nodularin	1.3	≤10.0
Australia	Cylindrospermopsin	0.9	ND
Australia	Anatoxin-a	3.1	ND
Australia	Saxitoxins	3.1	ND
Brazil	Microcystin	1.0	ND
Brazil	Cylindrospermopsin	15.0	ND
Brazil	Saxitoxins	3.0	ND
Brazil	Nodularin	1.0	ND
Canada	Microcystin-LR	1.5	10.0
Denmark	Microcystin	1.0	20.0

Belgium/Luxembourg	Microcystin-LR	1.0	20.0
France	Microcystin-LR	1.0	≤25.0
Finland	Microcystin	<1.0	ND
Germany	Microcystin	<1.0	<10.0
Greece	Microcystin-LR	1.0	ND
Italy	Microcystin	ND	<25.0
Poland	Microcystin-LR	1.0	20.0
Czech Republic	Microcystin-LR	1.0	ND
Portugal	Microcystin-LR	1.0	ND
Netherlands	Microcystin	1.0	<20.0
New Zealand	Microcystin	1.0	≤12.0
New Zealand	Cylindrospermopsin	1.0	ND
New Zealand	Saxitoxins	3.0	ND
New Zealand	Anatoxin-a	6.0	ND
New Zealand	Anatoxin-a(s)	1.0	ND
New Zealand	Homoanatoxin-a	2.0	ND
New Zealand	Nodularin	1.0	ND
Singapore	Microcystin	1.0	ND
Spain	Microcystin	1.0	ND
Turkey	Microcystin-LR	1.0	<25.0
Turkey	Cylindrospermopsin	1.0	ND
Uruguay	Microcystin-LR	1.0	20.0
Uruguay	Cylindrospermopsin	0.5	ND
Uruguay	Saxitoxins	3.0	ND
South Africa	Microcystin-LR	ND	<10.0

Perú	Microcystin-LR	1.0	ND
Argentina	Microcystin-LR	1.0	ND
Mexico	Microcystin-LR	1.0	ND
Costa Rica	Microcystin-LR	1.0	ND
Paraguay	Microcystin-LR	1.0	ND
Panama	Microcystin-LR	1.0	ND

En concordancia con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la normativa implementada en numerosos países para la gestión del riesgo asociado a las cianotoxinas en aguas de consumo y recreacionales, Chile presenta un importante vacío regulatorio. Actualmente, no existe una normativa nacional que establezca límites máximos permisibles para cianotoxinas en aguas destinadas al consumo humano o al uso recreacional, ni obligaciones de monitoreo y gestión específicas para estos contaminantes emergentes. Si bien las autoridades sanitarias han emitido recomendaciones y adoptado medidas preventivas frente a episodios de floraciones de cianobacterias en algunos cuerpos de agua, estas corresponden a acciones de gestión del riesgo y no constituyen una regulación permanente de alcance nacional.

La limitada disponibilidad de información cuantitativa sobre la ocurrencia, distribución espacial y variabilidad temporal de las cianotoxinas en Chile podría constituir uno de los factores que han dificultado el desarrollo de un marco regulatorio específico. En este contexto, la generación de datos confiables y representativos sobre la presencia de estos compuestos resulta fundamental para sustentar evaluaciones de riesgo, establecer criterios de calidad del agua y

proporcionar la evidencia científica necesaria para el diseño e implementación de futuras políticas públicas y regulaciones nacionales.

1.4 Métodos para la determinación de cianotoxinas

Se dispone de variados métodos para la extracción, determinación y cuantificación de cianotoxinas. Las opciones disponibles van desde métodos simples y rápidos para realizar una apreciación global de la toxicidad y efectos biológicos de la muestra, a métodos complejos y sofisticados que permiten la identificación y cuantificación de componentes individuales y sus variantes.

1.4.1 Bioensayos

Los Bioensayos pueden ser una buena opción cuando no se dispone de equipos cromatográficos, o cuando se especula que hay otras cianotoxinas además de las conocidas y se requiere una estimación directa de la toxicidad general de una muestra, sin embargo, son análisis poco sensibles y que se han vuelto fuertemente cuestionados. De esto es un buen ejemplo el análisis en ratones, uno de los primeros utilizados, basado en la inyección intraperitoneal de lisado de la suspensión de cianobacterias preparadas por sonicación, congelado y descongelado y esterilizadas por ultrafiltración. Los bioensayos también pueden ser realizados en organismos, tales como, larvas de mosquito, *Daphnia* y *Artemia*, este último incluso disponible en formato de kit comercial (Kivirante et al., 1991).

1.4.2 Métodos bioquímicos

Existen también los métodos bioquímicos, los que se basan en la propiedad de microcistinas y nodularinas de inhibir las enzimas de la desfosforilización de proteínas intracelulares (MacKintosh et al., 1990).

Dentro de los más usados están los inmunoensayos, como es el caso de la prueba de ELISA. La prueba de ELISA es un método económico y de buena sensibilidad que, aunque no se constituye como un remplazo de los métodos instrumentales, si puede ser considerado una muy buena alternativa como método de screening.

1.4.3 Métodos cromatográficos

Los métodos instrumentales son los elegidos como referencia para determinar límites específicos de cianotoxinas (WHO, 2020), basados en las características físico químicas de las hepatotoxinas, han sido ampliamente utilizados en sus diferentes variantes para la determinación de microcistinas en distintas matrices ambientales, variando las técnicas de extracción y de configuración instrumental combinando la cromatografía HPLC con detectores UV, Arreglo de diodos (DAD), detectores de masas (MS –MS/MS) o Excitación laser (MALDI) (Erhard et al., 1997)

1.4.4 Métodos moleculares

Están también los métodos moleculares que, en base a la extracción y cuantificación de ADN, permite generar perfiles específicos de las cianobacterias productoras de cianotoxinas. Es esta una herramienta que se ha usado ampliamente no solo para determinar toxicidad específica de una muestra, sino también para establecer posibles correlaciones entre los distintos parámetros fisicoquímicos y la producción de la toxina (Ballesteros et al., 2022, Zepernick et al., 2024).

1.4.5 Métodos para análisis *in situ*

El crecimiento de la problemática asociada a la presencia de cianotoxinas, principalmente en cuerpos de agua utilizados con fines recreacionales, ha instalado la necesidad de métodos de diagnóstico rápido que permitan la toma de decisiones inmediatas.

Debido a esto las empresas químicas, han diseñado y puesto a disposición varios kits rápidos para análisis en terreno basados en la técnica de inhibición de la fosfatasa (PPIA) o en tiras reactivas inmunocromatográficas que permiten obtener resultados semicuantitativos en minutos y tomar decisiones rápidas para evitar la exposición al riesgo de las personas.

1.5 Cepas productoras y no productoras

Las cianobacterias son componentes integrales de los ecosistemas acuáticos, pero su capacidad para formar floraciones masivas y producir metabolitos secundarios tóxicos, conocidos como cianotoxinas, representa un riesgo significativo para la salud pública y el equilibrio ecológico. Una de las mayores incógnitas en la limnología y la ecología microbiana es por qué algunas poblaciones de cianobacterias consisten principalmente en cepas productoras de toxinas (toxigénicas), mientras que otras están dominadas por cepas no productoras.

Se han realizado estudios de distintos tipos buscando la gran respuesta a cuál es la causa de que algunas floraciones produzcan cianotoxinas y otras no. Estudios controlados con cepas salvajes traídas al laboratorio y expuestas a modificaciones de luz o distintas concentraciones de nutrientes (Briand et al., 2017), investigaciones en muestras de campo que analizan la población cianobacteriana durante periodos de floración utilizando análisis genéticos (PCR) y buscando correlaciones con las cianotoxinas detectadas (Renaud, 2009; Ngwa et al., 2014) o análisis metagenómicos y filogenéticos (Yancey et al., 2008, Kurmayer et al., Mikalsen et al., 2003), todos ellos tropiezan con la escasa posibilidad de generalizar las conclusiones de cada uno de estas investigaciones.

Estos estudios han coincidido en los efectos de factores ambientales (Luz, nutrientes, temperatura), dinámicas de nutrientes (Lei et al., 2021) y evolución de cepas en la generación de toxinas, sin embargo, también persiste la limitación que la evidencia presenta respecto de que los resultados obtenidos para un género o cepa específica a menudo no son aplicables a otros y al hecho de que

la sinergia entre los distintos factores puede afectar los resultados obtenidos por un factor estudiado en forma unitaria.

Comprender estas dinámicas es esencial para anticipar los riesgos para la salud humana y ambiental en un mundo con ecosistemas acuáticos cada vez más estresados, sin embargo, mientras no se cuenten con parámetros generales que permitan predecir si una floración será o no tóxica, debe primar el principio precautorio y considerar como una prioridad el monitoreo constante para evaluar eficientemente los riesgos de exposición.

1.6 Presencia de cianobacterias y cianotoxinas en Chile

La contaminación de cuerpos de agua por cianotoxinas no solo es una problemática para países vecinos, ya que a la vez nuestro país ha presentado incrementos en los reportes de floraciones de cianobacterias en distintos cuerpos de aguas entre los que se pueden contar el lago Villarrica, lago Vichuquén (Región del Maule), Embalse Convento Viejo (Región de O'Higgins), lago Rapel (Región de O'Higgins), laguna Grande de San Pedro, Lo Méndez y Lo Galindo (Región del Biobío) (Almanza et al., 2019). Varios de estos lagos estudiados han sufrido aumentos en sus niveles tróficos, lo que responde a las características antes descritas para privilegiar las proliferaciones de floraciones algales nocivas, generadas a raíz de modificaciones en los usos de suelos y a las condiciones forzantes provocadas por el cambio climático (Almanza et al., 2019). Si bien es cierto la información científica disponible respalda el aumento sostenido de las proliferaciones algales nocivas en los cuerpos de agua en Chile, no podemos decir lo mismo respecto al conocimiento de si estas cianobacterias son o no productoras de cianotoxinas. Como se ha discutido antes, un género específico de cianobacterias pueden o no ser productor

de cianotoxinas, por lo cual el aumento registrado para la presencia de las cianobacterias podría no ser equivalente a un aumento en la presencia de cianotoxinas. Por otro lado, es la misma ausencia de evidencia científica respecto a la presencia de cianotoxinas en los sistemas lacustres de Chile, la que sustenta el interés de este proyecto de investigación en evaluar a través de métodos cuantitativos la existencia de cianotoxinas en algunos lagos del Centro sur de Chile.

Estudios realizados en el marco del proyecto FONIS/CONICYT SA13I20211 durante los años 2013 al 2015, evidenciaron presencia de cianotoxinas del tipo microcistinas en las lagunas; Lo Galindo, Tres Pascualas, Lo custodio, Lo Méndez, Laguna Grande de San pedro, La Posada y Quiñenco, todas ubicadas dentro o cerca de la ciudad de Concepción. Las concentraciones detectadas estuvieron en un rango entre los 0,3 ug/l y los 115,4 ug/l, excediendo el límite establecido por la OMS en los casos de laguna Lo Galindo, Tres pascualas, Lo custodio, Lo Méndez y Laguna Grande de San pedro (Almanza et al.,2016). Posteriormente y hasta el periodo de este estudio no se han publicado datos adicionales sobre la ocurrencia y concentración de cianotoxinas en estos u oros cuerpos de agua en el centro sur de Chile, lo que refuerza la importancia de contar con nueva evidencia que permita evaluar si la presencia de cianotoxinas se ha incrementado en los últimos diez años y de ser así a que factores responde dicho comportamiento.

De acuerdo con lo anterior, se plantea lo siguiente:

2. Preguntas de investigación

1. ¿Los géneros de cianobacterias identificados en lagos y lagunas del centro-sur de Chile incluyen cepas productoras de cianotoxinas?
2. ¿Las concentraciones de cianotoxinas superan los valores de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud para aguas destinadas al consumo humano y al uso recreacional, representando un potencial riesgo para la salud humana y los ecosistemas acuáticos?
3. ¿Qué relación existe entre las condiciones físico-químicas del agua (temperatura, pH, nutrientes, oxígeno disuelto, conductividad, entre otras) y la presencia y concentración de microcistinas y nodularinas en los cuerpos de agua estudiados?

3. Hipótesis

Considerando el aumento progresivo de floraciones de cianobacterias reportado en lagos del centro-sur de Chile, y la detección previa de altas concentraciones de microcistinas en algunos de estos sistemas, se plantean las siguientes hipótesis:

Hipótesis general: La eutrofización progresiva y las condiciones ambientales favorables en los lagos y lagunas del centro-sur de Chile propician el desarrollo de floraciones de cianobacterias productoras de cianotoxinas, cuyas concentraciones podrían superar los valores de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud para la protección de la salud humana y los ecosistemas acuáticos.

A partir de esta hipótesis general, se formulan las siguientes hipótesis específicas, asociadas a cada una de las preguntas de investigación:

H1: Los lagos y lagunas estudiados presentan especies o cepas de cianobacterias con capacidad de producir microcistinas y/o nodularinas.

H2: La presencia y concentración de microcistinas y nodularinas se relacionarán positivamente con el grado de eutrofización, la temperatura del agua, la conductividad eléctrica, la razón N/P y la composición taxonómica de la comunidad de cianobacterias.

4. Objetivo general

Evaluar la presencia de cianotoxinas del tipo microcistinas y nodularinas en lagos y lagunas del centro-sur de Chile, y su relación con la composición taxonómica de las comunidades de cianobacterias y con los factores fisicoquímicos del ambiente acuático, con el fin de determinar si existe riesgo potencial para la salud humana y los ecosistemas.

5. Objetivos específicos

1. Identificar taxonómicamente los géneros/especies de cianobacterias presentes en lagos y lagunas del centro-sur de Chile.
2. Determinar la presencia y concentración de cianotoxinas del tipo microcistinas y nodularinas en los cuerpos de agua estudiados.
3. Determinar el riesgo ambiental de las concentraciones de cianotoxinas presentes en lagos del C-S de Chile, considerando los niveles de referencia establecidos por la OMS.
4. Determinar la relación entre las variables ambientales y la presencia de cianotoxinas en lagos del centro sur de Chile.

6. Metodología

El área de estudio se fijó privilegiando el estudio de lagos y lagunas con información científica previa de la presencia de floraciones algales nocivas por cianobacterias. En base a esto se determinó incluir en el estudio las lagunas Lo Galindo y Laguna Grande de San Pedro; ambas con antecedentes de larga data sobre su comunidad Fito planctónica, así como también de las concentraciones de nutrientes y otros parámetros fisicoquímicos a través de los cuales se han clasificado como fuentes de agua dulce con importantes grados de eutrofización y por lo tanto potenciales fuentes de producción de cianobacterias.

También se consideraron en este estudio, cuerpos de agua con importancia recreativa, como es el caso de la Laguna Avendaño, Lago Lanalhue y Lago Vichuquen. En este último se incluyeron también laguna Torca y Estero Llico ambos conectados al Lago Vichuquen.

Se realizaron muestreos quincenales de las lagunas Galindo, Laguna Grande de San Pedro y Laguna Avendaño, entre octubre y diciembre de 2022 y luego se aumentaron a frecuencia semanal entre enero y abril de 2023. En cuanto al Lago Vichuquen, laguna Torca, Lago Llico y Lago Lanalhue, los muestreos se planificaron mensualmente entre octubre y diciembre de 2022 y luego se aumentó a muestreos quincenales entre enero y abril de 2023.

Las muestras para análisis de microcistinas se tomaron en botellas de un litro de vidrio ámbar debidamente rotuladas y fueron transportadas al Laboratorio a temperatura inferior a 4°C en cajas cooler con mezcla agua hielo.

La obtención de muestras para el análisis cualitativo de cianobacterias se realizó con una red de deriva “drift net” de 20 micrones de trama y colocada por al menos 10 minutos.

La muestra fue depositada en frascos de plástico debidamente rotulados (nombre de la estación y fecha).

Las muestras una vez obtenidas fueron fijadas de inmediato para detener la reproducción y la descomposición de las microalgas y el resto de contenido orgánico presente en la muestra. Para ello, se agregan unas gotas de Lugol, que es el fijador menos agresivo para la conservación de las células frágiles hasta su análisis en laboratorio. El análisis cuantitativo de las muestras se realizó utilizando un microscopio invertido Euromex Oxion Inverso, siguiendo la técnica de Utermöhl. Los taxones de cianobacterias se identificaron utilizando el manual taxonómico preparado por Parra et al. para el fitoplancton chileno, el cual se complementó con literatura actualizada y específica sobre cianobacterias. La nomenclatura taxonómica se actualizó de acuerdo con los datos publicados en Algaebase. Las cianotoxinas se analizaron como cianotoxinas totales por técnica de HPLC con detector de arreglo de diodos, utilizando un cromatógrafo Agilent 1260 Infinity II. Para extraer las cianotoxinas intracelulares se realizó primero una lisis celular sometiendo las muestras al método de congelado descongelado y luego se filtraron al vacío a través de un filtro de fibra de vidrio de 1.5 μm . La extracción de las cianotoxinas se realizó por método de extracción en fase sólida utilizando una columna SPE C18 marca UCT, a través de la cual se hizo pasar 1 L de la muestra lisada. Luego las muestras fueron eluidas y concentradas con 2ml de metanol grado HPLC en un vial de vidrio ámbar. Para la calibración del HPLC se realizó una curva entre

0,1 a 10ug/ml, utilizando estándares puros de Microcistina RR, YR, LR, LA y Nodularina, marca Gold Standard, de concentración original 10 ug/ml y de pureza mayor al 95%. Los estándares de microcistinas son muy difíciles de obtener en el mercado y su costo elevado es una de las principales dificultades asociadas al análisis cromatográfico cuantitativo. Por esta razón se utilizaron en este estudio aquellos que presentan mayor disponibilidad en el mercado, considerando adicionalmente que MC-LR es la microcistina con mayor ocurrencia a nivel mundial y la única reglamentada por la OMS. El método cromatográfico se implementó utilizando como referencia las condiciones publicadas en la norma ISO20179 para detectar tanto microcistinas como nodularina en una sola inyección cromatográfica. Las condiciones cromatográficas utilizadas se indican en la Tabla 3.

Las cianotoxinas presentes en las muestras se detectaron a través de la identificación de los tiempos de retención de los estándares puros (Figura 2) y su cuantificación se realizó por extrapolación en la curva de calibración obtenida a través de la inyección seriada de los mismos estándares. Adicionalmente, las muestras que detectaron concentraciones mayores al límite de cuantificación del método fueron confirmadas a través de la contrastación de espectros de estándares puros, utilizando para ello el software Agilent OpenLab Chemstation versión 2.3.54 (ver Figura 3). El límite de cuantificación del método para todos los congéneres analizados fue de 1.0 ug/l, calculado a través de lo recomendado por Miller, J. N., & Miller, J. C. (2018).

Tabla 3. Condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de cianotoxinas por HPLC DAD.

Columna	Kromasil 100-5-C18/ 4.6 x 250mm
Eluente	Acetonitrilo/Agua 35:65 TFA
Temperatura de la columna	26° C
Volumen de inyección	20 µl
Longitud de onda	238 nm
Flujo	1.5 ml/min.



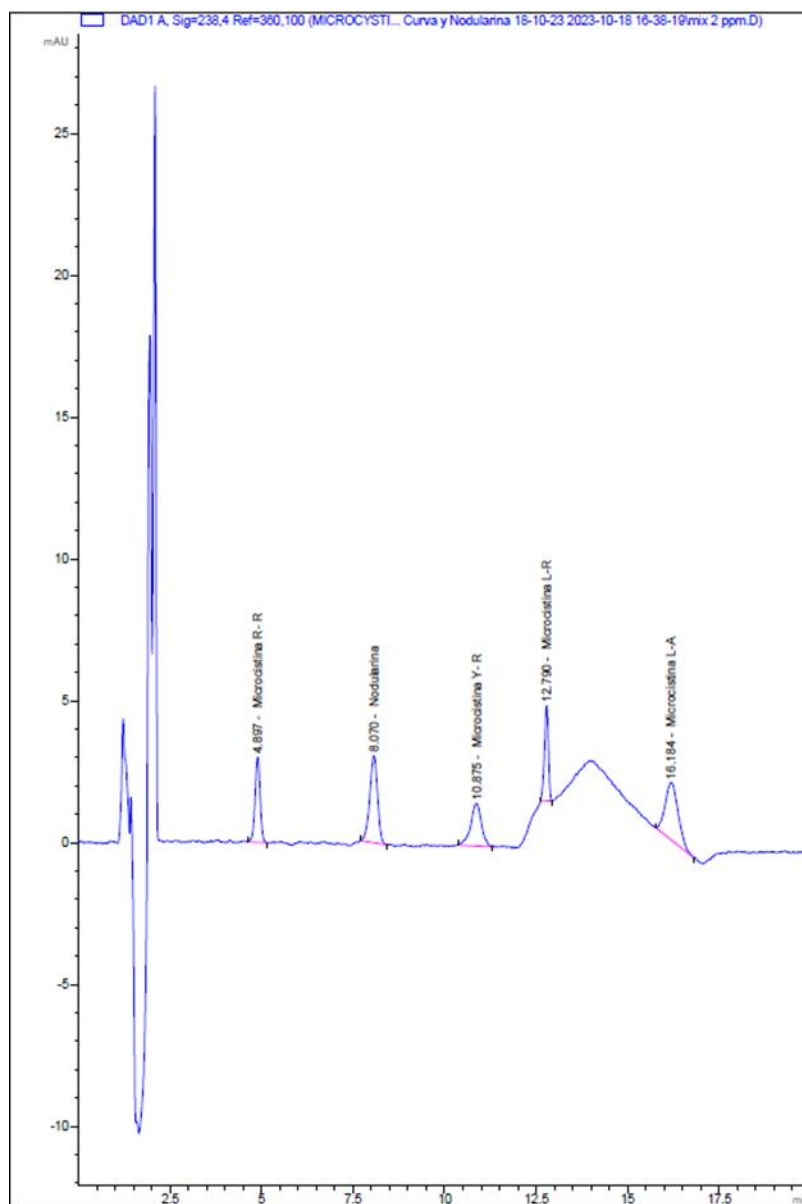


Figura 1. Cromatograma obtenido de la inyección de los estándares puros de 2mg/l de MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA y Nodularina

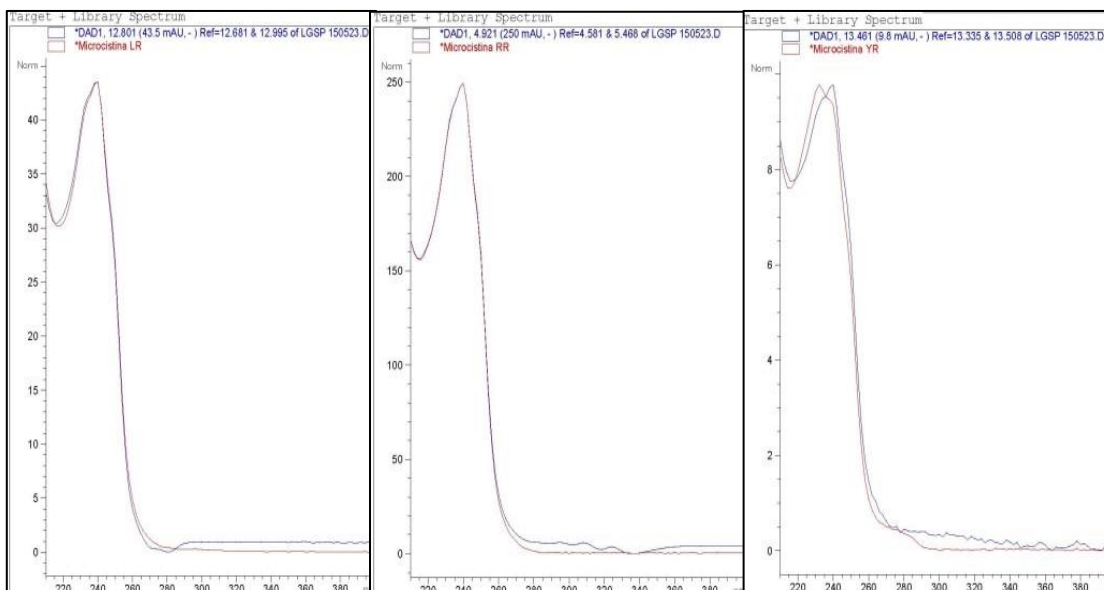


Figura 2. Contrastación de espectros de estándares puros de MC-RR, MC-LR y MC-YR frente a muestra positiva de Laguna Grande de San Pedro para las mismas variantes de MC.

7. Bibliografía

1. Abbasi, [inicial no verificable], Shalygo, M., & Ismailov, S. (2019). Influence of alkalinity, ultra-low CO₂ concentration and irradiance on spectral properties and photosynthesis of *Calothrix* sp. ISC 65. *Algologia*, 29(1), 40–56. <https://doi.org/10.15407/ALG29.01.040>
2. Abello, P., Gutiérrez-Álvarez, P., & Figueroa, R. (2019). Proliferación de cianobacterias tóxicas en lagunas costeras del centro-sur de Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 54(3), 465–476.
3. Almanza, V., Parra, O., Bicudo, C. E., Baeza, C., Beltran, J., Figueroa, R., & Urrutia, R. (2016). Occurrence of toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in a central Chilean (36° Lat. S) urban lake. *Revista Chilena de Historia Natural*, 89(8), 1–12.
4. Almanza, V., Pedreros, P., Laughinghouse, H. D., Félez, J., Parra, O., Azócar, M., & Urrutia, R. (2019). Association between trophic state, watershed use, and blooms of cyanobacteria in south-central Chile. *Limnologia*, 75, 30–41.

5. American Public Health Association. (2023). Standard methods for the examination of water and wastewater (23rd ed.).
6. Ballesteros, I., Cruz, S. de la., Rojas, M., Salazar, G., Martínez-Fresneda, M., & Castillejo, P.. (2022). Screening of cyanotoxin producing genes in Ecuadorian freshwater systems. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 34, e24. [https://doi.org/10.1590/S2179-975X2122Baselga-Cervera, et al. \(2014\). Why cyanobacteria produce toxins? Evolutionary game theory suggests the key. International Journal of Biology, 7\(1\). https://doi.org/10.5539/IJB.V7N1P64](https://doi.org/10.1590/S2179-975X2122Baselga-Cervera, et al. (2014). Why cyanobacteria produce toxins? Evolutionary game theory suggests the key. International Journal of Biology, 7(1). https://doi.org/10.5539/IJB.V7N1P64)
7. Briand, J. F., et al. (2008). Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (Cyanobacterium) population. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3839–3848. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-07>
8. Bu, [inicial no verificable], Wu, S., & Yang, K. (2014). Identification of factors influencing the restoration of cyanobacteria-dominated biological soil crusts. *PLOS ONE*, 9(3), e90049. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090049>
9. Campos, V., Lisperguer, S., Weckesser, J., Vera, A., & Muñoz, D. (2005). Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile. *Boletín Micológico*, 20, 73–81.
10. Campos, V., Muñoz, D., Straube, M., Lisperguer, S., and Weckesser, J. 2007. Péptidos tóxicos y no tóxicos de cianobacterias en cuerpos de agua dulce de la V Región, Chile. *Boletín Micológico*. 22: 95–100.Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites: The cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 445–459.
11. Carmichael, W. W. (2001). Health effects of toxin-producing cyanobacteria. *Human and Ecological Risk Assessment*, 7, 1393–1407.
12. Chorus, I., & Bartram, J. (Eds.). (1999). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon.
13. Chorus, I., & Welker, M. (Eds.). (2021). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management (2nd ed.). CRC Press / World Health Organization.

14. Christensen, V. G., Stelzer, E. A., Eikenberry, B. C., Olds, H. T., LeDuc, J. F., Maki, R. P., Saley, A. M., Norland, J., Khan, E. (2021). Cyanotoxin mixture models: Relating environmental variables and toxin co-occurrence to human exposure risk. *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125560. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125560>
15. Díez-Quijada, L., Prieto, A. I., Guzmán-Guillén, R., Jos, A., & Cameán, A. M. (2019). Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 106–132.
16. Dziallas, [inicial no verificable], & Grossart, H. (2011). Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. *PLOS ONE*, 6(9), e25569. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0025569>
17. Falconer, I. R. (2005). Cyanobacterial toxins of drinking water supplies. CRC Press.
18. Fujiki, H., & Suganuma, M. (2011). Tumor promotion by protein phosphatase inhibitors. *Advances in Cancer Research*, 111, 1–30.
19. Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471–483.
20. Jansen, M. (2023). Drivers and dynamics of phytoplankton communities and harmful algal blooms in mountain lakes [Tesis doctoral, Portland State University]. <https://doi.org/10.15760/etd.3645>
21. Jones, M. R., Pinto, E., Torres, M. A., Dörr, F., Mazur-Marzec, H., Szubert, K., & Janssen, E. M. L. (2021). CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Research*, 196, 117017.
22. Kaloudis, T., Hiskia, A., & Triantis, T. M. (2022). Cyanotoxins in Bloom: Ever-Increasing Occurrence and Global Distribution of Freshwater Cyanotoxins from Planktic and Benthic Cyanobacteria. *Toxins*, 14(4), 264. <https://doi.org/10.3390/toxins14040264>

23. Komarek, Jiri & Kaštovský, Jan & Mares, Jan & Johansen, Jeffrey. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia -Praha-*. 86. 295-335. Kurmayer, R., et al. (2015). Integrating phylogeny, geographic niche partitioning and secondary metabolite synthesis in bloom-forming *Planktothrix*. *The ISME Journal*, 9, 909–921. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2014.189>
24. Kuo, Y., Chen, J., & Li, S. (2018). Using generalized additive models to investigate factors influencing cyanobacterial abundance through phycocyanin fluorescence in East Lake, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(11), 698. <https://doi.org/10.1007/S10661-018-6981-Z>
25. Lei, L., et al. (2021). Nutrient regulation of relative dominance of cylindrospermopsin-producing and non-cylindrospermopsin-producing *Raphidiopsis raciborskii*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.793544>
26. Machado, J., et al. (2016). Cyanotoxins in estuaries. *Marine Drugs*, 14, 5.
27. Meriluoto, J., Spoof, L., & Codd, G. A. (Eds.) (2017). *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. John Wiley & Sons. Mikalsen, et al. (2003). Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2774–2785. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2774-2785.2003>
28. Miller, J. N., & Miller, J. C. (2018). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (7th ed.). Pearson. [Nota de la autora: obra clásica que describe en detalle el cálculo de LOD y LOQ mediante métodos estadísticos y su aplicación en cromatografía.
29. Neumann, U., Campos, V., Cantarero, S., Urrutia, H., Heinze, R., Weckesser, J., & Erhard, M. (2000). Co-occurrence of non-toxic (cyanopeptolin) and toxic (microcystin) peptides in a bloom of *Microcystis* sp. from a Chilean lake. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(2), 191–197.
30. Ngwa FF, Madramootoo CA, Jabaji S. Comparison of cyanobacterial microcystin synthetase (*mcy*) E gene transcript levels, *mcy* E gene copies, and biomass as

- indicators of microcystin risk under laboratory and field conditions. *Microbiologyopen*. 2014 Aug;3(4):411-25. doi: 10.1002/mbo3.173. Epub 2014 May 17. PMID: 24838591; PMCID: PMC4287171.
- Nimptsch, J., et al. (2016). Cyanotoxins in Chile. *International Review of Hydrobiology*, 101, 57–68.
31. Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., et al. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118(6), 420–424.
32. Ohta, T., Sueoka, E., Iida, N., Komori, A., Suganuma, M., Nishiwaki, R., et al. (1994). Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Carcinogenesis*, 15(2), 223–227. (Título corregido según fuente original).
33. Okechukwu, K., & Onyema, A. (2013). Cyanobacteria abundance and its relationship to water quality in the Mid-Cross River floodplain, Nigeria. *Revista de Biología Tropical*, 57(1–2), 288–298. <https://doi.org/10.15517/RBT.V57I1-2.11288>
34. Paerl, H. W., et al. (2001). Harmful algal blooms. *The Scientific World Journal*, 1, 76–113.
35. Paerl, H.W. and Paul, V.J. (2012) Climate Change: Links to Global Expansion of Harmful Cyanobacteria. *Water Research*, 46, 1349-1363.
36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002> Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Harmful blooms. *Microbial Ecology*, 65, 995–1010.
37. Park, J., Lee, J., & Kim, K. (2022). Commercial potential of the cyanobacterium *Arthrospira maxima*: Physiological and biochemical traits and the purification of phycocyanin. *Biology*, 11(5), 628. <https://doi.org/10.3390/biology11050628>
38. Pham, T., Bui, L., Nguyen, K., Nguyen, N., & Nguyen, H. (2017). Influence of environmental factors on cyanobacterial biomass and microcystin concentration in the Dau Tieng Reservoir, a tropical eutrophic water body in Vietnam. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 53, 1–12. <https://doi.org/10.1051/LIMN/2016038>

39. Renaud. (2009). Microcystin production and the dominance of toxigenic strains of cyanobacteria in lake and culture studies [Tesis doctoral]. <https://doi.org/10.20381/RUOR-19938>
40. Rigosi, [initial no verifiable], Carey, C. C., Ibelings, B. W., & Brookes, J. D. (2014). The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among taxa. *Limnology and Oceanography*, 59(1), 99–114. <https://doi.org/10.4319/LO.2014.59.1.0099>
41. Sivonen, K., & Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In I. Chorus & J. Bartram (Eds.), *Toxic cyanobacteria in water*.
42. Smith, V. H. (2003). Eutrophication. *Environmental Science and Pollution Research*, 10, 126–139.
43. Tran, N. H. (2012). Comparaison de la réponse de deux souches de *Planktothrix agardhii* (productrice de microcystines et son mutant non producteur de microcystines) aux stress environnementaux [Tesis].
44. Thuret-Benoist H, Pallier V, Feuillade-Cathalifaud G. Quantification of microcystins in natural waters by HPLC-UV after a pre-concentration step: validation of the analytical performances and study of the interferences. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2019 Nov;72:103223. doi: 10.1016/j.etap.2019.103223. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31401407.
45. Visser, P., Verspagen, J., Sandrini, G., & Stal, L. (2016). How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 145–159. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2015.12.006>
46. Walls JT, Wyatt KH, Doll JC, Rubenstein EM, Rober AR. Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. *Sci Total Environ*. 2018 Jan 1;610-611:786-795. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.149. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28826116.
47. Welker, M., & von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 530–563.
47. World Health Organization. (2020a). Cyanobacterial toxins: Microcystins. In *Guidelines for drinking-water quality* (4th ed., incorporating the 1st addendum). WHO.

48. World Health Organization. (2020b). Cyanobacterial toxins.
49. World Health Organization. (2021). Microcystins background document.
50. Yancey, M. A., et al. (2022). Metagenomic and metatranscriptomic insights into population diversity of Microcystis blooms: Spatial and temporal dynamics of mcy genotypes, including a partial operon that can be abundant and expressed. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3). <https://doi.org/10.1128/aem.02464-2>
51. Zepernick, B. N., et al. (2024). Molecular investigation of harmful cyanobacteria reveals hidden risks and niche partitioning in Kenyan lakes. *Harmful Algae*. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2024.102757>
52. Zhang, Y., Xu, L., & Zhu, G. (2020). Interannual and seasonal shift between Microcystis and Dolichospermum: A 7-year investigation in Lake Chaohu, China. *Water*, 12(7), 1978. <https://doi.org/10.3390/W12071978>



Capítulo I

Occurrence and Seasonal Variability of Cyanotoxins in Mesotrophic and Eutrophic Water Bodies of Central Chile

Johanna Beltrán *, Pablo Pedreros, Guido Carrasco, Silvia Basualto, Oscar Parra and
Roberto Urrutia.

Faculty of Environmental Sciences & EULA-Center, University of Concepción, Barrio
Universitario s/n,

Concepción, 4089100, Chile; papedrer@udec.cl (P.P.); guicarrasco@udec.cl (G.C.);
sbasualto@udec.cl (S.B.); oparra@udec.cl (O.P.); rurrutia@udec.cl (R.U.)

* Correspondence: jbeltran@udec.cl



Abstract

Cyanotoxins were evaluated in seven water bodies in central Chile (Avendaño, Lo Galin-do, Grande de San Pedro, Lanalhue, Vichuquén, Torca, and Llico) from October 2022 to May 2023. Microcystins (MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA) and nodularin were quantified by HPLC-DAD, and their relationships with environmental variables and cyanobacterial abundance were assessed using Spearman correlation and principal component analysis (PCA). Cyanotoxins were detected in six systems, with MC-LR as the dominant congener. The highest concentration (407.5 $\mu\text{g/L}$) occurred in the mesotrophic Laguna Grande de San Pedro. Correlation analysis showed nodularin positively associated with conductivity ($\rho = 0.40$, $p < 0.05$), while microcystins were negatively correlated with temperature (ρ to -0.60 , $p < 0.05$). PCA explained 57.7% of variance, distinguishing toxin patterns along gradients of temperature, pH, conductivity, and N:P ratio. Cyanotoxin occurrence was weakly related to cyanobacterial abundance but consistently associated with low N:P ratios. These findings confirm the presence of cyanotoxin-producing strains in the studied water bodies and highlight the need to integrate nutrient dynamics, cyanobacterial community structure, and multi-congener toxin analysis into monitoring programs. Furthermore, the results demonstrate that mesotrophic systems could represent emerging sources of cyanotoxin production, underscoring the need to improve risk assessment and management strategies.

Keywords: cyanobacteria; trophic state; algal blooms; microcystins; nodularin

1. Introduction

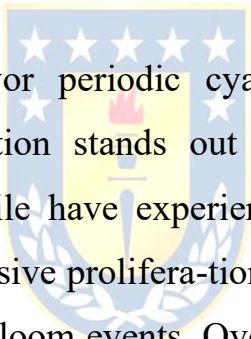
Harmful algal blooms caused by cyanobacteria are a global problem [1,2] that has affected not only eutrophic lake systems but has also been described in recent years in oli-gotrophic environments [3] including Araucanian lakes [4]. This wide range of trophic tolerance is associated with the multiple functional attributes of cyanobacteria, which al-low them to proliferate under diverse environmental conditions [2,5,6]. Among the nega-tive impacts they generate, one of the most concerning is the production of cyanotoxins, toxic compounds that are a risk to the overall aquatic ecosystem and human health [7,8]. Therefore, the identification of the type of cyanotoxin that are associated with bloom epi-sodes is not only relevant for the functioning of the systems of lakes but also for those who manage water resources of said lakes.

The production, diversity, and abundance of these secondary metabolites depend on the cyanobacterial taxon, since different species can produce specific cyanotoxins and even variants [5,9,10]. In aquatic environments, the cyanotoxins found include cyclic pep-tides and alkaloids [11,12]. Of these compounds, the hepatotoxic microcystins produced by the genera *Dolichospermum*, *Microcystis* and *Planktothrix* are the most common and most studied [13–15]. According to Souza Passos, et al. [16], Jones, et al. [17] and Meriluoto, et al. [18], more than 250 microcystin (MC) congeners are currently recognized. Among them, MC-LR is considered the most dangerous variant [16,19] due to its high toxicity, as well as its prevalence in aquatic environments [20,21]

While studies acknowledge the relationship between cyanobacterial biomass and cyanotoxin production [22,23], an increase in cyanotoxins does not

necessarily imply an increase in cyanobacterial abundance [24]. In fact, Santos Silva, et al. [22] concludes that cyanotoxins can also be found in the environment even in the absence of a visible bloom.

Determining which specific environmental factors stimulate cyanotoxin production remains complex, given that a single cyanobacterial strain can synthesize several toxic metabolites, making it difficult to establish a cause-and-effect relationship [25]. This has been demonstrated in numerous studies, which have found positive correlations, negative correlations, and zero correlations between cyanotoxin production and environmental conditions [26–31].



Among the factors that favor periodic cyanobacteria blooms in water, anthropogenic nutrient pollution stands out [2]. In this context, various freshwater ecosystems in Chile have experienced eutrophication processes, which have triggered an excessive proliferation of these microorganisms and, consequently, an increase in bloom events. Over the last two decades, studies have shown that these events have not only affected eutrophic water bodies, but blooms have also been reported in oligotrophic lakes [3,32–35]. Regarding cyanotoxins, the works of Neumann, et al. [34], Campos, et al. [36] and Almanza, et al. [37] have only identified the presence of microcystin isoforms (MC-YR, MC-LR, MC-LA, MC-RR, MC-FR). The presence of other types of cyanotoxins is unknown. Given the high vulnerability of the country to climate change impacts [38], together with the expected increase in anthropogenic nutrient inputs, the frequency and intensity of harmful algal blooms are likely to rise. In this context, the present study aimed to identify and quantify the cyanotoxin profiles in eutrophic and oligotrophic lakes used for recreational

purposes and located near urban areas. Specifically, the study focused on determining not only the types of cyanotoxins present (including microcystins and nodularins), but also whether their concentrations may pose a risk to human health and ecosystem integrity.

The working hypothesis is that the documented increase in cyanobacterial blooms is associated with the presence of cyanotoxins at concentrations that may represent a potential risk to human health. The results of this study are intended to contribute to the development of public policies addressing this increasingly relevant environmental and public health issue.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of Water Samples

This study included sampling of seven water bodies distributed latitudinally. These consisted of three urban lake systems (Avendaño, Lo Galindo, and Grande de San Pedro), three peri-urban systems (Lanahue, Vichuquén, and Torca), and the Llico creek (Figure 1). The morphometric characteristics and trophic state of each lentic ecosystem are presented in Table 1. The Llico stream has a maximum length of approximately 7 km and a variable depth between 1 and 2 m along most of its length [39]. Monitoring was conducted between October 2022 and May 2023, with monthly and bi-weekly sampling in Lanahue, Vichuquén, Torca, and the Llico stream, while sampling was conducted bi-weekly and weekly in Avendaño, Grande de San Pedro, and Lo Galindo. At each selected site, water samples were collected for the determination of total nitrogen, total phosphorus, cyano-bacteria abundance, and the presence of cyanotoxins. All samples were collected at the shoreline at

depths shallower than 0.5 m. This nearshore area typically exhibits the high-est cyanobacterial accumulations due to the buoyancy regulation of cyanobacteria, which promotes surface scum formation and wind-driven transport toward the shore. Moreover, the shoreline represents the zone of greatest relevance for recreational activities and direct human and animal exposure. Therefore, shoreline sampling provides critical information on the presence and potential risk of cyanobacteria and cyanotoxins to ecosystem integrity and public health. For cyanotoxin analysis, samples were collected in 1 L amber glass bottles, while samples for nutrient analysis were collected in 500 mL plastic containers. All samples were stored in coolers with ice ($<4^{\circ}\text{C}$) and then taken to the laboratory. Additionally, temperature, pH, and conductivity were measured in situ at each site using a Hanna HI 98194 multiparameter probe. The analysis of the total nitrogen and the total phosphorus was performed on a sample previously preserved in sulfuric acid at pH level between 1 and 2. The samples were oxidized with a mixture of peroxodisulfate and sulfuric acid and then quantified by molecular absorption spectrophotometry in a SEAL Analytical continuous flow analyzer, model AA500 [40].

Table 1. Limnological parameters and trophic state of each lentic ecosystem studied

Parameters	Torca	Vichuquén	Avendaño	Lo Galindo	Grande de San Pedro	Lanahue
Latitude (S)	34°45'	34°48'	36°45'	36°48'	36°51'	37°55'
Longitude (W)	72°04'	72°01'	72°27'	73°02'	73°06'	73°19'
Altitude (m above sea level)	3.0	4.0	66.0	9.0	4.0	8.0
Maximum depth (m)	7.0	31.0	21.0	3.4	13.5	26.0
Average depth (m)	---	17.1	8.3	1.3	8.3	13.1
Max. length (km)	3.7	11.5	3.4	0.519	2.7	9.6
Max. width (km)	1.5	1.9	0.6	0.141	1.4	4.3
Perimeter (km)	9.9	34.7	8.8	1.1	9.4	58.6
Lake area (km ²)	2.0	12.5	1.1	0.00005	1.6	31.9
Basin area (km ²)	9.0	505.0	5.9	0.183	12.7	325.0
Volume (km ³)	---	0.21	0.0144	6.25×10^{-8}	0.0128	0.418
Coastline development	2.0	2.8	2.9	1.4	2.1	2.9

Average depth/Max. depth		0.6	0.4	0.4	0.6	0.5
Basin area/lake area	4.5	40.4	5.4	1.4	8.2	10.2
Basin area/lake volume	---	2.405	409.7	1.1	992.2	777.5
Cryptodepression depth (m)	---	-26.0	---	-5.6	-9.5	-18.0
Trophic state	Eutrophic	Eutrophic	Mesotrophic	Eutrophic	Mesotrophic	Mesotrophic/Eutrophic

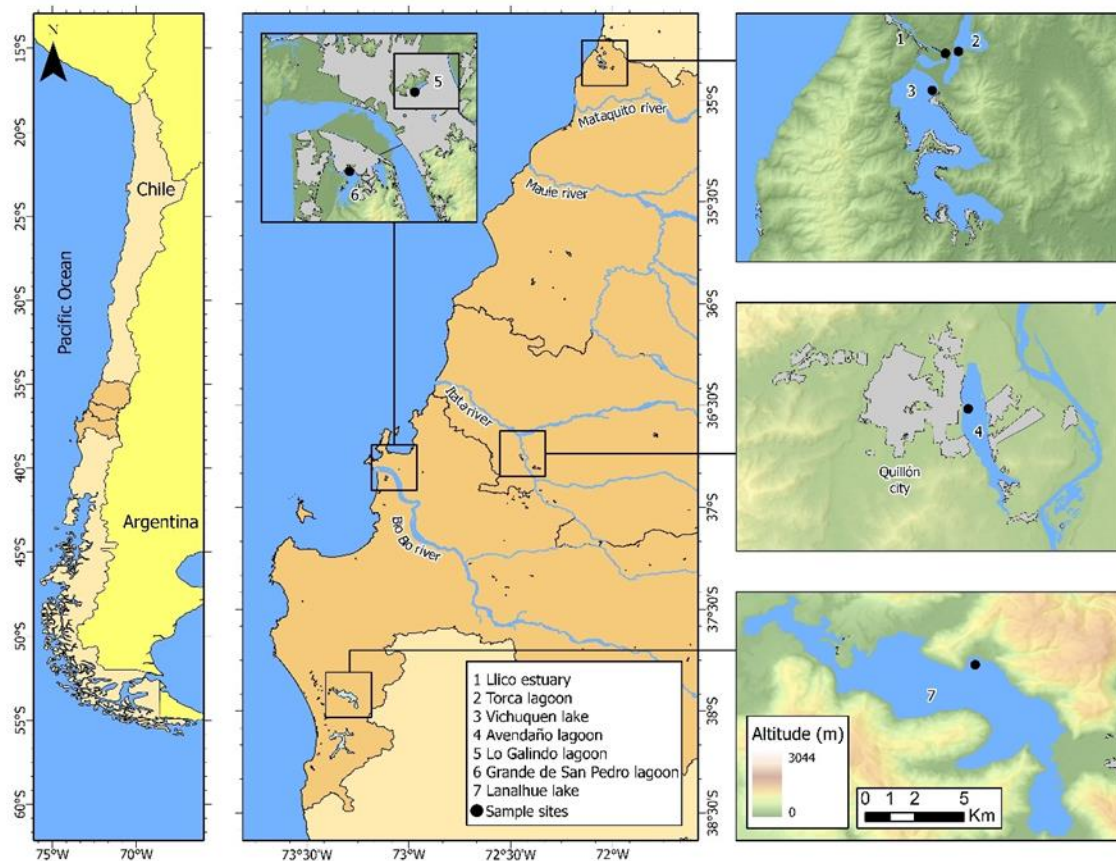


Figure 1. Location of the seven aquatic ecosystems studied.

Samples for qualitative analysis were obtained using a 20-micron plankton net. The collected material was placed in properly labeled plastic bottles (site name and date) and immediately fixed with 1% Lugol's iodine solution to halt the reproduction and decomposition of biological material, as well as the organic content present in the sample. For quantitative analysis, samples were obtained directly from the surface of the water body.

2.2. Sample Collection and the Analysis of Cyanobacteria

Quantitative analysis of the samples was conducted using a Euromex Oxion Inverso inverted microscope, following the Utermöhl technique [41]. Cyanobacterial taxa were identified using the taxonomic manual prepared by Parra, et al. [42] for Chilean phyto-plankton, which was supplemented with updated and specific literature on cyanobacteria [43–46]. The taxonomic nomenclature was updated according to the data published in Algaebase [47].

2.3. Cyanotoxin Analysis

Cyanotoxins were analyzed as total cyanotoxins by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector, using an Agilent 1260 Infinity II chromatograph. For the extraction of intracellular cyanotoxins, first the samples are processed using the freeze thaw method to cause cell lysis, followed by vacuum filtration through a 1.5 μm glass fiber filter. Cyanotoxin extraction was carried out by solid-phase extraction using a UCT C18 column, through which 1 L of the lysed sample was passed. The samples were then eluted and concentrated with 2 mL of HPLC-grade methanol in an amber glass vial. For HPLC calibration, a curve was prepared between 0.1 and 10 $\mu\text{g/mL}$, using pure standards of Microcystin RR, YR, LR, LA and Nodularin (Gold Standard catalog numbers 300636, 300638, 300632, 300628 and 300640, respectively) with an original concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ in methanol and a purity greater than 95%. The chromatographic method was developed to achieve efficient and robust resolution of nodularins and microcystins, based on the international standard ISO 20179:2005 and the previous work by Spoof et al. [48–51]. The combined detection of microcystins and nodularin was

performed using a Kro-masil 100-5-C18/4.6 x 250 mm column at a temperature of 26 °C. 20 µL of the methanol ex-tract from the samples was injected directly into the HPLC system, using an acetoni-trile/water 36:65 mixture in trifluoroacetic acid (TFA) medium as the eluent at a flow rate of 1.5 mL/min. The cyanotoxins were detected using a diode array detector at 238 nm. (The chromatogram showing the achieved resolution for a mixed standard containing the five calibrated congeners is provided in the Supplementary Material).

The cyanotoxins present in each sample were identified by comparing the retention time of the pure standards. Quantification was performed by extrapolation from the cali-bration curve obtained through serial injection of the same standards. Additionally, samples that showed concentrations exceeding the method's limit of quantification were con-firmed by comparing the spectra of pure standards using Agilent OpenLab software. Chemstation version 2.3.54.(Images showing examples of spectral matching between samples and pure standards are provided in the Supplementary Material).

2.4. Data Analysis

All statistical analysis was performed in R version 4.4.1 (R Core Team, 2024). Prior to the analysis, we conducted exploratory data analysis to detect anomalies in the dataset. Descriptive statistics (mean, standard deviation, minimum and maximum values) were calculated for each physical and chemical parameter. Simple relationships between envi-ronmental variables, cyanotoxin concentrations and cyanobacteria abundance were eval-uated using Spearman's rank correlation ($p < 0.05$). Principal components analysis (PCA) was

performed to evaluate spatial distribution of the aquatic systems and to identify environmental variables related to occurrence of cyanotoxins.

3. Results

Table 2 shows in detail the summary of physicochemical parameters measured at the seven study sites. Among the sites, the lowest average temperature was recorded at Grande de San Pedro, while the highest average temperature was reported at Vichuquén, with values of 18.5 °C and 22.9 °C, respectively. The pH ranged from a minimum of 7.39 at Lanalhue to a maximum of 8.16 at Torca. Electrical conductivity was the most heterogeneous parameter, with average values fluctuating between 56 µS/cm (Lanalhue) and 17,778 µS/cm (Llico). In terms of nutrients, Torca recorded the highest mean concentrations of total phosphorus (0.99 mg/L) and total nitrogen (8.09 mg/L). Meanwhile, Avendaño reported the lowest concentration of phosphorus at 0.02 mg/L, while the lowest value of nitrogen was found in Lanalhue and Avendaño at 0.52 mg/L.

Table 2. Average values of the physicochemical parameters measured at the study sites. Minimum and maximum values are described in parentheses. Temp: Temperature, EC: Electrical conductivity, TN: Total nitrogen and TP: Total phosphorus.

Site	n	Temp (°C)	pH	EC (μS/cm)	TN mg/L	TP mg/L
Torca	10	22.7 (20.1–27.1)	8.16 (6.01–9.40)	16,234 (10,900–22,000)	8.09 (0.43–130.4)	0.99 (0.053–3.82)
Llico	10	21.7 (15.4–26.1)	7.86 (6.08–9.21)	17,778 (12,790–23,490)	2.11 (0.79–4.75)	0.27 (0.023–1.06)
Vichuquén	12	22.9 (13.1–26.7)	7.48 (6.10–8.87)	7623.6 (3900–11,102)	1.01 (0.64–1.78)	0.080 (0.003–0.18)
Avendaño	19	20.2 (13.1–26.8)	7.50 (7.12–8.80)	180 (73–252)	0.52 (0.40–0.75)	0.020 (<0.003–0.024)
Lo Galindo	20	19.2 (11.3–28.1)	7.50 (6.48–8.45)	232 (98–445)	1.18 (0.29–1.91)	0.092 (0.026–0.35)
Grande de San Pedro	21	18.5 (13.4–25.6)	7.47 (6.42–7.81)	134 (50.9–253)	0.52 (0.19–1.22)	0.026 (<0.003–0.096)
Lanalhue	5	22.7 (20.3–24.0)	7.39 (7.14–7.68)	56 (39–74)	2.59 (0.23–6.05)	0.066 (<0.003–0.16)

During the study period, all monitored sites showed the presence of cyanobacteria. A total of four genera were identified; the most common were *Dolichospermum* and *Microcystis*, both present at most sites, except for Lake Vichuquén, where only the presence of *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger was recorded. The other genera identified were *Aphanocapsa* and *Snowella*, found in Lo Galindo Lagoon and Vichuquén Lake, respectively. It should be mentioned that *Snowella* was recorded only in the sampling conducted on April 21, 2023, while *Aphanocapsa* was present in 25% of the samples.

Comparing the abundance between sites, the genus *Dolichospermum* reported values that fluctuated between 0 and 7.1×10^7 Cel/L, while *M. aeruginosa*, the number of cells ranged from 0 to 4.1×10^7 Cel/L. For both genera, the highest abundances were reported in Laguna Grande de San Pedro during the autumn

period (29 May 2023) (Figure 2e). However, high cell counts for the most common genera were also observed during the summer period (January–February 2023). *Dolichospermum* was found in Laguna Avendaño (2.1×10^7 Cel/L) and Lake Lanalhue. (3.240.000 Cel/L) (Figure 2f), while *M. aeruginosa* recorded 2.807.805 Cel/L in Lo Galindo lagoon (Figure 2d). In the rest of the sites and throughout all the monitoring, the abundances were less than 850.000 Cel/L.

A total of five cyanotoxin congeners were detected across sites and in different sampling campaigns: nodularin (NOD) and four types of microcystins (MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA) (Table 3). The highest percentage of positive detections of total cyanotoxins was recorded in Lanalhue at 60%, followed by Lo Galindo, Llico, Grande de San Pedro, Vichuquén, and Torca with 35%, 30%, 24%, 17%, and 10%, respectively. The high percentage found in Lanalhue is likely associated with the lower number of samples taken, as territorial conflicts in the surrounding indigenous area prevented access to the lake during some sampling periods. It should also be noted that no cyanotoxins were detected in Avendaño.

Table 3. Types of cyanotoxins detected, percentage of positive detections, and average concentrations of cyanotoxins detected per study site. Minimum and maximum values are described in parentheses. nd: not detected

Site	n	Cyanobacteria	Cyanotoxins	Positive Samples for Cyanotoxins (%)	MC-Totals (µg/L)	NOD (µg/L)
Torca	10	<i>Dolichospermum</i> <i>Microcystis</i>	NOD	10%	nd	1.3 *
Llico	10	<i>Dolichospermum</i> <i>Microcystis</i>	MC-LR, NOD	30%	4.5 (1.0–10.9)	1.6 *
Vichuquén	12	<i>Microcystis</i> <i>Snowella</i>	MC-RR	17%	3.4 (2.6–4.3)	nd
Avendaño	19	<i>Dolichospermum</i> <i>Microcystis</i>	nd	nd	nd	nd
Lo Galindo	20	<i>Dolichospermum</i> <i>Microcystis</i> <i>Aphanocapsa</i>	MC-LR, MC-LA	35%	2.1 (1.0–6.2)	nd
Grande de San Pedro	21	<i>Dolichospermum</i> <i>Microcystis</i>	MC-RR, MC-YR, MC-LR	24%	158.4 (14.8–407.5)	nd
Lanahue	5	<i>Dolichospermum</i> <i>Microcystis</i>	MC-LR, MC-LA	60%	5.1 (2.6–7.5)	nd

* Only one detection.



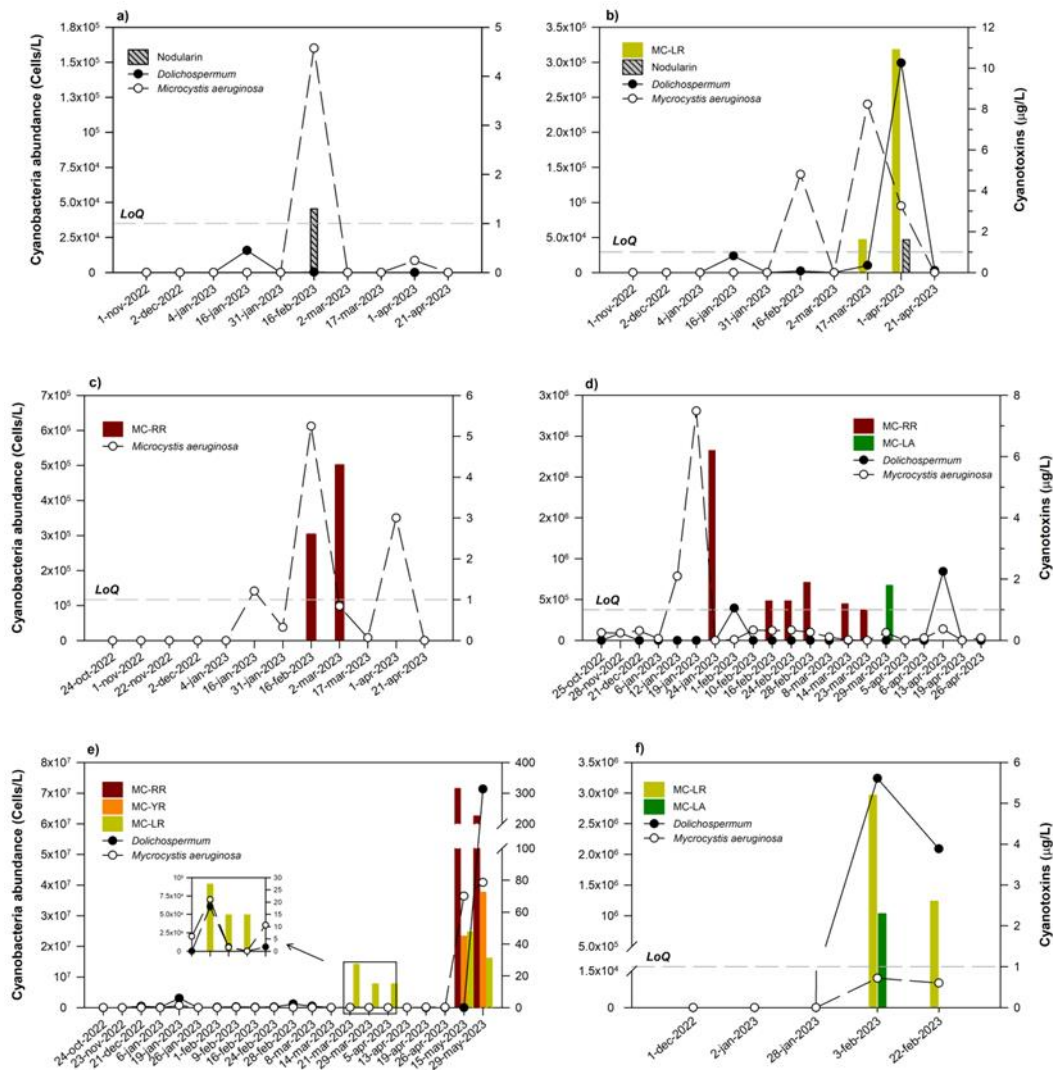


Figure 2. Abundance of cyanobacteria and concentration of cyanotoxins in (a) Torca, (b) Llico, (c) Vichuquén, (d) Lo Galindo, (e) Grande de San Pedro and (f) Lanalhue during October 2022 and May 2023.

Nodularin was only detected in Laguna Torca (February 2023) and Estero Llico (April 2023) with concentrations close to the limit of quantification (1.3 µg/L and 1.6 µg/L, respectively) (Figure 2a,b). Regarding microcystins, the most common and frequent conge-ner was MC-LR, which was present in Llico, Lo Galindo, Grande de San Pedro, and Lanalhue, representing 17% of positive detections among all sites and samples analyzed. MC-YR, on the other hand,

was the least common, being detected only in Laguna Grande de San Pedro. Regarding total microcystins, the highest concentration was detected in Laguna Grande de San Pedro during May 2023, with a value of 407.5 µg/L, while the low-est concentration was 1.0 µg/L detected in Llico and Lo Galindo (Table 3, Figure 2b,d,e).

Microcystin variants MC-RR, MC-YR, and MC-LR reached their highest values in Laguna Grande de San Pedro during May 2023, with concentrations of 315.3 µg/L, 72.3 µg/L, and 47.3 µg/L, respectively (Figure 2e). Meanwhile, MC-LA registered a maximum concentration of 2.3 µg/L in Lanalhue in February 2023 (Figure 2f). Although microcystins were also detected in Llico, Vichuquén and Lo Galindo, the recorded concentrations were <12 µg/L (Figure 2b–d).

Figure 3 shows the relationship between cyanobacteria abundance and the presence of microcystins. At low abundances (≤ 300.000 cells/L) of *M. aeruginosa* and *Dolichospermum*, the MC-LR and MC-LA variants were the most representative, with concentrations less than 30 µg/L. In contrast, at abundances greater than 1.0×10^7 Cel/L, the most representa-tive variants were MC-RR and MC-YR, with concentrations greater than 200 µg/L and 50 µg/L, respectively. However, it is also important to note that MC-LR was also detected at high abundances of *M. aeruginosa* and *Dolichospermum*, but its concentrations were less than 50 µg/L.

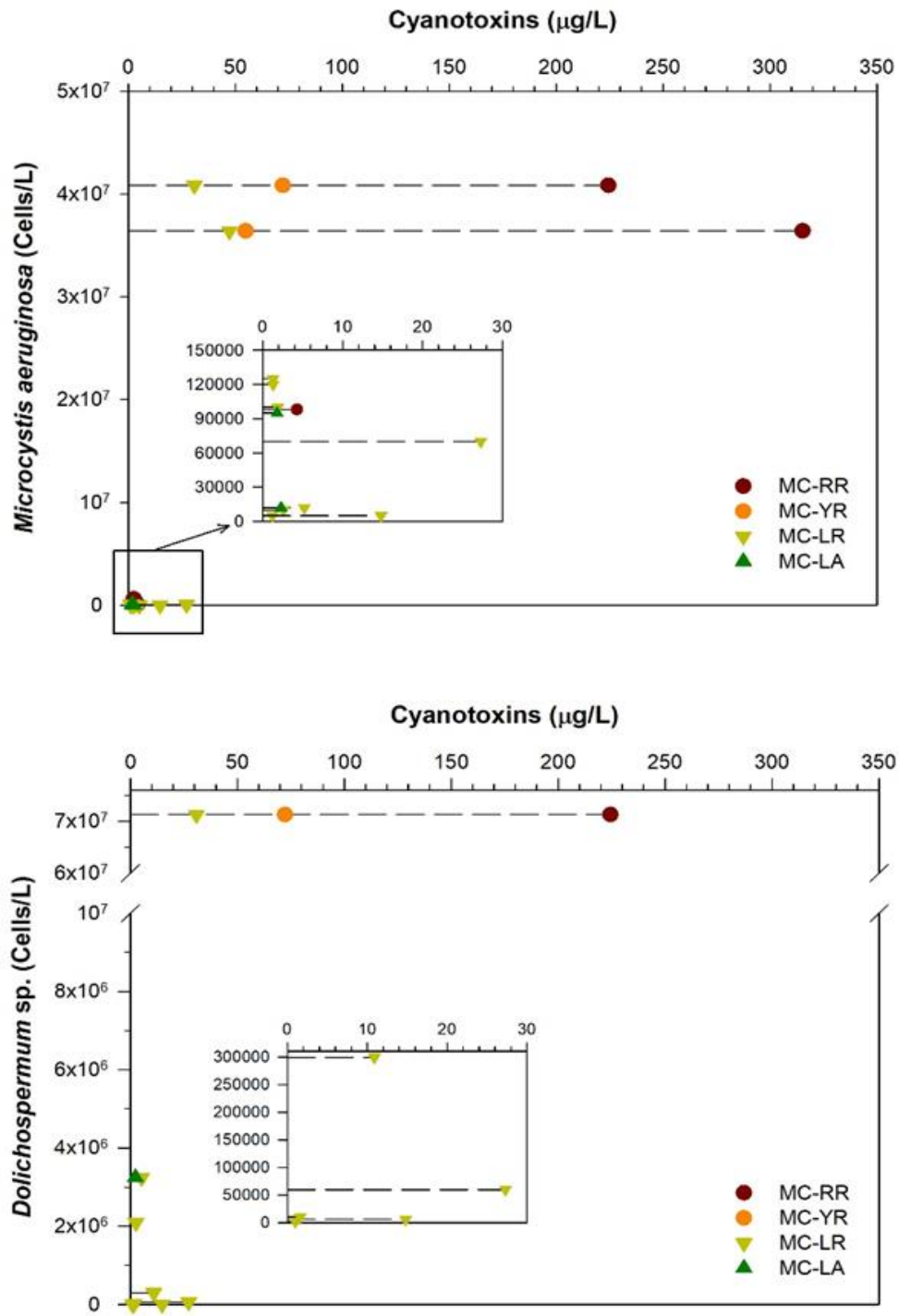


Figure 3. Relation between cyanobacteria and microcystins during the study period.

Correlation analysis revealed that the detected cyanotoxins were primarily associated with two environmental variables. Nodularin showed a positive correlation with electrical conductivity ($\rho = 0.40$; $p < 0.05$), whereas microcystins were negatively correlated with temperature, including MC-RR ($\rho = -0.10$; $p < 0.05$), MC-YR ($\rho = -0.50$; $p < 0.05$), and MC-LR ($\rho = -0.60$; $p < 0.05$) (Figure 4).

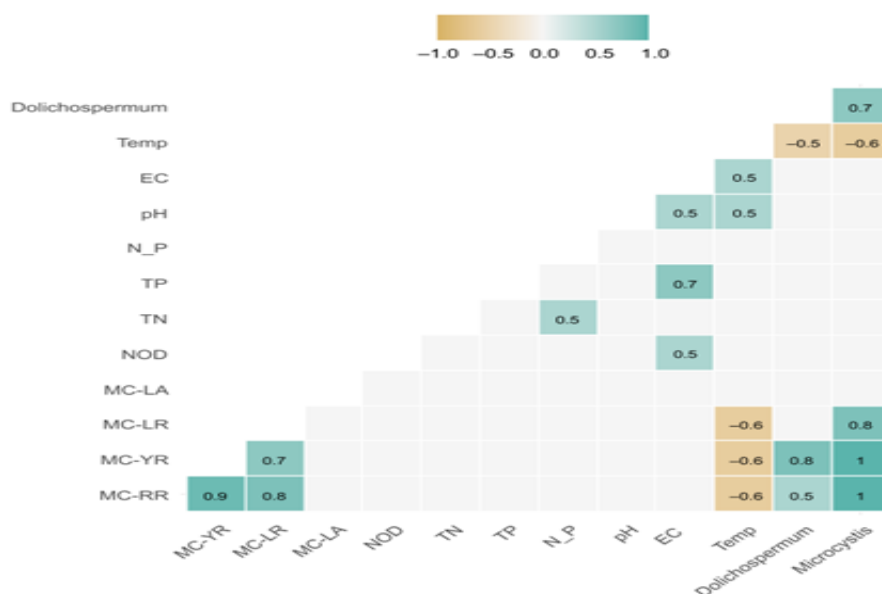


Figure 4. Spearman's rank correlogram between cyanotoxins, environmental variables and cyanobacteria abundance. Only correlations with a 95% confidence interval are shown. Color indicates if the correlation is positive (cyan) or negative (dark beige).

Principal Component Analysis (PCA) explained 57.7% of the total variance in the dataset. The first principal component (PC1) accounted for 39.58% of the variance and was positively associated with microcystins MC-LR, MC-YR, and MC-RR, and negatively associated with temperature and pH. In contrast, the second principal component (PC2), explaining 18.12% of the variance, was positively associated with electrical conductivity and nodularin (NOD), and negatively associated with the N:P ratio and microcystin MC-LA (Figure 5).

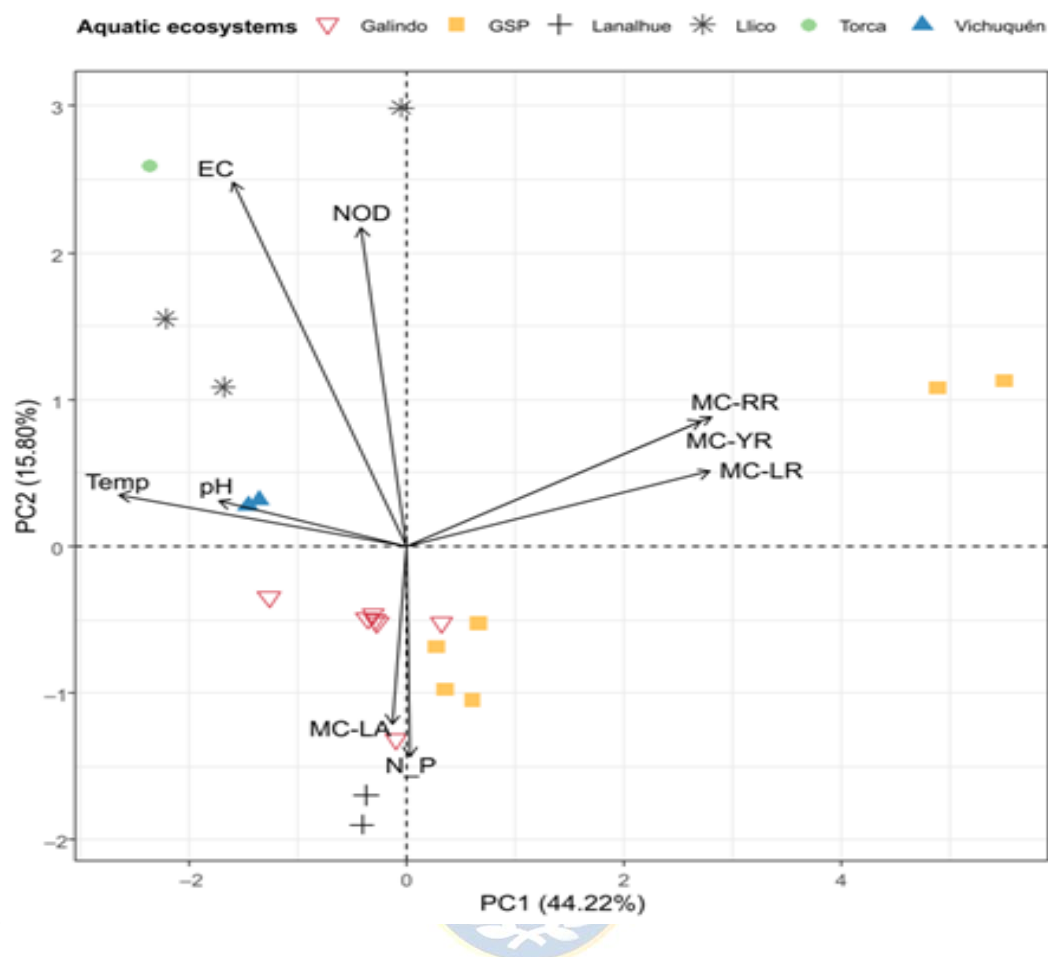


Figure 5. Principal components analysis biplot of environmental variables and cyanotoxins in the aquatic ecosystems.

4. Discussion

The spatiotemporal monitoring of the seven water bodies confirmed the presence of microcystin -type cyanotoxins (MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA) and nodularin (NOD) in six of them. Positive detections of these hepatotoxins varied seasonally among the sites. In Torca, Vichuquén, Galindo, and Lanalhue, they were recorded during the summer months; in Laguna Grande de San Pedro, in autumn; and in the Llico stream, detections occurred in both summer and autumn. The most frequent and abundant cyanobacteria were *Microcystis aeruginosa* and *Dolichospermum*; however, cyanotoxin concentration was not always directly related to cell number, as in some cases, cyanotoxins were detected at low abundance or even in their absence.

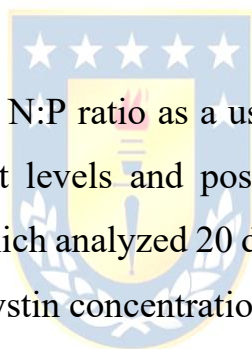
NOD was detected only in Torca and Llico. Both are bodies of water that registered conductivities typical of brackish environments (10,900–23,490 $\mu\text{S}/\text{cm}$). This result is consistent with what has been reported in the literature, since *Nodularia spumigena* Mertens ex Bornet and Flahault, the species that produces this cyanotoxin, mainly inhabits estuaries, oceans, inland saline lakes and coastal lakes [52–54]. Although this species was not found in the present study, in Llico and Torca, only the presence of *M. aeruginosa* and *Dolichospermum* was recorded. This coincides with what was reported by Campos, et al. [36] in the Los Aromos reservoir, where the presence of nodularin was evidenced in the absence of *N. spumigena* and the presence of *Microcystis* and *Anabaena* (currently *Dolichospermum*). The persistence of *Nodularia* in the water body is associated with the high chemical stability of the hepatotoxins [55,56]. Its cyclic structure gives it greater resistance to various degradation

processes, allowing it to persist in the water for days or weeks, even after the producing cyanobacterium is no longer present [8].

The microcystin congeners found in Torca, Llico, Vichuquén, Lo Galindo, Laguna Grande de San Pedro, and Lanalhue were likely generated by the cyanobacteria *Dolichospermum* and *M. aeruginosa*, which were dominant throughout the study period. This aligns with reports in the literature, as both genera have been described as common producers of these toxins [1,2,57]. Furthermore, consistent with findings reported by Chorus and Welker [8], Díez-Quijada, et al. [20], Chaffin, et al. [58], Svirčev, et al. [59], Loftin, et al. [60], for other lake ecosystems worldwide. However, recent studies have shown that the diversity and distribution of microcystin congeners in water can change systematically, depending on the cyanobacteria populations present and the environmental characteristics of the water column, as both factors tend to vary spatially and temporally [58,61,62]. In this context, several studies conducted in Chilean lake systems have shown variable results regarding the predominance of one or another microcystin variant [34,36,37,63].

In the specific case of Laguna Lo Galindo, a dominance of the MC-LR variant was detected, contrary to what was reported by Almanza, et al. [37], who, using the same methodology, found that the most frequent variant was MC-RR. One explanation for the differences found could be the location of the sampling sites; in the present study, the samples were collected from the shore, not in the center of the lake as in the study by Almanza, et al. [37]. This methodological discrepancy likely influenced the type of variant identified, its proportion, and concentration, given the different environmental characteristics of the two zones. During the summer period, Almanza, et al. [37] detected four variants

(MC-LR, MC-RR, MC-LA, and MC-YR) with concentrations ranging from <1 to 75 µg/L, whereas the present study detected only two variants (MC-LR and MC-LA), with concentrations below 6.5 µg/L in 35% of the samples. These low levels of microcystins found would be closely related to the number of cells counted, since in 90% of the samples, abundances of *M. aeruginosa* < 150,000 Cel/L were reported, which contrasts with that re-ported by Almanza, et al. [37], who obtained abundances that fluctuated between 500,000 and 1.5×10^6 Cel/L. Despite the differences found, both studies agree that the microcystin variants in Lo Galindo would be explained by the abundance of *M. aeruginosa*, a result that reinforces the association between this taxon and the production of these hepatotoxins.



Recent research addresses the N:P ratio as a useful tool for understanding the relationship between nutrient levels and positive cyanotoxin detections. A study by Barros, et al. [64], which analyzed 20 drinking water sources in Brazil, reported that positive micro-cystin concentrations are inversely associated with the N:P ratio. On the other hand, Orihel, et al. [65] reviewed microcystin results from 3474 analyses conducted in 246 water bodies in Canada, establishing that positive results for microcystin were recorded at N:P mass ratios below 23. This trend can also be observed in our study, with only two exceptions: February 2023 in Lake Lanalhue and March 2023 in Grande de San Pedro. Of the positive results for microcystins and nodularin in our study, 85% were associated with N:P ratios less than 50 and 70% with N:P ratios less than or equal to 25, showing an in-versely proportional relationship between positive detections of microcystin and the N:P ratio.

Our results reveal a complex interaction between trophic state and cyanotoxin production. Eutrophic systems are traditionally expected to have a higher toxic level; however, the finding of the highest concentration of total microcystins (407 $\mu\text{g/L}$) in the mesotrophic Laguna Grande de San Pedro contradicts this linear trend. Sidelev et al. (2024) [66] reported a similar phenomenon in the mesotrophic Lake Pleshcheyevo (Russia), where the presence of microcystins was detected alongside the *mcyE* gene involved in MC biosynthesis, associated with *Microcystis* and *Dolichospermum* species. These same species were identified in our study in Laguna Grande de San Pedro. This phenomenon suggests that mesotrophic systems in central Chile are experiencing incipient eutrophication processes where toxin dynamics can be more explosive than in chronically eutrophic systems.

On the other hand, the absence of toxins in the mesotrophic Laguna Avendaño underscores that trophic state alone does not guarantee the presence of cyanotoxins; rather, specific factors such as the N:P ratio act as critical regulators. As observed in our study, most positive detections were associated with N:P ratios below 25, supporting the hypothesis that the quality and proportion of nutrients, rather than their absolute quantity, define bloom toxicity in these ecosystems of central Chile. Similar results were reported in a time-series analysis of lakes in the United States by Harris et al. 2016 [67].

5. Conclusions

The cyanobacteria present in the studied water bodies produced cyanotoxins of the microcystin and nodularin types. All detected variants were equal to or greater than the limit established by the WHO for human consumption (MC-LR $< 1.0 \mu\text{g/L}$). However, only in three samples, all from the San Pedro reservoir, was the WHO guideline value for recre-ational waters exceeded (MCs $< 24 \mu\text{g/L}$). This confirms that the cyanobacteria present in the water bodies produced cyanotoxins. Although the cyanotoxin analysis focused on five calibrated congeners, this method does not guarantee the absence of other congeners, particularly microcystins. Therefore, future research requires the application of a multiclass method for the identification and quantification of microcystins (HPLC-MS) to determine the presence of other variants.

Furthermore, these results demonstrated that the concentrations detected in coastal areas pose a risk not only to drinking water supplies but also to recreational activities. Given this scenario, it is essential to develop spatiotemporal sampling designs that encompass the entire water surface in order to understand the dynamics of cyanotoxins and their relationship with environmental parameters. This will allow for the development of early warning plans and public policies aimed at protecting both people and the aquatic environment in Chile, where this issue is still in its early stages.

6. References

1. Huisman, J.; Codd, G.A.; Paerl, H.W.; Ibelings, B.W.; Verspagen, J.M.H.; Visser, P.M. Cyanobacterial blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018, 16, 471–483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>.
2. Paerl, H.W.; Fulton, R.S.; Moisander, P.H.; Dyble, J. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. *Sci. World J.* 2001, 1, 139109. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16>.
3. Reinl, K.L.; Brookes, J.D.; Carey, C.C.; Harris, T.D.; Ibelings, B.W.; Morales-Williams, A.M.; De Senerpont Domis, L.N.; Atkins, K.S.; Isles, P.D.F.; Mesman, J.P.; et al. Cyanobacterial blooms in oligotrophic lakes: Shifting the high-nutrient paradigm. *Freshw. Biol.* 2021, 66, 1846–1859. <https://doi.org/10.1111/fwb.13791>.
4. Nimptsch, J.; Woelfl, S.; Osorio, S.; Valenzuela, J.; Moreira, C.; Ramos, V.; Castelo-Branco, R.; Leão, P.N.; Vasconcelos, V. First record of toxins associated with cyanobacterial blooms in oligotrophic North Patagonian lakes of Chile—A genomic approach. *Int. Rev. Hydrobiol.* 2016, 101, 57–68. <https://doi.org/10.1002/iroh.201401780>.
5. Mantzouki, E.; Campbell, J.; van Loon, E.; Visser, P.; Konstantinou, I.; Antoniou, M.; Giuliani, G.; Machado-Vieira, D.; Gurjão de Oliveira, A.; Maronić, D.Š.; et al. A European Multi Lake Survey dataset of environmental variables, phytoplankton pigments and cyanotoxins. *Sci. Data* 2018, 5, 180226. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.226>.
6. Paerl, H.W.; Paul, V.J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 2012, 46, 1349–1363. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002>.
7. Carmichael, W.W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 2001, 7, 1393–1407. <https://doi.org/10.1080/20018091095087>.

8. Chorus, I.; Welker, M. (Eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2021. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>
9. Cerasino, L.; Capelli, C.; Salmaso, N. A comparative study of the metabolic profiles of common nuisance cyanobacteria in southern perialpine lakes. *Adv. Oceanogr. Limnol.* 2017, 8, 22–32.
10. Douglas Greene, S.B.; LeFevre, G.H.; Markfort, C.D. Improving the spatial and temporal monitoring of cyanotoxins in Iowa lakes using a multiscale and multi-modal monitoring approach. *Sci. Total Environ.* 2021, 760, 143327. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143327>.
11. Kaloudis, T.; Hiskia, A.; Triantis, T.M. Cyanotoxins in bloom: Ever-increasing occurrence and global distribution of freshwater cyanotoxins from planktic and benthic cyanobacteria. *Toxins* 2022, 14, 264.
12. van Apeldoorn, M.E.; van Egmond, H.P.; Speijers, G.J.A.; Bakker, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 7–60. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185>.
13. Filatova, D.; Picardo, M.; Núñez, O.; Farré, M. Analysis, levels and seasonal variation of cyanotoxins in freshwater ecosystems. *Trends Environ. Anal. Chem.* 2020, 26, e00091. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00091>.
14. Pham, T.-L.; Utsumi, M. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *J. Environ. Manag.* 2018, 213, 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.077>.
15. Vezie, C.; Brient, L.; Sivonen, K.; Bertru, G.; Lefeuvre, J.C.; Salkinoja-Salonen, M. Variation of Microcystin Content of Cyano-bacterial Blooms and Isolated Strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microb. Ecol.* 1998, 35, 126–135. <https://doi.org/10.1007/s002489900067>.

16. Souza Passos, L.; Costa de Almeida, É.; Villela, A.; Nunes Fernandes, A.; Manzi Marinho, M.; Carvalho Gomes, L.; Pinto, E. Cyanotoxins and water quality parameters as risk assessment indicators for aquatic life in reservoirs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022, 241, 113828. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113828>.
17. Jones, M.R.; Pinto, E.; Torres, M.A.; Dörr, F.; Mazur-Marzec, H.; Szubert, K.; Tartaglione, L.; Dell'Aversano, C.; Miles, C.O.; Beach, D.G.; et al. CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Res.* 2021, 196, 117017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117017>.
18. Meriluoto, J.; Spoof, L.; Codd, G.A. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2017.
19. Funari, E.; Testai, E. Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 2008, 38, 97–125. <https://doi.org/10.1080/10408440701749454>.
20. Díez-Quijada, L.; Prieto, A.I.; Guzmán-Guillén, R.; Jos, A.; Cameán, A.M. Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. *Food Chem. Toxicol.* 2019, 125, 106–132. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.042>.
21. Mantzouki, E.; Lüring, M.; Fastner, J.; de Senerpont Domis, L.; Wilk-Woźniak, E.; Koreivienė, J.; Seelen, L.; Teurlinx, S.; Ver-stijnen, Y.; Krztoń, W. Temperature effects explain continental scale distribution of cyanobacterial toxins. *Toxins* 2018, 10, 156.
22. dos Santos Silva, R.D.; Severiano, J.S.; de Oliveira, D.A.; Mendes, C.F.; Barbosa, V.V.; Chia, M.A.; de Lucena Barbosa, J.E. Spa-tio-temporal variation of cyanobacteria and cyanotoxins in public supply reservoirs of the semi-arid region of Brazil. *J. Limnol.* 2020, 79, 1893.
23. Pawlik-Skowronska, B.; Toporowska, M. How to mitigate cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in eutrophic water reservoirs? *Hydrobiologia* 2016, 778, 45–59. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2842-3>.

24. Walls, J.T.; Wyatt, K.H.; Doll, J.C.; Rubenstein, E.M.; Rober, A.R. Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. *Sci. Total Environ.* 2018, 610–611, 786–795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.149>.
25. Ferrão-Filho, A.d.S.; Kozłowsky-Suzuki, B. Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Mar. Drugs* 2011, 9, 2729–2772.
26. Christensen, V.G.; Stelzer, E.A.; Eikenberry, B.C.; Olds, H.T.; LeDuc, J.F.; Maki, R.P.; Saley, A.M.; Norland, J.; Khan, E. Cyanotoxin mixture models: Relating environmental variables and toxin co-occurrence to human exposure risk. *J. Hazard. Mater.* 2021, 415, 125560. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125560>.
27. Falfushynska, H.; Kasianchuk, N.; Siemens, E.; Henao, E.; Rzymiski, P. A Review of Common Cyanotoxins and Their Effects on Fish. *Toxics* 2023, 11, 118.
28. Jeon, Y.; Struewing, I.; McIntosh, K.; Tidd, M.; Webb, L.; Ryu, H.; Mash, H.; Lu, J. Spatial and Temporal Variability of Saxitoxin-Producing Cyanobacteria in U.S. Urban Lakes. *Toxins* 2024, 16, 70.
29. Moraes, M.A.B.; Rodrigues, R.A.M.; Schlüter, L.; Podduturi, R.; Jørgensen, N.O.G.; Calijuri, M.C. Influence of Environmental Factors on Occurrence of Cyanobacteria and Abundance of Saxitoxin-Producing Cyanobacteria in a Subtropical Drinking Water Reservoir in Brazil. *Water* 2021, 13, 1716. <https://doi.org/10.3390/w13121716>.
30. Rinta-Kanto, J.M.; Konopko, E.A.; DeBruyn, J.M.; Bourbonniere, R.A.; Boyer, G.L.; Wilhelm, S.W. Lake Erie Microcystis: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae* 2009, 8, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.12.004>.
31. Srivastava, A.; Choi, G.-G.; Ahn, C.-Y.; Oh, H.-M.; Ravi, A.K.; Asthana, R.K. Dynamics of microcystin production and quantification of potentially toxigenic *Microcystis* sp. using real-time PCR. *Water Res.* 2012, 46, 817–827. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.056>.

32. Almanza, V.; Pedreros, P.; Dail Laughinghouse, H.; Félez, J.; Parra, O.; Azócar, M.; Urrutia, R. Association between trophic state, watershed use, and blooms of cyanobacteria in south-central Chile. *Limnologica* 2019, 75, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2018.11.004>.
33. Campos, V.; Lisperguer, S.; Weckesser, J.; Vera, A.; Muñoz, D. Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile. *Bol. Micol.* 2005, 20, 73–81.
34. Neumann, U.; Campos, V.; Cantarero, S.; Urrutia, H.; Heinze, R.; Weckesser, J.; Erhard, M. Co-Occurrence of Non-toxic (Cy-anopeptolin) and Toxic (Microcystin) Peptides in a Bloom of *Microcystis* sp. from a Chilean Lake. *Syst. Appl. Microbiol.* 2000, 23, 191–197. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80004-1).
35. Parra, O.; Valdovinos, C.; Urrutia, R.; Cisternas, M.; Habit, E.; Mardones, M. Caracterización y tendencias tróficas de cinco lagos costeros de Chile Central. *Limnetica* 2003, 22, 51–83.
36. Campos, V.; Muñoz, D.; Straube, M.; Lisperguer, S.; Weckesser, J. Péptidos tóxicos y no tóxicos de cianobacterias en cuerpos de agua dulce de la V Región, Chile. *Bol. Micol.* 2007, 22, 95–100.
37. Almanza, V.; Parra, O.; De, M.; Bicudo, C.E.; Baeza, C.; Beltran, J.; Figueroa, R.; Urrutia, R. Occurrence of toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in a central Chilean (36 Lat. S) urban lake. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 2016, 89, 8.
38. Masson-Delmotte, V.; Zhai, P.; Pirani, A.; Connors, S.L.; Péan, C.; Berger, S.; Caud, N.; Chen, Y.; Goldfarb, L.; Gomis, M. Climate change 2021: The physical science basis. *Contrib. Work. Group I Sixth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.* 2021, 2, 2391.
39. Pedreros, P.; Torrejón, F.; Álvarez, D.; Urrutia, R. Reconstruyendo la degradación ambiental del Lago Vichuquén, Región del Maule, Chile, mediante el uso de registros históricos-documentales. *Hist. Ambient. Latinoam. Caribena* 2019, 19, 149–177.

40. American Public Health Association; American Water Works Association; Federation, W.E. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed.; Lipps, W.C., Braun-Howland, E.B., Baxter, T.E., Eds.; APHA Press: Washington, DC, USA, 2023.
41. Utermöhl, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte. Limnologie* 1958, 9, 1–38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>.
42. Parra, O.; González, M.; Dellarossa, V.; Rivera, P.; Orellana, M. Manual Taxonómico del Fitoplancton de Aguas Continentales con Especial Referencia al Fitoplancton de Chile. I. Cyanophyceae; Editorial Universidad de Concepción: Concepción, Chile, 1982.
43. Komárek, J.; Kaštovský, J.; Mareš, J.; Johansen, J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 2014, 86, 295–335.
44. Komárek, J. Cyanoprokaryota—3. Teil/3rd Part: Heterocystous Genera; Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Schagerl, M., Eds.; Springer Spektrum: Berlin, Germany, 2013; Volume 19/3.
45. Komárek, J.; Anagnostidis, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales; Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D., Eds.; Gustav Fisher Verlag: Berlin, Germany, 1999.
46. Komárek, J.; Anagnostidis, K. Cyanoprokaryota—2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales; Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; Spektrum: Berlin, Germany, 2005; Volume 19/2.
47. Guiry, M.D.; Guiry, G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication. 2025. Available online: <https://www.algaebase.org> (accessed on).

48. ISO 20179: 2005; Water Quality—Determination of Microcystins—Method Using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) Detection. ISO: Geneva, Switzerland, 2005.
49. Meriluoto, J. Chromatography of microcystins. *Anal. Chim. Acta* 1997, 352, 277–298. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00131-1).
50. Spoof, L.; Neffling, M.-R.; Meriluoto, J. Separation of microcystins and nodularins by ultra performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 3822–3830. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.09.028>.
51. Yu, Y.; Xu, J.; Liu, Y.; Qiao, S.; Chen, Y. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of nodularin-R in human plasma and its preliminary clinical application. *Clin. Chim. Acta* 2012, 413, 894–900. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.039>.
52. McGregor, G.B.; Stewart, I.; Sendall, B.C.; Sadler, R.; Reardon, K.; Carter, S.; Wruck, D.; Wickramasinghe, W. First Report of a Toxic *Nodularia spumigena* (Nostocales/Cyanobacteria) Bloom in Sub-Tropical Australia. I. Phycological and Public Health Investigations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2012, 9, 2396–2411.
53. Akcaalan, R.; Mazur-Marzec, H.; Zalewska, A.; Albay, M. Phenotypic and toxicological characterization of toxic *Nodularia spumigena* from a freshwater lake in Turkey. *Harmful Algae* 2009, 8, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.06.007>.
54. da Silveira, S.B.; Wasielesky, W.; Andreote, A.P.D.; Fiore, M.F.; Odebrecht, C. Morphology, phylogeny, growth rate and nodularin production of *Nodularia spumigena* from Brazil. *Mar. Biol. Res.* 2017, 13, 1095–1107.
55. Harada, K.-i.; Tsuji, K.; Watanabe, M.F.; Kondo, F. Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* 1996, 35, 83–88. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6S-83.1>.

56. Jones, G.J.; Orr, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* 1994, 28, 871–876. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90093-0).
57. Paerl, H.W.; Otten, T.G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb. Ecol.* 2013, 65, 995–1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>.
58. Chaffin, J.D.; Mishra, S.; Kane, D.D.; Bade, D.L.; Stanislawczyk, K.; Slodysko, K.N.; Jones, K.W.; Parker, E.M.; Fox, E.L. Cyanobacterial blooms in the central basin of Lake Erie: Potentials for cyanotoxins and environmental drivers. *J. Great Lakes Res.* 2019, 45, 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.12.006>.
59. Svirčev, Z.; Lalić, D.; Bojadžija Savić, G.; Tokodi, N.; Drobac Backović, D.; Chen, L.; Meriluoto, J.; Codd, G.A. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch. Toxicol.* 2019, 93, 2429–2481. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>.
60. Loftin, K.A.; Graham, J.L.; Hilborn, E.D.; Lehmann, S.C.; Meyer, M.T.; Dietze, J.E.; Griffith, C.B. Cyanotoxins in inland lakes of the United States: Occurrence and potential recreational health risks in the EPA National Lakes Assessment 2007. *Harmful Algae* 2016, 56, 77–90.
61. Maliaka, V.; Lürling, M.; Fritz, C.; Verstijnen, Y.J.; Faassen, E.J.; Van Oosterhout, F.; Smolders, A.J. Interannual and spatial variability of cyanotoxins in the Prespa lake area, Greece. *Water* 2021, 13, 357.
62. Taranu, Z.E.; Pick, F.R.; Creed, I.F.; Zastepa, A.; Watson, S.B. Meteorological and Nutrient Conditions Influence Microcystin Congeners in Freshwaters. *Toxins* 2019, 11, 620.

63. Campos, V.; Cantarero, S.; Urrutia, H.; Heinze, R.; Wirsing, B.; Neumann, U.; Weckesser, J. Microcystin in Cyanobacterial Blooms in a Chilean Lake. *Syst. Appl. Microbiol.* 1999, 22, 169–173. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80062-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80062-9).
64. Barros, M.U.G.; Wilson, A.E.; Leitão, J.I.R.; Pereira, S.P.; Buley, R.P.; Fernandez-Figueroa, E.G.; Capelo-Neto, J. Environmental factors associated with toxic cyanobacterial blooms across 20 drinking water reservoirs in a semi-arid region of Brazil. *Harmful Algae* 2019, 86, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.05.006>.
65. Orihel, D.M.; Bird, D.F.; Brylinsky, M.; Chen, H.; Donald, D.B.; Huang, D.Y.; Giani, A.; Kinniburgh, D.; Kling, H.; Kotak, B.G.; et al. High microcystin concentrations occur only at low nitrogen-to-phosphorus ratios in nutrient-rich Canadian lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2012, 69, 1457–1462. <https://doi.org/10.1139/f2012-088>.
66. Sidelev, S.I., Korneva, L.G., Chernova, E.N.; Sakharova, E.G. First Data on Cyanotoxins and Genes of Their Biosynthesis in the Phytoplankton of the Mesotrophic Lake Pleshcheyevo (Russia) during the Bloom Formation of Cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*. *Inland Water Biol.* 2024, 17, 1161–1171. <https://doi.org/10.1134/S1995082924700688>.
67. T. D. Harris, V. H. Smith, J. L. Graham, D. B. V. de Waal, L. P. Tedesco, and N. A. Clercin, “Combined effects of nitrogen to phosphorus ratios and nitrogen speciation on cyanobacterial metabolite concentrations in eutrophic Midwestern USA reservoirs,” *Inland Waters*, vol. 6, no. 2, pp. 199–210, Aug. 2016, doi: 10.5268/IW-6.2.938

7. Conclusion general

El estudio realizado confirma de manera robusta la presencia generalizada de cianotoxinas, principalmente microcistinas y, en menor medida nodularina, en sistemas lacustres del centro-sur de Chile, evidenciando que este fenómeno no es puntual ni restringido a condiciones extremas de eutrofización, sino que forma parte de la dinámica actual de múltiples cuerpos de agua.

Un resultado importante fue que las microcistinas fueron detectadas en la mayoría de los sistemas estudiados, con predominio de la variante MC-LR, reconocida por su alta toxicidad, consistente con lo documentado en la literatura a nivel internacional. Destaca particularmente la Laguna Grande de San Pedro, donde se registraron concentraciones máximas de hasta 407,5 µg/L, valores que exceden ampliamente los umbrales internacionales establecidos para aguas recreacionales y de consumo humano.

Otro aspecto relevante fue que la presencia de cianotoxinas no mostró una correlación directa con la abundancia de cianobacterias, lo que refuerza la hipótesis de que la toxicidad de un sistema no puede explicarse únicamente a partir de la biomasa fitoplanctónica. En contraste, se identificó una asociación más consistente con la presencia de bajas relaciones N:P, lo que sugiere que la dinámica de nutrientes juega un rol clave en la regulación de la producción de toxinas.

Un hallazgo importante fue que los resultados demuestran que los sistemas mesotróficos (Laguna Grande de San Pedro) también pueden presentar concentraciones elevadas de cianotoxinas, desafiando el paradigma tradicional que vincula el riesgo exclusivamente a condiciones eutróficas. Aunque la hipótesis de trabajo sugería que el riesgo toxicológico estaría asociado principalmente al aumento de floraciones en sistemas eutróficos, el hallazgo de concentraciones máximas de microcistinas (407,5 µg/L) en la Laguna Grande de San Pedro, un sistema clasificado como mesotrófico, obliga a una reformulación de este paradigma. Este comportamiento 'atípico' sugiere que los sistemas mesotróficos en el centro-sur de Chile podrían estar experimentando procesos de eutrofización incipiente, donde la dinámica de nutrientes y el historial de uso de suelo en la cuenca permiten eventos de toxicidad más explosivos que en sistemas crónicamente eutróficos. Este hallazgo también se ha demostrado en estudios internacionales lo que posiciona a los lagos mesotróficos como fuentes emergentes de exposición a cianotoxinas.

Resulta notable la ausencia total de cianotoxinas en la Laguna Avendaño, a pesar de la presencia confirmada de los géneros *Dolichospermum* y *Microcystis*. Este hallazgo subraya que el estado trófico y la presencia del género no son determinantes absolutos de la toxicidad, sugiriendo que las poblaciones de esta laguna podrían estar dominadas por cepas no toxigénicas o que las condiciones abióticas específicas del sistema no favorecen la expresión de los genes de síntesis de toxinas, sin embargo, es necesario considerar también la posibilidad de que si exista la presencia de cianotoxinas distintas a las calibradas y sea esa la causa de la no detección. Desde una perspectiva metodológica, el uso de HPLC-DAD para el análisis de cianotoxinas permitió una caracterización más

precisa del perfil toxicológico, evidenciando la importancia de avanzar desde enfoques simplificados hacia estrategias analíticas integrales que consideren múltiples variantes de toxinas. El caso de Laguna Avendaño es justamente, un buen ejemplo de la necesidad de implementar otras estrategias instrumentales en las cuales se pueda evaluar la presencia de un amplio número de congéneres, sin depender de la limitante asociada a la disponibilidad de estándares puros.

En conjunto esta tesis demostró que la presencia de cianotoxinas en lagos de Chile es un fenómeno real que se ha extendido y que no debe ser subestimado. Los resultados son un buen inicio en la generación de información crítica asociada a la presencia de estas toxinas en los cuerpos de agua, sin embargo, es indispensable profundizar en los factores que determinan la expresión de cepas toxigénicas, integrando, por ejemplo, enfoques moleculares y ecológicos, así como también monitoreos a largo plazo, que permitan detectar la variabilidad de cada uno de los factores involucrados en estos procesos y evaluar la sinergia entre ellos.

Por último, una estrategia de investigación a futuro debe necesariamente incluir información que permita establecer una base sólida para el desarrollo de estrategias de monitoreo, regulación y mitigación frente a un problema que, bajo escenarios de cambio global, tenderá a intensificarse.