



**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas**  
**Ingeniería en Biotecnología Marina y Acuicultura**

**DETERMINACIÓN DE LA COMUNICACIÓN MEDIANTE QUORUM SENSING EN  
CIANOBACTERIAS FORMADORAS DE FLORACIONES.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Marina y Acuicultura.

POR: Gabino Franco Gómez Inzunza  
Profesora Guía: Dra. Katherine Elizabeth Sossa Fernandez

Abril, 2024  
Concepción, Chile

**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas**

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Profesora guía

**Dra. Katherine Sossa Fernández**

Universidad de Concepción

Concepción

Profesora co-guía

**Dra. Viviana Almanza Marroquín**

Concepción

Profesores evaluadores

**Dra. Allisson Astuya Villalón**

Universidad de Concepción

Concepción

**Dr. Fernando Cruzat Cruzat**

Universidad de Concepción

Concepción

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Yolanda y Gavino, que a pesar del desafío de venir a estudiar de tan lejos siempre creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente en cada momento que viví en el transcurso de la carrera.

A mis hermanas, Lía y Valentina que a pesar de las distancias siempre sacaban una sonrisa con sus mensajes y fotografías desde donde quiera que estuvieran, haciendo que su presencia fuera más cercana.

A mi polola, Javiera, por creer en mí, por su paciencia infinita y siempre tener esa frase en el momento adecuado para subirme el ánimo en mis momentos más difíciles, recordándome la importancia de perseguir mis sueños y nunca rendirme. A su familia por recibirme, aconsejarme y apoyarme cada vez que lo necesité.

A mi profesora guía Dra. Katherine Sossa por aceptarme como su alumno y hacerme parte de este proyecto.

Al profesor Dr. Fernando Cruzat por aceptarme en su laboratorio, por invitarme a ese primer partido de fútbol y hacer que mi paso por la carrera haya sido mucho más entretenido.

A la profesora Dra. Alisson Astuya por guiarme y aceptarme en su laboratorio para poder llevar cabo este tema de investigación, y también por creer en mí desde el primer año de carrera.

A mi familia, amigos y todas esas personas que he conocido durante estos años, todo lo que he aprendido no sólo proviene de libros y estudios de clases, sino también de las conversaciones, intercambios de idea y momentos compartidos.

Al laboratorio de Biotoxinas de la Universidad de Concepción (LBTx).

Al laboratorio de Toxicología acuática.

Al Laboratorio de Fitoplancton y Fitobentos del Centro de Ciencias Ambientales EULA, Universidad de Concepción.

Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

**Financiamiento:** Proyecto VRID multidisciplinaria, UDEC N° 2021000367MUL “¿El sistema de Quorum Sensing podría estar involucrado en el inicio de una floración algal nociva (FAN)?”.

## TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN.....	9
2 HIPÓTESIS.....	23
3 OBJETIVO GENERAL.....	24
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 Cianobacterias, cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	25
5.1.1 Cepas de cianobacterias.....	25
5.1.2 Preparación medio de cultivo de cianobacterias .....	25
5.1.3 Aislamiento para cianobacterias .....	27
5.1.4 Condiciones de cultivo de cianobacterias .....	28
5.1.5 Caracterización de microcistina para <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	28
5.2 Cultivo de cepas bacterianas.....	29
5.2.1 Cepas bacterianas.....	29
5.2.2 Condiciones de cultivo bacteriano .....	29
5.3 Extracción ADN .....	30
5.4 Identificación molecular para las especies de cianobacterias.....	33
5.5 Identificación molecular de genes de Quorum Sensing para cianobacterias. ....	33
5.6 Screening de producción de autoinductores de cianobacterias.....	35
5.6.1 Medio de cultivo para <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4.....	35
5.6.2 Extracción de sobrenadante de caldos de cultivos. ....	35
5.6.3 Montaje de experimento .....	36
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
6.1 Cianobacterias productoras de floraciones.....	37
6.2 Caracterización de microcistina en <i>M. aeruginosa</i> y Nostocales.....	46
6.3 Extracción de ADN.....	47
6.4 Amplificación PCR convencional para el gen ADNr 16S.....	50
6.5 Identificación de genes Quorum Sensing en cianobacterias.....	52
6.6 Screening de la producción de autoinductores por cianobacterias utilizando <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4) .....	57
6.7 Recomendaciones futuras.....	63
7 CONCLUSIÓN .....	64
8 BIBLIOGRAFÍA .....	65

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cepas biosensoras de autoinductores AHL. ....	19
<b>Tabla 3:</b> Composición y cantidad de soluciones madres para medio ASM-1.....	26
<b>Tabla 4:</b> Partidores y condiciones utilizadas para la amplificación de genes de Quorum Sensing... 34	
<b>Tabla 5:</b> Cuantificación de extracción de ADN en espectrofotómetro NanoDrop 1000. ....	48
<b>Tabla 6:</b> Respuesta del ensayo con la cepa receptora <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4) del sobrenadante de cianobacterias en sensidiscos. ....	61

## INDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1:</b> Materiales para la extracción de DNA en la etapa de lisis celular.....	32
<b>Figura 2:</b> Fotografía de cultivo de células del orden Nostocales a 100X de aumento. ....	37
<b>Figura 3:</b> Figura de distribución y posición de heterocistos y aquinetos en microorganismos filamentosos.....	38
<b>Figura 4:</b> Fotografías de cultivo de <i>Synechococcus</i> sp.....	40
<b>Figura 5:</b> Esquema de células de <i>Synechococcus</i> sp. ....	42
<b>Figura 6:</b> Esquema de Colonias de <i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing 1866. (Extraída de Komárek & Komárková, 2002).....	43
<b>Figura 7:</b> Fotografías de cultivos <i>M. aeruginosa</i> .....	44
<b>Figura 8:</b> Fotografías de células de cf. <i>Chlamydomonas</i> sp.....	45
<b>Figura 9:</b> Electroforesis gel de agarosa en muestras de Nostocales amplificada por PCR del gen <i>mcyB</i> . MPM 1kb: Marcador de peso molecular. Carril 2-5 muestras de Nostocales. C-: control negativo. ....	46
No se observó banda de amplificación para el gen <i>mcyB</i> .....	46
<b>Figura 10:</b> Ilustración del grupo de genes de síntesis de microcistina ( <i>mcy</i> ).....	47
<b>Figura 11:</b> Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de muestras de cianobacterias y bacterias control. ....	49
<b>Figura 12:</b> Electroforesis en gel de agarosa del gen ADNr 16S amplificado por PCR.....	51
<b>Figura 13:</b> Electroforesis en gel de agarosa de LuxS amplificada por PCR.....	52
<b>Figura 14:</b> Gráficos de curva de qPCR y curva de melting para gen LuxS.....	54
<b>Figura 15:</b> Electroforesis en gel de agarosa del gen LuxI (IQS6-1 y IQS10-1) amplificado por PCR..	55
<b>Figura 16:</b> Gráficos de qPCR y curva de melting para gen LuxI. ....	56
<b>Figura 17:</b> Placa biosensora probando controles de cepas bacterianas ( <i>S. aureus</i> , <i>Serratia</i> sp, <i>P. syringae</i> y <i>E. coli</i> ). ....	58
<b>Figura 18:</b> Fotografías de la actividad de AHL de cadena larga con sobrenadante de cianobacterias. ....	60

## RESUMEN

Las cianobacterias son microorganismos procariotas capaces de sobrevivir a condiciones extremas. El éxito de estos microorganismos no se atribuye a una sola característica, sino a varias propiedades intrínsecas de este grupo en conjunto con factores ambientales. Son productoras de una variedad de metabolitos, entre los cuales están las cianotoxinas, como microcistinas y saxitoxinas. En ciertas condiciones son capaces de formar floraciones de cianobacterias nocivas que afectan negativamente a los ecosistemas y a la salud humana. Se tienen registro de estos eventos en Chile desde 1980, mostrando un aumento significativo en la actualidad. Existe evidencia que sugieren que las cianobacterias podrían emplear mecanismos de comunicación Quorum Sensing (QS), tradicionalmente asociados solo a bacterias. Se ha identificado que ciertas cepas de cianobacterias responden a moléculas autoinducidas Acil-homoserina lactonas (AHL). Estudios recientes se centran en la evaluación de la expresión génica en *Microcystis aeruginosa* y su relación con los genes 16S, luxS y mcy $\beta$ . Otro antecedente identificó la presencia de una nueva molécula AHL en *M. aeruginosa* que estaría involucrado en la eficiencia fotosintética, en la agregación celular y producción de microcistina-LR. La propuesta de este estudio tiene como objetivo evaluar la presencia de elementos asociados al mecanismo de comunicación Quorum Sensing en cultivos de cianobacterias identificadas taxonómicamente. Los resultados obtenidos mostraron dificultades en la identificación de genes asociado a Quorum Sensing con partidores sintetizados para bacterias, principalmente en la especificidad y sensibilidad para amplificar el fragmento esperado. Se amplificó fragmentos asociados al gen LuxS, correspondiente a *M. aeruginosa*. Se evaluó además la producción de autoinductores mediante ensayos con la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 utilizando sobrenadantes de cultivos de cianobacterias del orden Nostocales y género *Synechococcus* sp., obteniendo una respuesta de presencia de autoinductores acil homoserina lactona en las muestras correspondientes al orden Nostocales. En conclusión, esta investigación abre nuevas perspectivas en el estudio de la regulación del comportamiento celular en cianobacterias y su impacto en los ecosistemas acuáticos.

## ABSTRACT

Cyanobacteria are prokaryotic micro-organisms capable of surviving extreme conditions. The success of these micro-organisms is not attributed to a single characteristic, but to several intrinsic properties of this group in conjunction with environmental factors. They are producers of a variety of metabolites, including cyanotoxins such as microcystins and saxitoxins. Under certain conditions they are capable of forming harmful cyanobacterial blooms that negatively affect ecosystems and human health. These events have been recorded in Chile since 1980, showing a significant increase at present. There is evidence to suggest that cyanobacteria may employ Quorum Sensing (QS) communication mechanisms, traditionally associated only with bacteria. Certain strains of cyanobacteria have been identified as responding to self-inducible acyl-homoserine lactone (AHL) molecules. Recent studies focus on the evaluation of gene expression in *Microcystis aeruginosa* and its relationship with the *16S*, *luxS* and *mcy $\beta$*  genes. Another background identified the presence of a novel AHL molecule in *M. aeruginosa* that would be involved in photosynthetic efficiency, cell aggregation and microcystin-LR production. The aim of this study is to evaluate elements associated with the Quorum Sensing communication mechanism in taxonomically identified cyanobacterial cultures. The results obtained showed difficulties in the identification of genes associated with Quorum Sensing with bacterially synthesised primers, mainly in the specificity and sensitivity to amplify the expected fragment. Fragments associated with the *LuxS* gene, corresponding to *M. aeruginosa*, were amplified. The production of autoinducers was also evaluated by means of assays with the biosensor strain *A. tumefaciens* NTL4 using culture supernatants of cyanobacteria of the order Nostocales and the genus *Synechococcus* sp., obtaining a response of the presence of acyl homoserine lactone autoinducers in the samples corresponding to the order Nostocales. In conclusion, this research opens new perspectives in the study of the regulation of cell behaviour in cyanobacteria and its impact on aquatic ecosystems.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cianobacterias

Uno de los grupos de microorganismos más antiguos del planeta son las cianobacterias. Se les conoce como los primeros organismos fotosintéticos con una estimación de más de 3.500 millones de años a través de registros fósiles (UNESCO, 2009). El éxito de las cianobacterias no se atribuye a una sola característica, sino a varias propiedades intrínsecas de este grupo, en conjunto con factores ambientales, que propician el desarrollo de estas como el hecho de ser el único grupo fitoplanctónico capaz de fijar nitrógeno, controlar la flotabilidad y acumular grandes cantidades de fósforo, entre otros (Pereira,2014).

Presentan características compartidas tanto con las bacterias como no poseer núcleo ni organelos (procariotas), tienen pared celular tipo Gram negativas, se reproducen por fisión binaria, como con las algas, ya que, tienen tilacoides con fotosistemas I y II, realizan fotosíntesis con liberación de O<sub>2</sub> y tienen clorofila-a (Giannuzzi et al., 2011), por lo que se destacan por tener una fisiología distintiva y una sorprendente capacidad para sobrevivir en condiciones extremas. Esta diversidad incluye varios niveles de organización que presentan organismos unicelulares en tamaños desde las 2-20 µm, con filamentos pluricelulares o colonias que sobrepasan las 500 µm, estos filamentos pueden ser rectos o ramificados (Giannuzzi et al., 2011).

La morfología de las cianobacterias puede ser aún más compleja. En algunas especies pueden presentar células diferenciadas como heterocistos que cumplen la función de fijar nitrógeno atmosférico, se pueden desarrollar células de resistencia (acinetes o acinetos) que contienen alta acumulación de reserva capaces de germinar o reconstituirse en condiciones de estrés ambiental (Oliver & Ganf, 2000).

Las cianobacterias también son capaces de producir una serie de pigmentos fotosintéticos, como la ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina, y diversos carotenoides dándole coloraciones incluso de rojo, marrón o rosa, cumpliendo la función de proteger de altas intensidades lumínicas, sin embargo, la característica principal es la presencia de clorofila-a que da su coloración verde-azul y le da la función de realizar la fotosíntesis aeróbica (Zamora et al., 2023). Se tienen clasificado más de 2000 compuestos metabólicos secundarios en las cianobacterias (Carmichael et al., 2001; Jones et al., 2021), por lo que atraen la atención de los investigadores para su aplicación biotecnológica en las industrias de producción alimentaria, cosmética, agroquímica y farmacéutica (Liu et al., 2016). Como por ejemplo *Arthrospira* sp. que es producida a escala industrial para su uso como complemento alimenticio (Spirulina) (Grewe & Pulz, 2012). Otro ejemplo, recientemente se ha propuesto el potencial uso de *Cyanobium* sp. por la producción de carotenoides y ficobiliproteínas para la industria cosmética (Pagels et al., 2023).

Entre la gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos se destacan las denominadas cianotoxinas, por su efecto adverso al ecosistema y a la salud humana (Zamora et al., 2023). Estas cianotoxinas se pueden clasificar por su estructura química: en péptidos, alcaloides y lipopolisacáridos cíclicos (LPS), o bien por sus efectos tóxicos: hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas (Whitton & Potts, 2012). Las toxinas se presentan generalmente como mezclas de análogos estructurales del mismo tipo de toxina. Así, por ejemplo, se han descrito más de 90 microcistinas (MCs) conocidas y varios análogos de saxitoxinas (STXs) (Andrinolo et al., 2017). Estos tipos de análogos son reconocidos bajo el plural de la toxina tipo y cada cepa de algas o floración no expresa todas las variantes posibles sino unas pocas de ellas. Además, se tiene registro que existen cepas o floraciones en los que coexisten grupo de toxinas diferentes (ej. MCs y STXs), generando sinergia en los efectos tóxicos de estas mezclas complejas (UNESCO, 2009).

Las hepatotoxinas como las microcistinas son heptapeptidos cíclicos que provocan el colapso de la organización tisular hepática, necrosis y hemorragia intra-hepática (Zamora et al., 2023), es capaz de inhibir la fosfatasa proteica tipo 1 y 2A impidiendo su actividad normal llevando a una acumulación de grupos fosfato en las proteínas objetivo, llegando incluso a que la ingesta de altas concentraciones genera la muerte de animales y/o efectos acumulativos crónicos, como la inducción de formación de tumores hepáticos (Chorus & Bartram, 1999).

Las neurotoxinas producidas por cianobacterias tienen como función afectar a los receptores de acetil colina y los canales de sodio, lo que lleva bloqueos neuromusculares y otros efectos nocivos. Entre las neurotoxinas se encuentran la anatoxina-a, la homoanatoxina-a y las saxitoxinas (Cox et al., 2005). Existe una posible asociación entre el aminoácido neurotóxico B-N-metilamino-Lalanina (BMAA) producido por gran variedad de cianobacterias y el desarrollo de esclerosis lateral amiotrófica (Cox et al., 2005), contribuyendo al desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa. Las dermatotoxinas, como lipopolisacáridos (LPS), son endotoxinas pirogénicas, capaces de producir irritaciones en la piel, efectos gastrointestinales y alergias (Giannuzzi et al., 2011).

## **1.2 Floraciones de cianobacterias nocivas (CianoHABs)**

Este grupo de microorganismos se pueden encontrar en una gran variedad de hábitats acuáticos y terrestres. Son capaces de acelerar de manera significativa su población en un tiempo relativamente corto (Loaiza-González et al., 2023). Algunas especies provocan efectos adversos en la calidad del agua, estas se denominan: floraciones de algas nocivas, “CianoFAN” o CianoHAB” (Zamora et al., 2023).

Estos eventos, son impulsados significativamente por dos factores principales: El incremento en la disponibilidad de nutrientes y el aumento de las temperaturas a

nivel global (Bonilla et al., 2023; Huisman et al., 2018; Ming et al., 2022). El enriquecimiento de nutrientes en los cuerpos de agua, a menudo resultado de la escorrentía agrícola, la descarga de aguas residuales y otras fuentes de contaminación (Huisman et al., 2018), proporciona a las cianobacterias los recursos necesarios para su crecimiento acelerado. Paralelamente, el calentamiento global a elevado las temperaturas de los cuerpos de agua, creando condiciones óptimas para que estos microorganismos se reproduzcan (Kosten et al., 2012; Paerl & Huisman, 2009). Combinados estos dos factores, crean el entorno perfecto para que se produzcan estas floraciones de cianobacterias nocivas (CianoHABs), alterando los ecosistemas acuáticos y planteando desafíos significativos para la salud pública y la gestión del agua (Huisman et al., 2018).

Algunos ejemplos de la presencia de cianoHABs se observan cuando se genera aumentos de biomasa, y se va acumulando materia orgánica, llegando a cambiar la coloración de las aguas a un color verde brillante o azul verdoso o disminuyendo la transparencia superficial del agua perturbando a la vegetación sumergida (Zamora et al., 2023). También se puede ver afectado el ámbito turístico y la utilización de estos cuerpos de agua como reservorio debido a la producción de compuestos organolépticos volátiles (geosmina y 2-metilisoborneol) que si bien no son tóxicos para los humanos interfieren con la percepción de higiene y salud pública afectando también al sector económico (Smith et al., 2008). Sin embargo, el principal motivo de preocupación de las cianoHABs y/o FANs es su capacidad de producir toxinas. Así, la alta biomasa concentrada en las floraciones sumada a la presencia de cianotoxinas representa un problema para otros organismos del medio acuático incluso para el ser humano (UNESCO, 2009).

### **1.3 Antecedentes de presencia de toxinas producidas por cianobacterias**

Se tienen antecedentes sobre intoxicaciones en población humana en países como Australia, Inglaterra, China, Sudáfrica y en Latinoamérica como fue el caso de la

ciudad de Caruaru (Brasil) donde cerca de 130 personas llegaron a centros de salud con problemas renales crónicos asociados a una grave hepatotoxicidad de los cuales 60 fallecieron posterior al inicio de los síntomas (Giannuzzi et al., 2011). En Chile existen solo registro de eventos de mortalidad de peces, como en el año 1985 en la laguna Redonda, región del Biobío, donde se produjo la mortalidad de cientos de peces nativos debido a altas concentraciones de microcistinas encontradas en el agua (Almanza et al., 2016b), reduciendo significativamente la abundancia de la población de especies nativas. Es probable que se hayan presentado más casos de muerte de peces a lo largo del tiempo, sin embargo, artículos científicos resaltan que esta información se encuentra fragmentada o limitada a ecosistemas o cuencas específicas (Aguilera et al., 2023). Hasta el momento no existe información respecto a intoxicaciones asociadas a microcistinas en agua potable y/o contacto con aguas recreativas en Chile (Almanza et al., 2019), sin embargo, si se han reportado aparición de olor y/o sabor en el agua en distintas regiones del país impactando en el uso de espacios recreativos, recursos pesqueros y significativos incrementos en los costos de tratamientos del agua destinada a consumo humano (Giannuzzi et al., 2011).

A lo largo del tiempo, especialmente en la década de 1980, en Chile se tiene informado de la presencia de cianobacterias capaces de producir toxinas desde la II a la X región, incluyendo la Metropolitana en cuerpos de agua dulce (Almanza et al., 2016b; Beltrán et al.). Hoy en día, se ha observado un aumento en los registros de casi 40 informes de floraciones de cianobacterias entre los años 2010 y 2018 (Aguilera et al., 2023), siguiendo la tendencia mundial del aumento en la frecuencia y la distribución de las floraciones de cianobacterias (Paerl, 2014). La comunidad científica apunta a que el crecimiento de la población humana, el desarrollo urbanístico y el aumento en el uso de aguas con fines industriales y agrícolas ha causado mayor presión sobre la disponibilidad y calidad en los recursos hídricos (Almanza et al., 2016a) lo que la hace una preocupación a nivel mundial.

Los aportes derivados de la actividad antrópica son la principal causa del aumento en la eutrofización. El aporte de una carga de fósforo y/o nitrógeno a una tasa mayor que el sistema acuático puede procesar, es el principal desencadenante de un estado eutrófico (Bonilla et al., 2023). El origen es diverso, pero los aportes puntuales son los desechos orgánicos urbanos, domésticos e industriales y aportes de desechos inorgánicos proveniente de la actividad agrícola-ganadera (como las aguas residuales, fertilizantes, compuestos orgánicos sólidos) (Kalf, 2002).

Es evidente que es necesario disminuir la contaminación de los cuerpos de agua y la restauración de estas, por lo mismo es que es de suma importancia desarrollar métodos de control para combatir el crecimiento de las cianobacterias y/o comprender y predecir la toxicidad potencial de las cianobacterias para anticiparse a los cambios de la dinámica de la biodiversidad.

#### **1.4 Quorum Sensing (QS)**

En la dinámica de la ecología del fitoplancton sigue siendo un misterio por qué algunas especies logran formar grandes poblaciones y otras no, sobre todo cuando son de especies consideradas productoras de FAN. La principal hipótesis es que los compuestos tóxicos que liberan se deben a la competencia de nutrientes o mecanismo de defensa frente a otras especies, logrando así inhibir el crecimiento de estas o bien de matar a sus depredadores (Brown et al., 2019).

Estas interacciones específicas entre especies (alelopatía) son un factor importante tanto para la competencia de recursos en el fitoplancton como para el seguimiento y formación de floraciones algales nocivas, sin embargo, sigue siendo procesos poco conocidos (Chorus et al., 2021).

Asimismo, la producción de moléculas químicas para la interacción entre organismos es un mecanismo ampliamente extendido en los seres vivos. Estas señales varían entre especies, donde incluso algunas especies pueden interpretar muchas señales diferentes, mientras que otros responden a pocas o más específicas. Existe un mecanismo ampliamente estudiado y más común entre los microorganismos que es el Quorum Sensing (QS), el cual depende de la densidad celular a través de la producción de moléculas de señalización química denominadas autoinductores (Fuqua et al., 1994).

La unión y la cooperación de los microorganismos en diferentes circunstancias para adaptarse, coexistir y reproducirse construyen un mecanismo de defensa contra condiciones no deseadas (Bakaraki et al., 2016). El QS es un sistema de comunicación por el que los microorganismos expresan cierto fenotipo en alta densidad de su población mediante señales químicas. Las poblaciones microbianas son capaces de sincronizarse a una determinada densidad celular, coordinando la expresión génica (Fuqua et al., 1994). A medida que una comunidad microbiana crece, los organismos individualmente sintetizan y secretan moléculas de Quorum Sensing (autoinductores) en el entorno extracelular, siendo la concentración de moléculas de señalización directamente proporcional con la densidad de la población microbiana (Bandara et al., 2012). Cuando la molécula autoinductora alcanza una concentración crítica, los microorganismos perciben la concentración de la señal extracelular y regulan la expresión de sus genes diana que pueden conducir a sincronizar funciones determinadas en una población (Stock et al., 2020).

Existen diferentes tipos de clasificación en el mecanismo de Quorum Sensing, se puede dividir por categorías de señalización: Intraespecífica, interespecífica y entre reino (Bandara et al., 2012); como también según la molécula de señalización que produzca:

- **Acil-homoserina lactona (AHL o HSL, AI-1)** descrita ampliamente para bacterias Gram-negativas,
- **Péptidos autoinductores (AIP)** que se tiene registros en bacterias Gram-positivas,
- **Señal de autoinductor-2 (AI-2)** que se puede presentar en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas sintetizados por el gen luxS,
- **Señal de quinolona (PQS) y AI-3** que se tiene descrita para producción de factores de virulencia en *P. aeruginosa* donde se ha descrito que para desencadenar Quorum Sensing es necesario un mínimo de tres autoinductores diferentes (Turan et al., 2017).

El mecanismo regulado por Acil homoserina lactona (AHL) o Quorum Sensing tipo 1 se ha identificado ampliamente en bacterias Gram-negativas como las cianobacterias. Este tipo de comunicación fue evidenciado en la bacteria *Vibrio fischeri* que demostró la regulación de bioluminiscencia a través de una sustancia denominada autoinductor (Nealson et al., 1970). Esta regula el complejo LuxI/LuxR activando la transcripción del operón luxCDABEGH resultando en la producción de luciferasa, enzima que cataliza una reacción química que produce bioluminiscencia (Parker & Sperandio, 2009). A partir de este descubrimiento se estableció un circuito básico en la mayoría de las bacterias Gram-negativas.

La molécula autoinductora está asociada principalmente con la señalización intraespecífica en los microorganismos Gram-negativos, dando como resultado que sólo los miembros de la misma especie reconocen y responden a una AHL (Jayaraman & Wood, 2008). Los autoinductores AHL se pueden clasificar según su longitud como de cadena corta o larga, dependiendo de la longitud de los grupos acilos; las AHL de cadena corta tienen de 4-8 átomos de carbono en el grupo acilo, mientras que las AHL de cadena larga tienen de 10-18 carbonos. La tercera posición de carbono puede o no estar modificada (grupo carbonilo, grupo hidroxilo o reducido totalmente) (Rosselló & Bouza, 2013).

Además, se debe tener en cuenta que existen ciertos criterios para que un autoinductor se considere como señal de QS:

1. La producción de la señal debe llevarse a cabo durante etapas específicas de crecimiento, o en respuesta particular a cambios ambientales.
2. La señal de QS debe poder acumularse en el ambiente extracelular y reconocida por los microorganismos receptores.
3. La acumulación de la señal de QS por encima de un umbral crítico de concentración debe estimular una respuesta.
4. La respuesta celular debe extenderse más allá de cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o detoxificar la molécula.

Para llevar a cabo este circuito de Quorum Sensing tipo 1 se tiene de cuatro componentes principales: Una señal sintasa de tipo luxI (AHL sintasa), molécula autoinductora (AHL's), un receptor de señal tipo LuxR y el gen o genes diana (Chhabra et al., 2005). En un comienzo la señal autoinductora AHL se sintetiza a un nivel bajo por LuxI. A su vez, LuxI y sus homólogos transfieren una cadena de ácido graso de una proteína acil-portadora a S-adenosilmetionina (SAM), sintetizando la AHL correspondiente y la metiltioadenosina, produciendo señales de AHL específicas para cada género y especie mediante el reconocimiento de proteínas transportadoras de acil-acil específicas y la transferencia de diferentes ácidos grasos a SAM (Parker & Sperandio, 2009). Posteriormente, el autoinductor (AHL) se difunde a través de la membrana bacteriana y se libera al medio, y debido a que cada bacteria produce esta molécula individualmente, la concentración de AHL en el medio circundante aumentará a medida que crece la población (Chhabra et al., 2005). Cuando la densidad de población alcanza un umbral crítico y la concentración de AHL a su vez es suficientemente alta, la molécula autoinductora vuelve a ingresar a las células, y dentro de la célula, la AHL se une a la proteína receptora LuxR, específicamente a su dominio amino terminal (Schauder &

Bassler, 2001). Esta unión de AHL-LuxR desencadena un cambio conformacional en LuxR, permitiendo que su dominio carboxi-terminal se una a las regiones promotoras de los genes diana, activando la transcripción de genes específicos controlados por LuxR (Bandara et al., 2012).

El Quorum Sensing es responsable de la mediación de una amplia variedad de comportamientos sociales interactivos en el mundo microbiano, sobre todo la virulencia, la maduración de biopelículas, el desarrollo de cuerpo fructíferos y la esporulación, resistencia a los antibióticos, bioluminiscencia, producción de antibióticos, transferencia de plásmidos, entre otras (Fuqua et al., 1994; Rosselló & Bouza, 2013).

### **1.5 Biosensores para determinar la producción de moléculas señal**

Desde que se descubrieron las Acil-homoserina lactonas (AHL) como moléculas señalizadoras claves en el Quorum Sensing, se ha desarrollado diversos métodos para detectar y analizar la presencia y estructura de estas moléculas (Chhabra et al., 2005). Uno de los primeros indicadores de la existencia de regulación genética mediada por QS en bacterias es la observación de ciertos fenotipos (producción de antibióticos o exoproteasas) que ocurren en función de la densidad poblacional celular y el aumento de la expresión de estos fenotipos tras la adición de sobrenadantes de cultivos ya utilizados, como fuentes potenciales de AHL (Steindler & Venturi, 2007).

Para la detección de AHL, se han creado diversas cepas biosensoras. Estos biosensores no producen AHL y contienen una proteína funcional de la familia LuxR clonada junto con un promotor objetivo afín (normalmente el promotor de la LuxI sintasa afín) (Chhabra et al., 2005; Steindler & Venturi, 2007). Esta configuración permite que la proteína luxR, al unirse a las AHL presentes, active la transcripción del gen reportero bajo el control del promotor afín, dando como resultado cambios

fenotípicos detectables, como emisión de luz (bioluminiscencia), expresión de  $\beta$ galactosidasa o producción de pigmentos (Steindler & Venturi, 2007; Wang et al., 2011). En la siguiente tabla se pueden observar algunas cepas biosensoras, con el tipo de sistema Quorum Sensing y los autoinductores detectables:

**Tabla 1:** Cepas biosensoras de autoinductores AHL.

Cepa biosensora	Sistema QS	Autoinductores detectables	Referencia
<i>Escherichia coli</i> (pSB536)	LasI/LasR	C <sub>4</sub> -AHL	Winson, Swift, Fish, et al. (1998)
<i>Chromobacterium violaceum</i> (CV026)	Cvii/R	C <sub>4</sub> -AHL, C <sub>6</sub> -3-oxo-AHL y C <sub>8</sub> -AHL	McClellan et al. (1997)
<i>Escherichia coli</i> (pSB401)	LuxI/R	C <sub>6</sub> -AHL, C <sub>8</sub> -3-oxo-AHL y C <sub>8</sub> -AHL	Winson, Swift, Hill, et al. (1998)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 o NTL4 (pZLR4)	Tral/R	C <sub>6</sub> -AHL hasta C <sub>12</sub> -AHL, incluyendo derivados 3oxo	Shaw et al. (1997)
<i>Escherichia coli</i> (pSB1075)	LasI/R	C <sub>12</sub> -3-oxo-AHL, C <sub>10</sub> -3-oxoAHL y C <sub>12</sub> -AHL	Winson, Swift, Fish, et al. (1998)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (KYC55)	Tral/R	C <sub>4</sub> -AHL hasta C <sub>18</sub> -AHL, incluyendo sustitutos hidroxilo y oxo	Zhu et al. (2002)

Las cepas mutantes más clásicas para la detección de AHLs son *Chromobacterium violaceum* CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4). En *A. tumefaciens* NTL4 se encuentra unido el gen lacZ a uno de los genes del operón tra (traG::lacZ) que codifica la transferencia de plásmidos en esta bacteria. Este operón se induce en presencia de autoinductores (AHL) exógenos y el sustrato X-gal, haciendo que produzca una coloración azul. Esta bacteria detecta moléculas AHL de cadena media y larga (Tabla 1).

Los métodos basados en biosensores son técnicas biológicas populares para la detección de AHL debido a su facilidad de realización y bajo costo, presentan una alta sensibilidad a bajas concentraciones de AHL y proporciona una respuesta biológica directa (Rodríguez González, 2022). Sin embargo, las cepas biosensoras no son capaces de detectar todas las variantes de AHL (Tabla 1), además pueden verse afectados los resultados por factores ambientales. Por otra parte, no pueden proporcionar una identificación y cuantificación precisa del autoinductor como otros métodos de detección (Cromatografía o Espectrometría de masas (LC-MS/MS)) (Chhabra et al., 2005; Wang et al., 2011).

### **1.6 Quorum Sensing en cianobacterias**

Si bien este mecanismo se ha estudiado ampliamente para la población bacteriana, recientes estudios mencionan que este modelo de comunicación podría extenderse para el grupo de las diatomeas y cianobacterias (Herrera & Echeverri, 2021; Yang et al., 2016). El año 2008 lograron identificar que el género de cianobacteria *Gloeoteche* tenía un sistema de comunicación Quorum Sensing mediado por la producción de una molécula autoinductora C8-AHL (Sharif et al., 2008). Para las cianobacterias productoras de floraciones existe limitados antecedentes sobre la posible presencia de Quorum Sensing. Una primera aproximación en muestras de la cepa *Microcystis aeruginosa* PCC7820 identifico una posible molécula AHL a través de Cromatografía líquida-espectrometría de masa (LS-MS) con una unidad  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$  en la cadena alquílica que estaría involucrada en la formación de membranas similares a biopelículas (Zhai et al., 2012).

Además, se ha logrado dar indicios que las cianobacterias responden de cierta manera a los componentes de Quorum Sensing tipo 1 (Tabla 2). Por ejemplo, un estudio evaluó la respuesta de diferentes moléculas autoinductoras sintéticas (9 tipos de AHL) para inducir la proliferación celular y también la síntesis de toxinas

(microcistina para *Microcystis aeruginosa* y saxitoxina para *Cylindrospermopsis raciborskii*), obteniendo respuestas específicas y selectivas dependiendo del tratamiento que se utilizó (Herrera & Echeverri, 2021).

Otro antecedente evaluó la expresión génica de *M. aeruginosa* y su relación con el crecimiento celular, la producción de microcistinas y el mecanismo Quorum Sensing, utilizando los genes 16S, LuxS y mcy $\beta$ . Los resultados obtenidos sugieren que la expresión del gen LuxS y el crecimiento de *M. aeruginosa* se correlacionan, ya que, el gen LuxS se presenta durante toda la duración del experimento, además también hubo una relación entre el gen de mcy $\beta$  y la producción de microcistina aumentando su expresión en la fase logarítmica del crecimiento celular, además se demostró que la adición del tratamiento por AHL influyo en la expresión del mcy $\beta$  reduciendo su expresión (Lamas-Samanamud et al., 2023).

Estudios más recientes encontraron evidencia que considera la presencia de una nueva molécula AHL en *M. aeruginosa*, con una fórmula  $C_{13}H_{19}O_8N$  que estaría involucrado en la eficiencia fotosintética, en la agregación celular y en la producción de microcistina-LR (Xu et al., 2024).

**Tabla 2:** Antecedentes de cianobacterias asociadas a componentes de comunicación Quorum Sensing.

Espece o cepa	Genes descritos	Identificación o inducción de autoinductor	Referencia
Gloeothece PCC6909	—	C <sub>8</sub> -AHL	(Sharif et al., 2008)
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7820	—	CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> -CO en la cadena alquílica	(Zhai et al., 2012)
<i>Microcystis wesenbergii</i>	—	Positivo a biosensor <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	(Bachofen & Schenk, 1998)
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806	LuxS	—	(Lamas-Samanamud et al., 2023)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	—	3-oxo-C <sub>10</sub> AHL, 3oxo-C <sub>10</sub> AHL, C <sub>6</sub> AHL, C <sub>10</sub> AHL, C <sub>7</sub> AHL, C <sub>12</sub> AHL, C <sub>8</sub> AHL, 3-oxoC <sub>8</sub> AHL, C <sub>4</sub> AHL	(Herrera & Echeverri, 2021)
<i>Microcystis aeruginosa</i>			
<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	—	(C <sub>4</sub> , OC <sub>4</sub> y OHC <sub>4</sub> -AHL), (C <sub>10</sub> , OC <sub>10</sub> y OHC <sub>10</sub> -AHL) y (C <sub>12</sub> , OC <sub>12</sub> y OHC <sub>12</sub> -AHL)	(Romero et al., 2011)
<i>M. aeruginosa</i> FACHB 905	—	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub> N	(Xu et al., 2024)

En definitiva, existe información que sugiere que las cianobacterias presenten patrones de comunicación muy similares a las bacterias, sin embargo, no hay suficientes antecedentes que lo demuestren.

## **2 HIPÓTESIS**

Las cianobacterias productoras de floraciones son capaces de sintetizar moléculas autoinductoras del tipo Acil-homoserina lactona (AHL).

### **3 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar moléculas del mecanismo de comunicación Quorum Sensing en cianobacterias productoras de floraciones.

### **4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aislar e identificar cepas de cianobacterias productoras de floraciones.
2. Determinar la presencia potencial de genes de Quorum Sensing en cianobacterias productoras de floraciones.
3. Determinar la presencia de las moléculas autoinductoras del tipo Acilhomoserina lactona (AHL) en las cepas de cianobacterias seleccionadas.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cianobacterias, cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

#### 5.1.1 Cepas de cianobacterias

Para los experimentos se utilizaron muestras de agua ambientales extraídas de lagunas de la región del Biobío, comuna de Concepción. Recolectadas por el Laboratorio de Fitoplancton y Fitobentos del centro EULA de la Universidad de Concepción. Mediante el uso de microscopio óptico ZEISS West Germany se identificaron morfológicamente las muestras. Específicamente, con el objetivo 20x se realizó la búsqueda de las colonias y 40x para la identificación taxonómica de diferentes géneros de cianobacterias para poder aislar y posteriormente cultivar. Además, fue necesario medir las dimensiones del microorganismo (largo, ancho) y promediar al menos 10 células vegetativas, heterocistos y aquinetos para la identificación.

#### 5.1.2 Preparación medio de cultivo de cianobacterias

El medio de cultivo utilizado fue ASM-1, para preparar medio de cultivo normalmente se realiza en tres etapas:

- Las soluciones que componen el medio se deben preparar a una concentración 100:1, suficiente para una duración de 12 meses en la cual se deben mantener a una temperatura de 4 °C (soluciones madres).
- A partir de estas soluciones madres se prepara el medio concentrado que rinde 20 litros aproximadamente de medio para uso inmediato.
- Finalizando por la preparación del medio de uso inmediato, donde se descongela el medio concentrado y se diluye con agua desionizada.

Se debe preparar 4 soluciones madres (stock A, stock B, stock C, stock D) para poder conformar el medio concentrado, cada solución stock debe ser diluida en 1000 mL de agua desionizada. Además, debido a que tendremos cianobacterias que son fijadores de nitrógeno prepararemos una solución madre A sin nitrógeno (Tabla 3).

**Tabla 3:** Composición y cantidad de soluciones madres para medio ASM-1.

Solución madre	Nutrientes	Cantidad (g)
Solución A (+N)	NaNO <sub>3</sub> (nitrato de sodio)	8,5
	MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O (sulfato de magnesio)	2,45
	MgCl <sub>2</sub> + 7H <sub>2</sub> O (cloruro de magnesio)	2,05
	CaCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O (cloruro de calcio dihidratado)	1,45
Solución A (-N)	MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O (sulfato de magnesio)	2,45
	MgCl <sub>2</sub> + 7H <sub>2</sub> O (cloruro de magnesio)	2,05
	CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O (cloruro de calcio dihidratado)	1,45
Solución B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (fosfato potásico) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 12H <sub>2</sub> O (fosfato de hidrogeno disódico dodecahidratado)	8,7 17,8
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (ácido bórico)	28,4
Solución C	MnCl <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub> O (cloruro de manganeso (II) tetrahidratado)	13,9
	FeCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O (cloruro de hierro (III) hexahidratado)	10,8
	ZnCl <sub>2</sub> (cloruro de zinc)	3,35
	CoCl <sub>2</sub> +6H <sub>2</sub> O (cloruro de cobalto (II))	0,19
	CuCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O (Cloruro de cobre (II))	0,0140
Solución D	EDTA + ti tríplex	18,6

Además, para mejorar el aislamiento, se suplemento el medio de cultivo con cicloheximida, la cual presenta actividad antifúngica inhibiendo la síntesis proteica en células eucariotas. La cantidad de cicloheximida según Jacinavicius et al. (2013), es de 50 mg/L, la cual se diluyó en agua desionizada autoclavada preparando un stock de 20 mg/mL y se utilizó adicionándola al medio de cultivo. Se debe tener presente que la actividad de la cicloheximida disminuye a una temperatura superior a 50°C.

### 5.1.3 Aislamiento para cianobacterias

Una vez identificados morfológicamente los géneros de cianobacterias se procedió a ejecutar los protocolos de aislamiento según lo descrito por Jacinavicius et al. (2013). Se procedió a realizar una siembra de diluciones seriadas de cuatro tubos de ensayo en medio de cultivo ASM-1 (+N o -N) que se describe más adelante. En el primer tubo de ensayo se agregaron 1 mL de muestra más 3 mL de medio de cultivo, se homogenizó y al segundo tubo se le añadió 1 mL del primer tubo y se diluyó en 3 mL de medio de cultivo, así sucesivamente. De esta manera se diluyen las diferentes especies de microorganismos presentes en la muestra de agua. Luego de 14 días aproximadamente, cuando se obtiene un incremento en la biomasa se procedió a realizar un traspaso a placa desde los tubos de ensayos de las cepas de interés. Se prepara el medio de cultivo ASM-1 (con o sin nitrógeno) con cicloheximida y agar al 1% en placas de Petri. Con ayuda de una pipeta Pasteur se homogenizó la muestra y se inoculó con 2 gotitas en cada placa, luego con un asa bacteriológica se distribuyeron uniformemente en zigzag cubriendo toda la placa, y finalmente se sella con Parafilm y se deja en la incubadora. En paralelo se cultivan en placa de 6 pocillo por duplicado las cepas de interés, un pocillo contiene 2,5 mL de medio de cultivo y 0,5 mL de inóculo, el otro pocillo contiene 2 mL de medio de cultivo y 1 mL de inóculo.

Transcurrido 2-3 semanas de incubación se observa bajo microscopio las colonias de interés, si aún no es posible aislar las cepas se repite hasta lograr el aislamiento.

Los cultivos en placas se repiten para generar biomasa en medio sólido y los cultivos en placa de 6 pocillos se utiliza para escalar en matraces de 100 y 250 mL.

#### 5.1.4 Condiciones de cultivo de cianobacterias

Los cultivos se mantienen en una cámara de incubación con fotoperiodo de 18:6 (luz: oscuridad), a una temperatura de 25°C, sin aireación y una irradiancia de 100  $\mu\text{mol}$ .

Para escalar la biomasa se realizó utilizando cultivos en medio solido, en el cual se utilizó 1-2 gotas del caldo de cultivo para distribuirlos homogéneamente en Placa Petri. Para cultivo en medio Liquido se utilizaron matraces de 100mL se adicionó 24mL de medio de cultivo y 1mL de inoculo y en matraces de 250mL se añadió 145mL de medio de cultivo y 5mL de inoculo.

El tiempo de cultivo para generar biomasa en *Microcystis aeruginosa*, Nostocales fueron de 30 días y para *Synechococcus* 14 días.

#### 5.1.5 Caracterización de microcistina para *Microcystis aeruginosa*

Se realizó un ensayo con kit para la determinación de microcistina mediante la metodología de ELISA. La muestra de *Microcystis aeruginosa* se sometió a 3 ciclos de congelado-descongelado con el fin de lisar las células para liberar las toxinas y posteriormente se siguieron las indicaciones del fabricante (Almanza Marroquín, 2016a). Adicionalmente, se evaluó la presencia del gen *mcyB* de microcistina en Nostocales, por lo que se utilizaron los partidores Forward (5'-3') CCTACCGAGCGCTTGGG y Reverse (5'-3')

GAAAATCCCCTAAAGATTCCTGAGT con tamaño de fragmento de 78 pb. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 59 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos (Carmo Bittencourt-Oliveira, 2003). Para esto se utilizó el equipo Termociclador Biometra TOne.

## **5.2 Cultivo de cepas bacterianas**

### 5.2.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

Las cepas que se utilizaron fueron: *Escherichia coli*, *Serratia* sp., *Pseudomonas syringae*, *Staphylococcus aureus* y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, las cuales se mantuvieron en medio de cultivo LB, en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 25 °C ± 1 °C.

### 5.2.2 Condiciones de cultivo bacteriano

Es importante señalar que cada preparación de cultivo o de soluciones para el medio de cultivo se realizó en una cámara de flujo laminar y un mechero. Antes de usar la cámara se esterilizó durante 15 min con luz UV y se limpió el lugar de trabajo con alcohol 70%.

El medio de cultivo utilizado fue medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L), siguiendo las instrucciones del fabricante, se disolvieron 25 g en 1000 mL de agua purificada, homogenizando el caldo y posteriormente se sometió a autoclave para esterilizar.

Para los experimentos las bacterias se prepararon de la siguiente manera:

Desde el cepario se inoculó una placa Petri con medio LB al 1,2% con la técnica de siembra por estrías para poder obtener colonias puras. En el caso de *A. tumefaciens* NTL4 el medio de cultivo LB se suplementó con 24 mg/L de gentamicina. La incubación se realizó en condiciones de oscuridad a una temperatura ambiente promedio de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h. Posteriormente, en tubos falcon de 15 mL se añadió 10 mL de medio de cultivo LB y se inoculó una colonia con la ayuda de un aza bacteriológica, esta se mantiene en un agitador orbital a 150 rpm, a una temperatura de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 16-18 horas aprox. Finalmente se normaliza la concentración celular observando ajustando a Mc Farland 0,5 ( $1 \cdot 10^8$  UFC/mL) de las cepas, si es necesario disminuir la turbidez se diluye con medio LB estéril.

### 5.3 Extracción ADN

Una vez obtenida la biomasa de muestra, esta se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la extracción de ADN. Se probó utilizando un kit de extracción de tejido de ADN E.Z.N.A (Omega Biotek) siguiendo el protocolo de fabricante con algunas modificaciones.

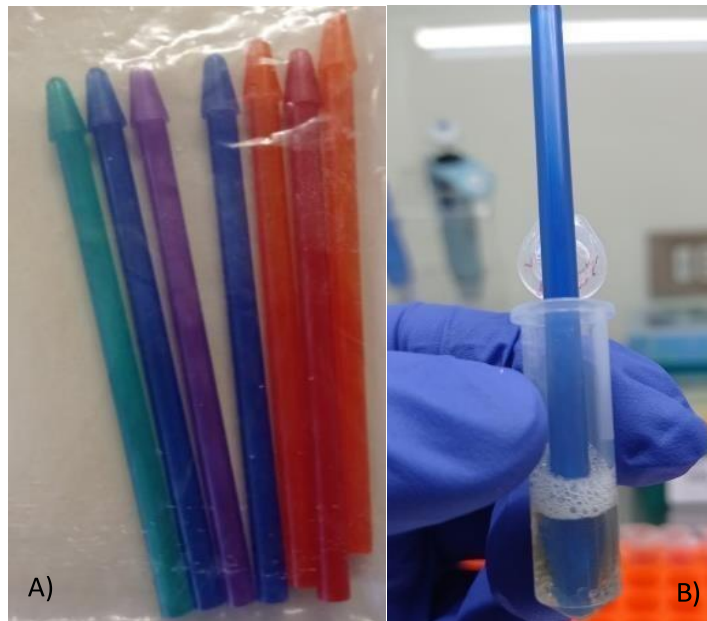
En la etapa de lisis celular para *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp. y las cepas bacterianas se utilizó volumen recomendado (200  $\mu\text{L}$ ), para las muestras con Nostocales se utilizó el doble de volumen de reactivos (400  $\mu\text{L}$ ) recomendado por el fabricante debido a su alta densidad de células. Además, en esta etapa se le realizó una trituración mecánica con beats y vástago (Figura 1). Todas las cepas fueron agitadas con un equipo Vortex por 5 minutos a 1600 rpm con 0,1 g de beats

y para las cepas de Nostocales previamente se hizo una molienda utilizando los vástagos durante 2 minutos.

Se probó un protocolo de extracción de ADN fenol-cloroformo estandarizado para microalgas nocivas del Laboratorio de Biotoxinas de la Universidad de Concepción (LBTx) con ciertas modificaciones:

- Desde una muestra de cultivo (tubo eppendorf 1,6 mL) se centrifuga a máxima velocidad (13.300 rpm) durante 5 minutos, se le añade 200 µL de buffer de lisis (NaCl 1M, Tris 70 mM, EDTA 30 mM y CTAB al 1% (m/v) al momento de usar, se ajusta pH a 8,6) Y 0,1 g de beads (cepas de cianobacterias filamentosas se trituran con vástago durante 1:30 min), posteriormente se incuba durante 15 min a 65 °C
- Vortear las muestras durante 5 min a 1600 rpm
- Incubar 15 min a 65°C
- Añadir 10 µL de RNAsa (1µg/µL) e incubar 30 min a 55°C
- Añadir 20 µL de proteinasa K (1 µg/µL) e incubar 30 min a 55°C
- Inactivar Proteinasa K, a 80°C por 10 min.
- Llevar a temperatura ambiente y añadir 400 µL de cloroformo
- Homogenizar la muestra hasta formar una emulsión (1 min a 1600 rpm en Vortex) y centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos
- Tomar sobrenadante (fase acuosa) para depositar en tubos eppendorf nuevos estériles (rotular cada tubo)
- Añadir 1000 µL de etanol 100% frío (-20°C) e incubar 30 min a -20 °C
- Centrifugar la muestra 10 min a máx. velocidad y descartar sobrenadante
- Añadir 1000 µL de etanol 70% a 20 °C (temperatura ambiente) y homogenizar ligeramente.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 10 min y eliminar el sobrenadante cuidadosamente de no tomar el pellet, repetir nuevamente estos dos últimos pasos.

- Evaporar el etanol durante 12-24 h en cabina de bioseguridad previamente esterilizada con luz UV y alcohol 70%.
- Añadir 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura (grado biología molecular) autoclavada y homogenizar con vortex.



**Figura 1:** Materiales para la extracción de DNA en la etapa de lisis celular. A) Vástagos utilizados. B) Trituración de la muestra con el vástago y los beats (perlitas de cristal) en el fondo del tubo eppendorf.

Se cuantificó el ADN obtenido en espectrofotómetro NanoDrop 1000 o 2000 marca Thermo Fisher. Además, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para poder observar la integridad del ADN obtenido. Se utilizaron 8  $\mu\text{L}$  de muestra y 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 3x teñido con gel red. Se corrió el gel de 7 cm aproximadamente a 80 V durante 50 minutos.

#### **5.4 Identificación molecular para las especies de cianobacterias.**

Se realizó una amplificación por PCR convencional con partidores para el ADNr 16S (LamasSamanamud et al., 2023) con las extracciones de ADN obtenidas de los cultivos de cianobacterias. La secuencia 5'-3' de los partidores es la siguiente: 8F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y 1492R: GGWTACCTTGTTACGACTT con un tamaño de fragmento de 1500 pb.

El programa de amplificación fue el siguiente:

- Un ciclo pre denaturación a 94 °C durante 5 min, luego 35 ciclos de denaturación a 94°C durante 1 min, etapa de alineamiento a 55 °C durante 1 min y una etapa de elongación a 72 °C por 2 minutos.

El volumen total de la mezcla de PCR fue 20 µL y contiene lo siguiente: 10 µL de Máster Mix Brilliant III Ultra-Fast, 2 µL de forward primer (4 uM), 2 µL reverse primer (4 uM), 2 µL de muestra PCR y se completó con 4 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura (grado molecular) autoclavado, cada muestra se realizó por duplicado. (Schauder & Bassler, 2001).

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % para mostrar la banda amplificada. Se tomo un volumen de 8 µL de volumen de PCR y 2 µL de buffer de carga 3X con Gel Red. Y se corrió el gel de 7 cm aproximadamente a 80 V por 50 minutos.

#### **5.5 Identificación molecular de genes de Quorum Sensing para cianobacterias.**

Las mismas muestras de extracción de ADN se probaron con partidores que amplifican genes relacionados con el sistema de comunicación Quorum Sensing (LuxS o Lux I) probando diferentes condiciones de amplificación para poder

amplificar alguna región del ADN de la muestra. En la tabla 4 se muestra los pares de partidores utilizados y su tamaño de fragmento.

**Tabla 4:** Partidores y condiciones utilizadas para la amplificación de genes de Quorum Sensing.

Partidores		Secuencia (5' - 3')	Condiciones de amplificación	Tamaño fragmento	Cita
Lux S	FluxS1	GCTGGAACACC TGTTTCGC	Un ciclo a 94°C por 5 min, luego 35 ciclos de 94°C por 45 s, 55°C por 30 s y finalmente a 72°C 15 s.	102 bp	(H. Zhu et al., 2008)
	RluxS2	ATGTAGAAACCG GTGCGG			
LuxSF	LuxSF	TCGCGCATGAT GTGGTGATT	Un ciclo a 94 °C durante 5 min, luego 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C por 2 min.	372 pb	(Lamas-Samanamud et al., 2023)
	LuxSR	TTTTGTCTGGGTG CGTGTTTG			
LuxI	LuxIQS6-1 F	ATGCATCACCAG ATTTTTACG	Un ciclo a 94°C por 3 min, luego 30 ciclos de 94°C por 45 s, 56°C por 45 s y 72°C por 1 min.	Variable	(Hao et al., 2010)
	LuxIQS6-1 R	GGCTAGGCCGT TGCGTCC			
	LuxIQS10-1 F	AAAGTTGTTACA CATTGCTCAG G	Un ciclo a 94°C por 5 min, luego 35 ciclos a 94°C por 15 s, 60°C por 15 s y 72°C por 15s.	Variable	(Hao et al., 2010)
	LuxIQS10-1 R	GCAAATCCGGC TGACTCCCT			

El volumen total de la mezcla de PCR fue 20 µL y contiene lo siguiente: 10 µL de Master Mix Brilliant III Ultra-Fast, 2 µL de forward primer (4 uM), 2 µL reverse primer (4 uM), 2 µL de muestra PCR y se completó con 4 µL de H2O ultrapura (grado molecular) autoclavada. Cada muestra se realizó por duplicado.

El producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 11,5% determinó la presencia del fragmento esperado. Se utilizó un volumen de muestra de 8 µL y 2 µL de buffer de carga 3X con gel red. Se dejó correr el gel a 70/80 V por 60/50 minutos respectivamente. Los controles negativos se utilizaron sólo con H<sub>2</sub>O Ultra pura autoclavada y para los controles positivos en los partidores FluxS: *Serratia* sp. LuxS y 16S: *M. aeruginosa*, IQS6-1, IQS10-1: *Serratia* sp.

## 5.6 Screening de producción de autoinductores de cianobacterias

### 5.6.1 Medio de cultivo para *Agrobacterium tumefaciens* NTL4

Previamente a la obtención del cultivo en medio líquido de las cepas bacterianas se preparan las placas para el ensayo biosensor de *A. tumefaciens* NTL4. Se preparó 250mL de medio de cultivo LB al 1,2% de agar y se autoclavó. Posteriormente, se pesaron 18mg de x-gal, el cual fue diluído en 1mL de DMSO (se recubre con papel aluminio ya que el X-gal es fotosensible y se mantiene a -20°C). Al medio de cultivo preparado antes que solidifique (temperatura aprox. 40-50°C) se le agregó 625µL de X-gal (18µg/ml) quedando a una concentración final de 45 µg/ml de X-gal (Bao et al., 2022) al medio de cultivo LB. Cada placa aproximadamente quedó con 25mL de medio LB 1,2% + 45µg/ml de X-gal. Para poder inocular la cepa biosensora se utilizaron torulas de algodón desechables previamente autoclavadas.

### 5.6.2 Extracción de sobrenadante de caldos de cultivos.

Para los cultivos de cianobacterias se utilizó 50mL de caldo de cultivo desde un matraz Erlenmeyer de 250mL que presentaban un periodo de cultivo de 14 días, en las condiciones que son mencionadas en la metodología. Para las bacterias se utilizó los 10mL de caldo de cultivo overnight en tubos falcon de 15mL. En una centrifuga se colocaron las muestras y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se alícuota en 2 tubos eppendorf de 1,5 mL y se

almacena a 4°C hasta su uso. Los discos se prepararon a partir de papel filtro de 11 micras de poro, fueron cortados con corchetera y esterilizados por autoclave en una placa Petri. Posteriormente se pegó al mesón trozos de papel parafilm y con ayuda de pinzas esterilizadas se colocan los discos los que fueron inoculados con 20 µL de sobrenadante de cada muestra y se dejan secar durante 30 minutos alrededor de un mechero.

### 5.6.3 Montaje de experimento

Se inoculó por triplicado *A. tumefaciens* NTL4 en las placas con medio de cultivo LB al 1.2% + 45µg/ml de X-gal con ayuda de una torula de algodón estéril, se tomó un abundante inculo del caldo de cultivo overnight, se eliminó el exceso de líquido y se sembró desde un lado de la placa hasta el otro, se giró en 120° y se volvió a sembrar desde un extremo al otro y se repitió nuevamente, esto para que quede completamente inoculada la placa biosensora.

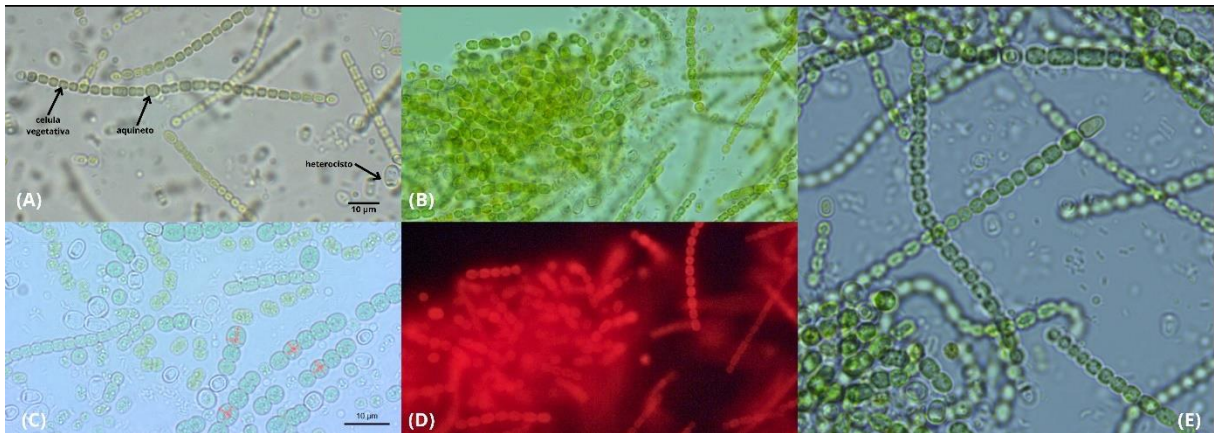
Finalmente, con ayuda de las pinzas esterilizadas se colocan los sensidiscos en diferentes ubicaciones, cada vez que se cambió de disco se flamearon las pinzas con el mechero, se selló con Parafilm la placa y se dejó incubando a una temperatura promedio de 27,6 °C durante 48 horas en condiciones de oscuridad. La producción de una coloración azul significa una respuesta a la presencia de autoinductores que detecta la bacteria biosensora *A. tumefaciens* NTL4

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Cianobacterias productoras de floraciones

Las muestras identificadas taxonómicamente fueron *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp y microorganismos del orden Nostocales.

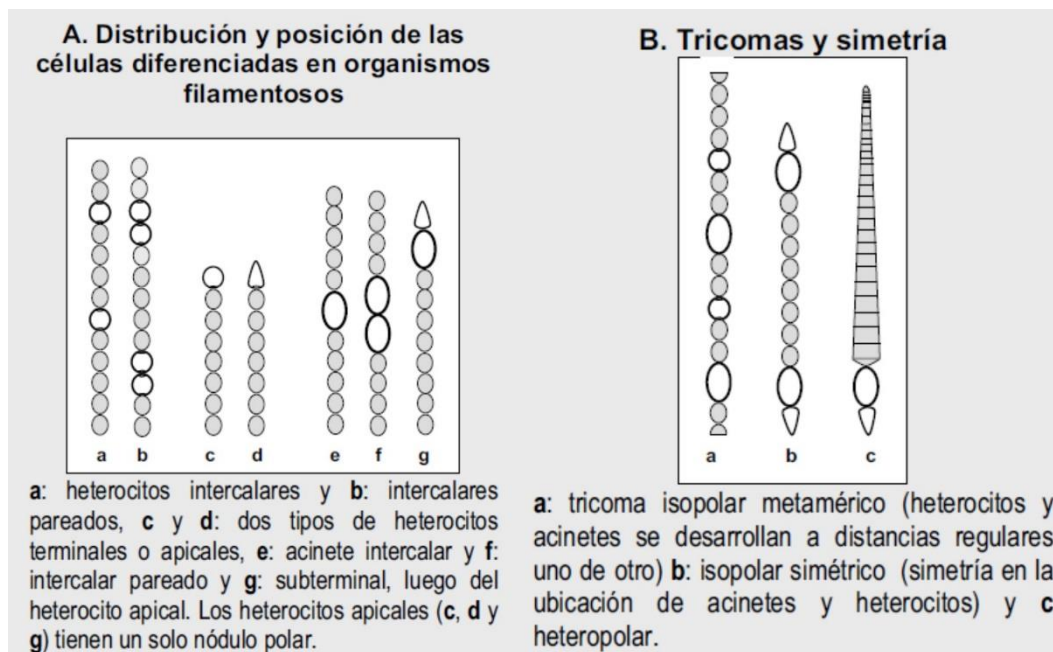
#### Orden Nostocales



**Figura 2:** Fotografía de cultivo de células del orden Nostocales a 100X de aumento. (A), (C) y (E) Se observan las células diferenciadoras de un filamento celular. (B) y (D) Fotografía de una misma agrupación de filamentos con y sin fluorescencia.

La célula vegetativa presentó un promedio de 2,5 y 2,2  $\mu\text{m}$  de ancho por largo, los heterocistos presentan un promedio de 4,1 y 3,3  $\mu\text{m}$  de ancho por largo. Además, se puede apreciar la formación de colonias filamentosas, con células especializadas como heterocistos terminales. Se puede sugerir la posible formación de un aquineto intercalar como se observa en la figura 2A debido a su contenido granular a diferencia de los heterocistos que tienen un contenido homogéneo (Giannuzzi et al. 2011).

El orden Nostocales es un grupo de cianobacterias que se caracteriza por formar colonias de filamentos con una organización celular especializada, este grupo además es conocido por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a través de una célula especializada denominada heterocistos (UNESCO, 2009; Giannakopoulos et al., 2024). Dentro de sus principales características se pueden destacar las siguientes: presentan talos filamentosos, heterocitados (con heterocistos) (UNESCO, 2009) (Fig. 3).



**Figura 3:** Figura de distribución y posición de heterocistos y acinetos en microorganismos filamentosos. (Extraída de UNESCO, 2009)

No se ha esclarecido completamente el límite entre los géneros de la familia Nostocaceae, diversas investigaciones en base a estudios moleculares y morfológicos han propuesto nuevas clasificaciones. Existen cambios en la nomenclatura de los géneros del orden Nostocales, especialmente de *Anabaena* y *Aphanizomenon*. Se han creado nuevos géneros para agrupar adecuadamente

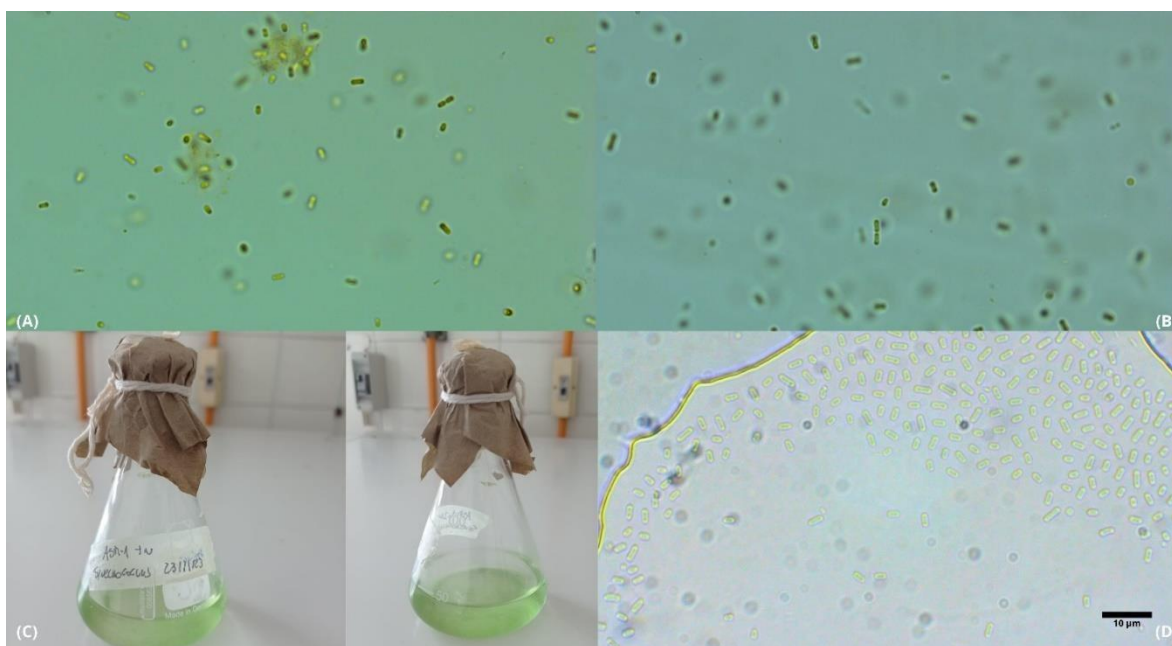
estas especies según sus características. El género *Aphanizomenon* se ha segregado en morfoespecies como *A. issatschenkoi* y un nuevo género *Cuspidothrix*. En el género *Anabaena*, las especies planctónicas y bentónicas han sido clasificadas en nuevos géneros según su ubicación en la columna de agua, agregando las especies planctónicas dentro del género *Dolichospermum* (UNESCO, 2009). Por otro lado el género *Cronbergia* fue establecido tras una reevaluación polifásica de *Anabaena siamensis* y fue descrito según las disposiciones del Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas (ICN) (Komárek et al., 2010). Se diferencia de *Anabaenopsis* por la formación de heterocistos terminales y de *Cylindrospermum* y *Richelia* por características específicas en la formación de heterocistos y asociaciones simbióticas (Komárek et al., 2010). La validez de *Cronbergia* como género independiente sigue siendo un tema de investigación especialmente debido a la falta de secuencias de ARNr 16S para todas sus especies.

Es importante considerar que la mayoría de las publicaciones existentes hasta la fecha aún utilizan los nombres antiguos o basónimos al referirse a la ecología y toxicidad de estas especies, por lo tanto, la búsqueda de información debe tener en cuenta tanto los nombres nuevos como los antiguos para obtener una visión completa de la literatura relevante (UNESCO, 2009).

El uso de técnicas adicionales, como análisis genéticos, serían necesario para poder proporcionar una identificación más precisa a nivel de género o especie.

## ***Synechococcus* sp.**

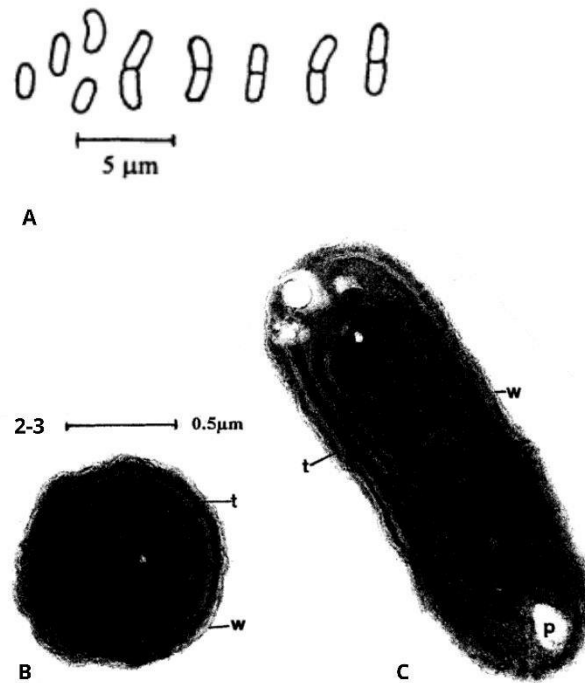
En la figura 4 se puede observar las pequeñas células del cultivo de *Synechococcus*, el tamaño promedio de estas células es de 2,76 y 1,16  $\mu\text{m}$  de ancho y largo, respectivamente. La medición se logró tomar a partir de un portaobjeto micrométrico el cual al ser tamaños tan pequeños se puede incurrir en errores. Sin embargo, se han descrito especies del género con tamaños más grandes como *S. nidulans* que forman filamentos cortos, ovalados o cilíndricos, rectas, curvadas o sigmoideas que pueden medir entre 1,5-6  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5-2  $\mu\text{m}$  de ancho presentando un contenido celular de color azul verdoso pálido, homogéneo como se observa en la figura 4C (Sant'Anna et al., 2007).



**Figura 4:** Fotografías de cultivo de *Synechococcus* sp. A)-B)-D) Se observa células del cultivo bajo microscopio en un aumento 100x. C) Cultivo de 14 días en medio ASM-1 +N de *Synechococcus*.

Este género es principalmente picofitoplancton ( $<2 \mu\text{m}$ ) y uno de los más abundantes en los sistemas de agua dulce (Callieri, 2008). *Synechococcus* es una cianobacteria versátil por su capacidad de adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales, incluyendo variaciones en luz, temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes (Callieri, 2017). A pesar de esta versatilidad, la mayor parte del conocimiento existente sobre este género proviene del estudio de cepas que habitan en ambientes marinos o costeros (Śliwińska-Wilczewska et al., 2018; Stockner et al., 2002). Recientemente se detectó la presencia de cilindropermopsina y anatoxina en cultivos de *Synechococcus* aislados de cuencas tropicales.

Son células que generalmente existen de manera individual en el agua, aunque a veces se pueden encontrar en colonias de dos células, lo cual suele ocurrir durante su división. Estas células tienen una forma que varía entre ovalada y alargada como un bastón y carecen de una capa mucilaginosa externa (Stockner et al., 2002). En su morfología interna presentan un contenido uniforme de color azul verdoso claro y tienen un tamaño que oscila entre  $0.8\text{-}3.8 \mu\text{m}$  de largo y  $0.3\text{-}1.7 \mu\text{m}$  de ancho (Stockner et al., 2002). Además, presentan división celular simétrica y un patrón tilacoidal periférico (Komárek et al., 1999).



**Figura 5:** Esquema de células de *Synechococcus* sp. A) Morfología de células de *Synechococcus* PCC 6301. B) Sección transversal de células de *Synechococcus* sp. C) Secciones finas de células de *Synechococcus* sp. con tilacoides parietales. (k= carboxisomas, p= polifosfatos, t= tilacoides, w= pared celular) (Extraída de Komárek et al., 1999).

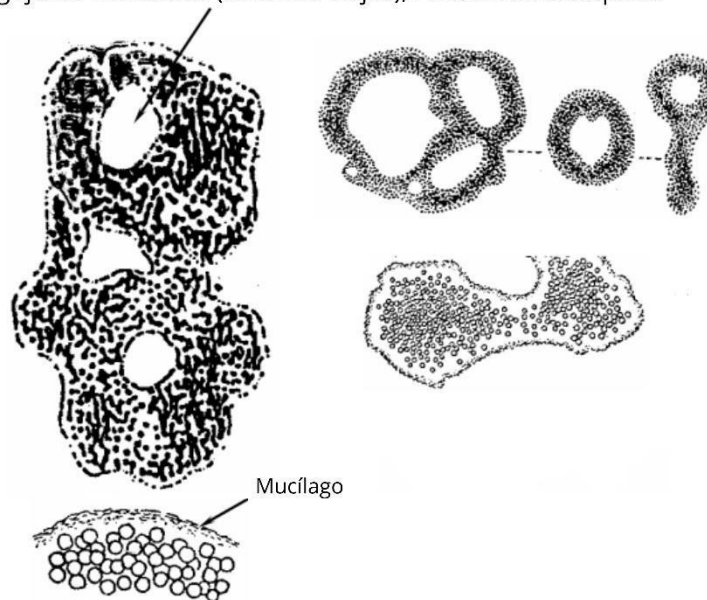
### ***Microcystis aeruginosa***

*M. aeruginosa* es una cianobacteria acuática que forma parte del orden Chroococcales y es conocida por su capacidad para formar floraciones algales nocivas en cuerpo de agua dulce (Giannuzzi et al., 2011). Presentan una morfología variada, que incluye formas lobadas globosas y a menudo clatradas (con una apariencia de red o celosía) (UNESCO, 2009). Las colonias son micro a macroscópicas, pudiendo ser esféricas, ovales o irregulares, poseen una vaina mucilaginoso general, incolora, que puede variar desde lisa y homogénea hasta lamelada, puede extenderse hasta más allá de las células (UNESCO, 2009). Las

células vegetativas son esféricas a hemisféricas luego de la división celular, con o sin aerótopos (vesícula de gas) y pueden medir de 3,5- 4,8  $\mu\text{m}$  de diámetro (UNESCO, 2009). Es una especie cosmopolita, encontrada en diversas regiones del mundo (Almanza Marroquín, 2016b; UNESCO, 2009; Giannuzzi et al., 2011). A menudo se confunde con otras especies del género *Microcystis* como *M. protocystis* y con géneros similares como *Radiocystis* sp. y *Sphaerocavum* sp. debido a su gran variabilidad morfológica (UNESCO, 2009).

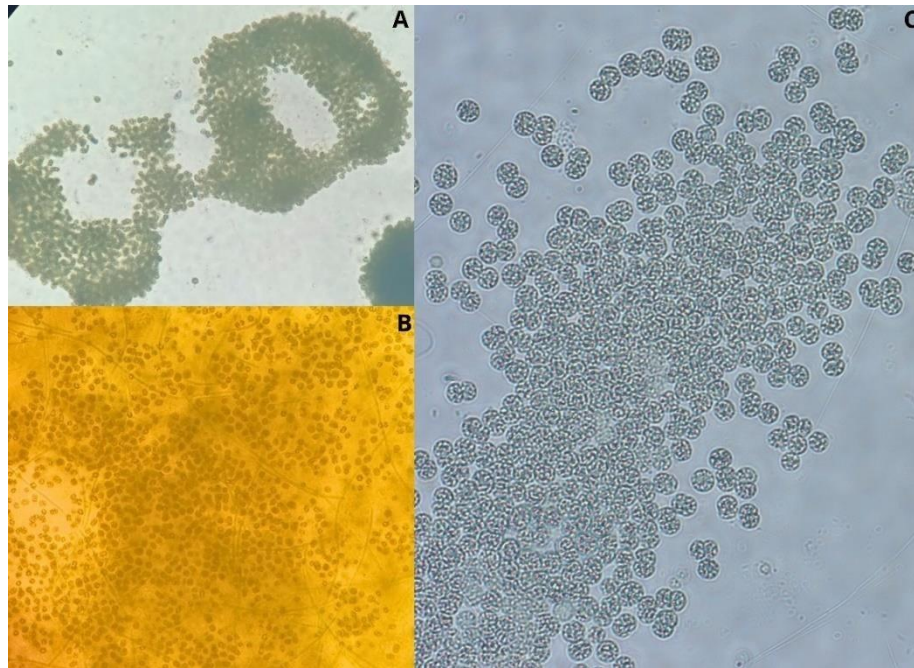
La muestra de *M. aeruginosa* fue anteriormente caracterizada polifásicamente (Pantoja, 2023).

**Forma de las colonias:** De contorno irregular, lobuladas y con agujeros marcados (colonias viejas), hasta macroscópicas



**Figura 6:** Esquema de Colonias de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1866. (Extraída de Komárek & Komárková, 2002).

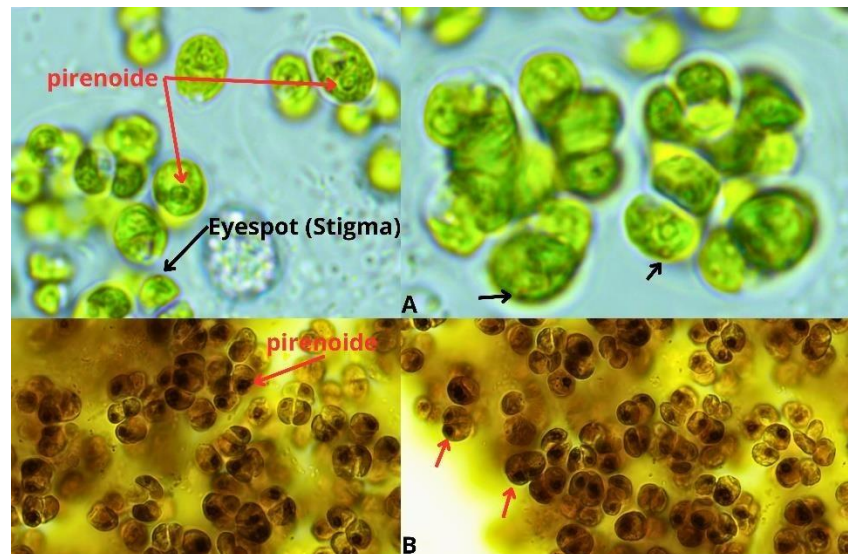
Como se menciona anteriormente esta especie es capaz de presentar células aglomeradas densas por una alta cantidad de aerótopos, además de formar colonias lobadas con agujeros marcados (Figura 6).



**Figura 7:** Fotografías de cultivos *M. aeruginosa*. En la figura A) se observa una colonia característica de *M. aeruginosa* en un aumento 10x tomada con un celular. En B) se observa una colonia con la presencia de otro grupo de cianobacteria filamentosa, la fotografía fue tomada con celular en un aumento de 40x. C) Células de *M. aeruginosa* tomada en aumento 40x con microscopio óptico ZEISS West Germany.

La mantención de un cultivo juega un papel importante para evitar la contaminación de estos, se han descrito diferentes métodos de purificación de cianobacterias y alguno de ellos puede implicar uno o más pasos (Sena et al., 2011). En el caso nuestro, en un comienzo los cultivos se pudieron mantener libre de células eucariotas y de otras cianobacterias no deseadas, sin embargo, al pasar el tiempo nuestras células se fueron contaminando como se puede observar en la figura 8B.

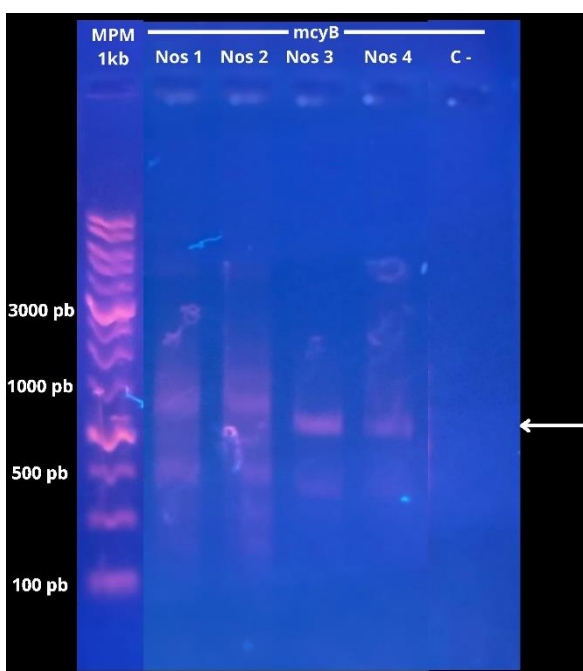
Existe evidencia que los cultivos en reiteradas ocasiones tienden a deteriorarse con el tiempo (Sena D'Anna et al., 2013). En los cultivos *M. aeruginosa* en determinado tiempo se contaminó con células eucariotas, la cual produjo un desequilibrio en la competencia por factores esenciales de *M. aeruginosa* inhibiendo por completo su crecimiento (Oliveira de Fernandes et al., 2009). Existe cierta similitud en la forma, tamaño y coloración de las células con el grupo de las Chlorophyta (Deglinc et al., 2018), por lo que no se dilucidó una contaminación en el cultivo. Para poder asegurarnos de la presencia de células eucariotas se observó bajo fluorescencia y se le añadió Lugol para observar la presencia de sustancia de reserva en forma de almidón (pirenoide) (UNESCO, 2009) (Figura 8).



**Figura 8:** Fotografías de células de cf. *Chlamydomonas* sp. A) Se observa morfología celular de *Chlamydomonas* reconociendo pirenoides y eyespot, en un aumento 100x. B) Con microscopio de Fluorescencia se confirmó la estructura de pirenoide que en presencia de almidón (Lugol) se observa un color intenso en la estructura.

## 6.2 Caracterización de microcistina en *M. aeruginosa* y Nostocales

En el caso de *M. aeruginosa* sólo se pudo realizar una réplica con el kit de microcistina ELISA del laboratorio Abraxis obteniendo un resultado de 2,6 µg/L, sin embargo, nos confirma la presencia que *M. aeruginosa* presenta microcistinas. Además, se trató de identificar si hay presencia de algunos de los genes de microcistinas en las muestras de Nostocales en este caso *mcyB*, sin embargo, la amplificación por PCR mostro ausencia del fragmento (Carmo Bittencourt-Oliveira, 2003) (Figura 9).

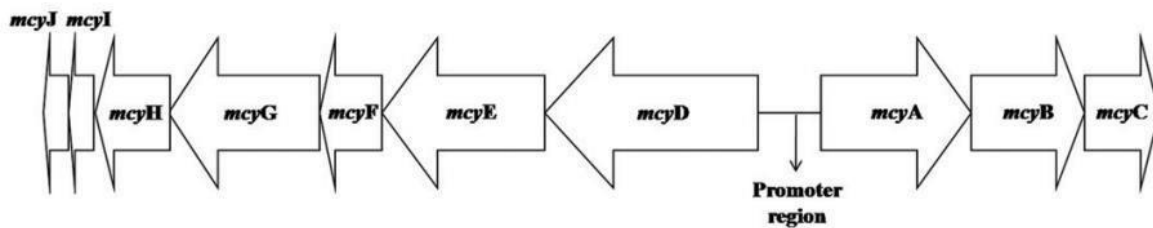


**Figura 9:** Electroforesis gel de agarosa en muestras de Nostocales amplificada por PCR del gen *mcyB*. MPM 1kb: Marcador de peso molecular. Carril 2-5 muestras de Nostocales. C-: control negativo.

No se observó banda de amplificación para el gen *mcyB*, sin embargo, se amplifico un fragmento no específico debido a que se observan bandas de amplificación de 800 pb de tamaño. Esto puede deberse a contaminantes dentro de las muestras analizadas, la presencia de dímeros de partidores o la presencia de secuencias

complementarias en el ADN (Borst et al., 2004). Según describe el autor de los partidores, se debería amplificar un fragmento de 78 pb (Kurmayer & Kutzenberger, 2003).

Las microcistinas se sintetizan de forma no ribosómica a través de un complejo multifuncional, la microcistina (MC) sintetasa incluye sintetasa peptídica no ribosómica (NRPS), sintetasa de policétidos (PKS), enzimas de adaptación y un transportador (ABC) (Omidi et al., 2018). La MC sintetasa está codificada por un clúster génico de 55 kb compuesto por 10 genes bidireccionales, denominados *mcyA-J*, con una región promotora bidireccional de 732 pb entre *mcyA* y *mcyD* (Figura 10). Si bien se tiene descrito en *M. aureginosa* la presencia de este gen *mcyB* (Shao et al., 2009), el ensayo por PCR demuestra la ausencia de este, no obstante, no se probó otros partidores para amplificar la presencia de los otros genes que codifican la microcistina.



**Figura 10:** Ilustración del grupo de genes de síntesis de microcistina (*mcy*). (Extraída de Omidi et al., 2018).

### 6.3 Extracción de ADN

Las muestras de extracción de ADN se observan en la siguiente tabla 5. En el caso de las muestras de *M. aureginosa* se logró obtener una muestra de extracción de ADN previo a la contaminación de los cultivos, sin embargo, la cantidad obtenida es baja.

**Tabla 5:** Cuantificación de extracción de ADN en espectrofotómetro NanoDrop 1000.

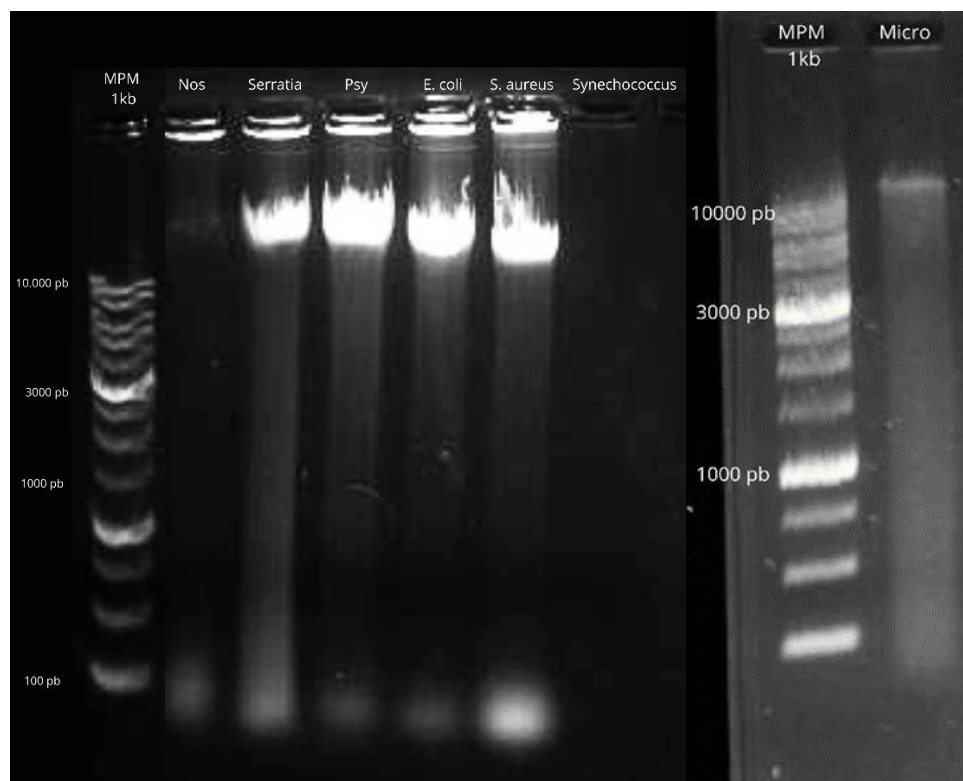
Especie	DNA (ng/ $\mu$ L)	260/280	260/230
<i>Microcystis aeruginosa</i>	10,7	1,78	1,08
Nostocales	124,2	1,98	1,25
<i>Serratia</i> sp.	2409,9	1,89	2,35
<i>Pseumonas syringae</i>	1857,9	1,99	2,55
<i>Escherichia coli</i>	1937,2	1,96	2,54
<i>Staphylococcus aureus</i>	1304,9	1,98	2,58
<i>Synechococcus</i> sp.	-	-	-

Las cepas bacterianas *Serratia* sp., *Pseumonas syringae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* arrojaron una alta concentración de ADN. Por el contrario, las cepas de cianobacteria *Microcystis aeruginosa* y Nostocales arrojaron una menor concentración de ADN. Es importante mencionar que la cepa *Synechococcus* sp. no mostró concentración de ADN, por lo que no se realizaron los análisis moleculares posteriores.

En cuanto al índice de pureza 260/280, los resultados fueron cercanos al índice óptimo 1,8, la cual indica una baja contaminación por proteínas en las extracciones de ADN (Velázquez et al., 2014). En el caso del índice 260/230 el óptimo igualmente es 1,8 y los valores son variables en las extracciones de ADN de las muestras analizadas. En el caso de obtener valores menos a 1,8 indica

contaminación por fenol, EDTA, tiocianato de guanidina o carbohidratos (Velázquez et al., 2014).

A partir de los resultados que nos entregó la cuantificación por espectrofotometría NanoDrop se realizó una electroforesis en gel de agarosa para corroborar estos datos y observar la integridad del ADN.



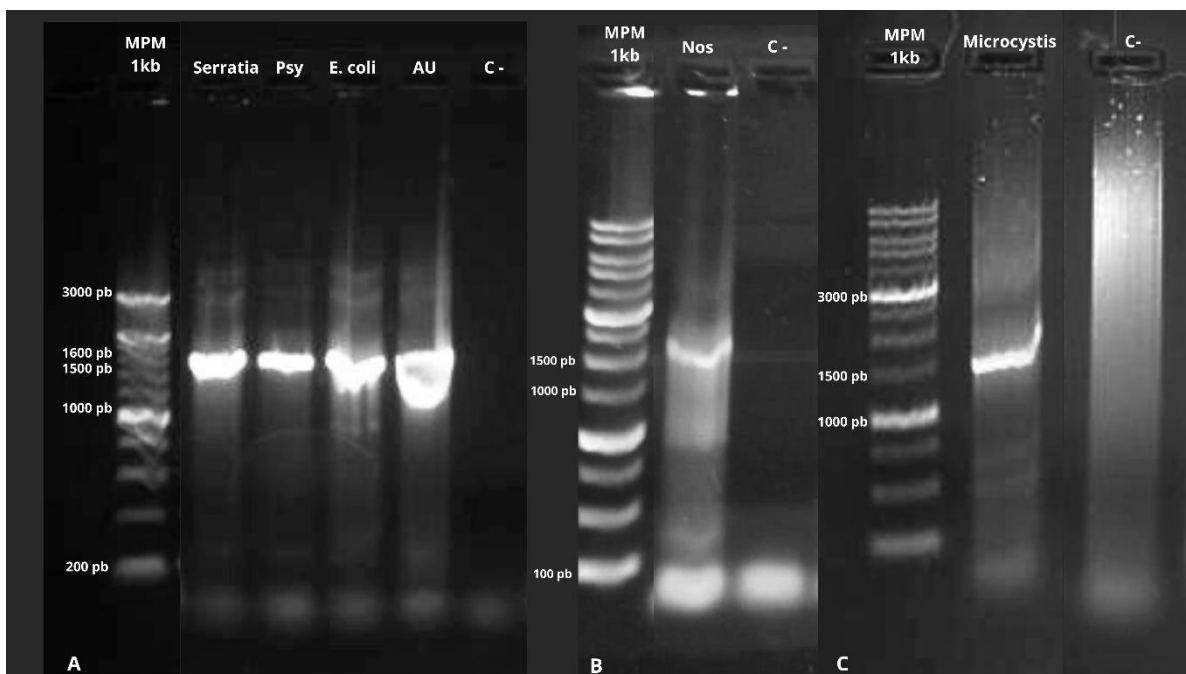
**Figura 11:** Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de muestras de cianobacterias y bacterias control. Los carriles de izquierda a derecha corresponden al marcador de peso molecular (M.P.M), Nostocales (Nos), *Serratia* sp, *P. syringae*, *E. coli*, *S. aureus*, *Synechococcus* sp. Luego otro M.P.M y *Microcystis aeruginosa*.

Se detectaron bandas de alta concentración de ADN en las bacterias, mientras que en las muestras analizadas de cianobacterias se observaron bandas de menor intensidad. El gel resultante reveló una marcada diferencia en la concentración de ADN entre las bacterias y las cianobacterias, evidenciando fragmentos de ADN de gran tamaño y una baja contaminación por ARN.

Comparando los resultados de las extracciones de ADN, una de las claves para obtener un buen rendimiento del ADN depende del volumen de cultivo tomado para la extracción y puede modificarse según sea necesario (Hept & Greene, 2023), en este caso es recomendable, la utilización de 75mL de un cultivo de cianobacterias en su fase estacionaria; se tomó 50mL de caldo de cultivo, de los cuales solo 1,5mL de cultivo de cianobacterias se utilizó para la extracción. Además, se encontraban en una etapa exponencialmente temprana, ya que, el cultivo tenía 14 días (Zhai et al., 2012). También se sugiere un aumento de los tiempos de centrifugado y los períodos de incubación. Posteriormente, los pasos siguientes fueron muy similares, por lo que la concentración de ADN en cianobacterias era esperable debido al volumen, la concentración celular y etapa de crecimiento en la que se extrajo. Por otro lado, las bacterias tienen una tasa de crecimiento mucho más rápido, llegando en menos de 24 horas a estar en su etapa de crecimiento estacionaria, dependiendo de la temperatura y especie (Pedraza et al., 2016), por lo que los resultados obtenidos del ADN de las bacterias fueron exitosos.

#### **6.4 Amplificación PCR convencional para el gen ADNr 16S**

Mediante una amplificación del gen ADNr 16S se puede determinar la ausencia o presencia de microorganismos en las muestras obtenidas (Figura 12).



**Figura 12:** Electroforesis en gel de agarosa del gen ADNr 16S amplificado por PCR. A) Gel de resultado PCR en ADN de bacterias control *Serratia* sp., *P. syringae*, *E. coli* y *S. aureus*). B) Se observa el gel para PCR en el ADN de Nostocales. (Nos). C) Gel de electroforesis del PCR para ADN de *M. aeruginosa*. C-: Control negativo, MPM 1kb: Marcador de peso molecular de 1 kb.

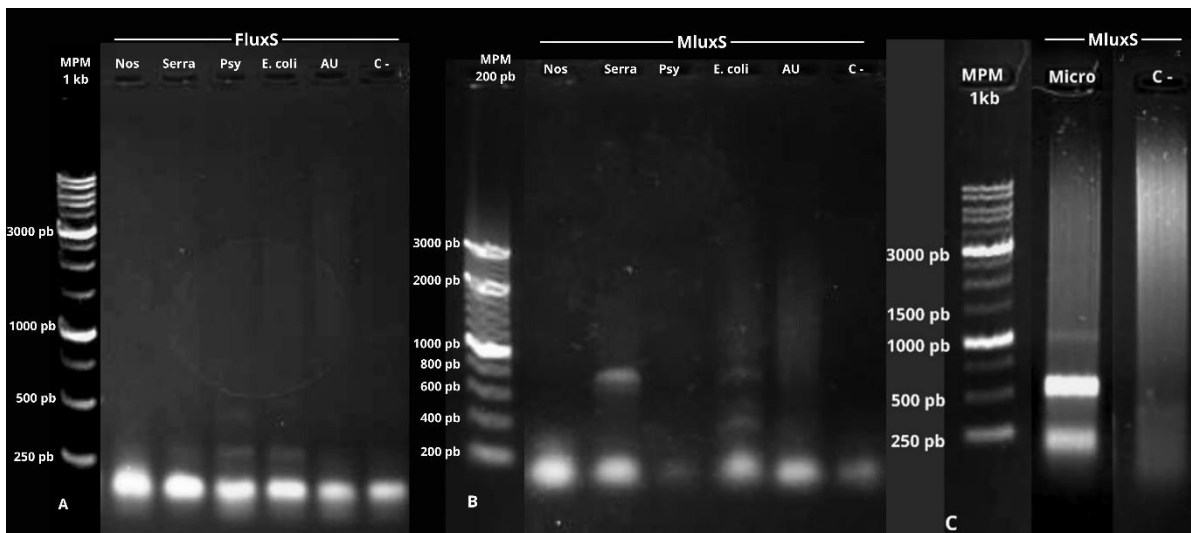
En cada gel observado en la Figura 13 se puede observar su respectivo Control negativo y marcador de peso molecular para poder corroborar el tamaño del fragmento, así también, asegurar la técnica y condiciones utilizadas para la amplificación PCR.

Cuando se realiza la amplificación de un fragmento grande en PCR es importante ajustar el tiempo de elongación para garantizar la amplificación completa y precisa del ADN objetivo (Pérez de Castro, 2011). En A) las condiciones de PCR se optimizaron a 45 segundos en la etapa de amplificación de 35 ciclos, en cambio en B) se utilizó el protocolo de los partidores que se describió anteriormente (Lamas Samanamud et al., 2023). Si bien se observó una banda de 1500 pb más definida, se afectó la especificidad del producto final, ya que, el control negativo muestra

productos inespecífico de pequeños fragmentos. Esto posiblemente se debe a la actividad de la polimerasa de ADN durante la elongación, ya que, hay más tiempo disponible para agregar nucleótidos 3'-5' (Mas et al., 2016). A pesar de esto la amplificación por PCR del gen ADNr 16S amplificó con éxito, por lo que se logra identificar la presencia de los microorganismos en las extracciones de ADN obtenidas.

## 6.5 Identificación de genes Quorum Sensing en cianobacterias

Se obtuvieron los resultados de amplificaciones por PCR de los genes LuxS y LuxI de Quorum Sensing descritos en bacterias para las muestras analizadas (Figura 13, Figura 14, Figura 15, Figura 16).

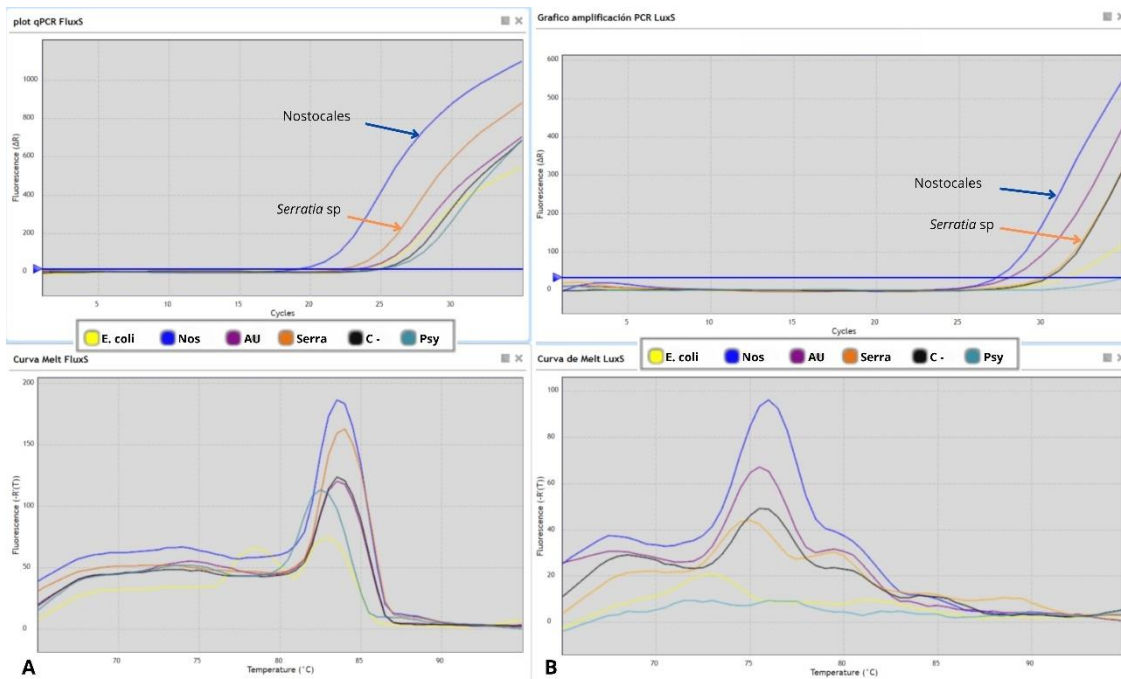


**Figura 13:** Electroforesis en gel de agarosa de LuxS amplificada por PCR. A) Resultado de la amplificación PCR con partidores FluxS. B) Resultado de la amplificación PCR con partidores MLuxS. C) Amplificación por PCR de *M. aeruginosa* utilizando partidores MLuxS. C-: Control negativo (H<sub>2</sub>O ultrapura autoclavada), MPM 1kb: Marcador de Peso Molecular 1 kb. MPM 200pb: Marcador de peso molecular de 200 pb. Nos: Nostocales, Serra: *Serratia* sp., Psy: *P. syringae*, *E. coli*, AU: *S. aureus*, Micro: *M. aeruginosa*.

Se utilizaron estos partidores de comunicación Quorum Sensing con Autoinductor2 por los pocos partidores candidatos para QS del tipo 1 (Fig. 13). En el caso de los partidores FluxS, amplificó un fragmento de tamaño pequeño que coincide con la literatura (102pb) (Hu Zhu et al., 2008). Este partidor ha sido diseñado para la especie bacteriana *Serratia* sp. (Hu Zhu et al., 2008), sin embargo, es sabido que este sistema de comunicación se ha descrito para muchas bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas, por lo que la amplificación es esperable en el resto de las cepas bacterianas (Doherty et al., 2006; Niu et al., 2013). Sin embargo, en la literatura *P. syringae* utiliza autoinductores del tipo 1 (AHL) para la comunicación mediante Quorum Sensing (Morohoshi et al. 2020). Además, nuestro control negativo resultó amplificar una banda cercana al tamaño de los partidores FluxS, indicando la presencia de productos PCR inespecíficos o contaminación de la muestra. La amplificación por PCR es una técnica que ha crecido exponencialmente desde el momento que se conoció, una de las grandes ventajas es su gran sensibilidad, como también su gran inconveniente, ya que, es capaz de amplificar la más mínima cantidad de ADN (Weissensteiner & Lanchbury, 1996). Por lo que si bien se logró la amplificación del fragmento esperado, es sugerible repetir nuevamente este resultado debido a la posibilidad de un falso positivo.

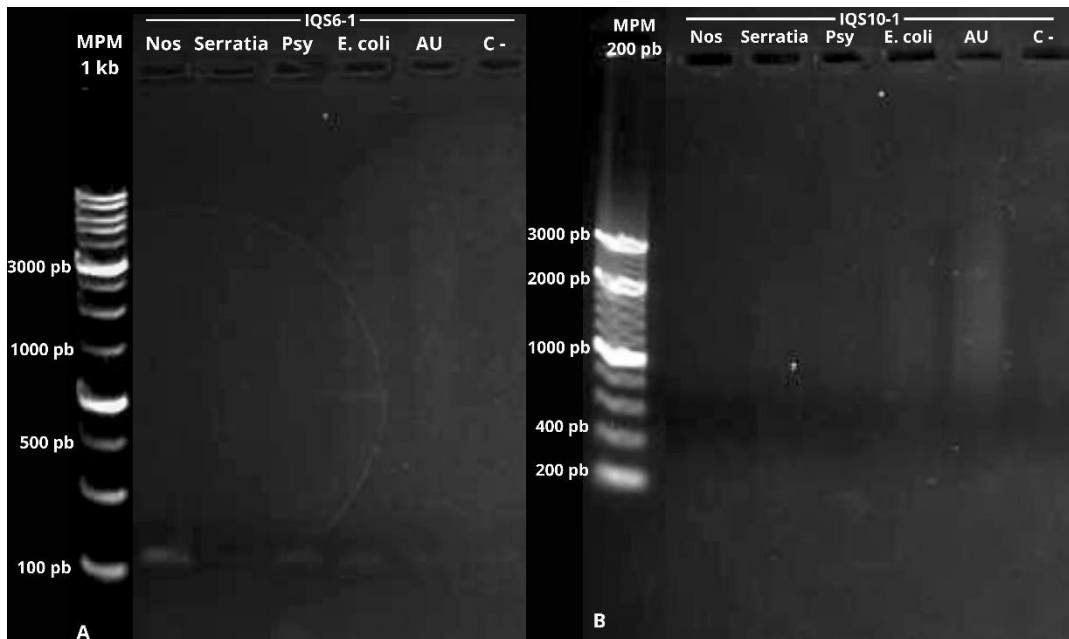
En el caso de los partidores MLuxS se obtuvo bandas de tamaño pequeño de aproximadamente 200 pb. Utilizando programas bioinformáticos se obtuvo un resultado que los partidores amplifican un tamaño de fragmento de 372 pb (Lamas-Samanamud et al., 2023). En *P. syringae* no se observa un resultado de amplificación, lo que es esperable de acuerdo con la literatura donde se describen autoinductores sólo de tipo 1 (AHL) para esta especie (Morohoshi et al. 2020). En la Figura 14C se observa una banda de la amplificación PCR de un tamaño sugerible al fragmento de 372 pb en *M. aeruginosa*. Este par de partidores fueron utilizado para la especie mencionada (Lamas-Samanamud et al., 2023), sin embargo, en la base de datos Bioinformatica no existe relación sobre este gen en *Microcystis aeruginosa*.

Anteriormente se menciona que el sistema de comunicación por el gen LuxS se tiene ampliamente descrito en una variedad de bacterias (Doherty et al., 2006). Las bacterias pueden regular más de un mecanismo de comunicación, como *Serratia* sp. que utiliza dos tipos de moléculas autoinductoras (AHL o AI-1 y AI-2) (Hu Zhu et al., 2008), por lo que se ha propuesto que la señalización de AI-2 cumple un papel intra e interespecies para regular las funciones de los grupos microbianos (Doherty et al., 2006; Liu et al., 2022), lo que sugiere que sea posible la presencia de este gen en *M. aeruginosa*, sin embargo, habría que realizar más estudios, para poder asegurar la identidad de este gen.



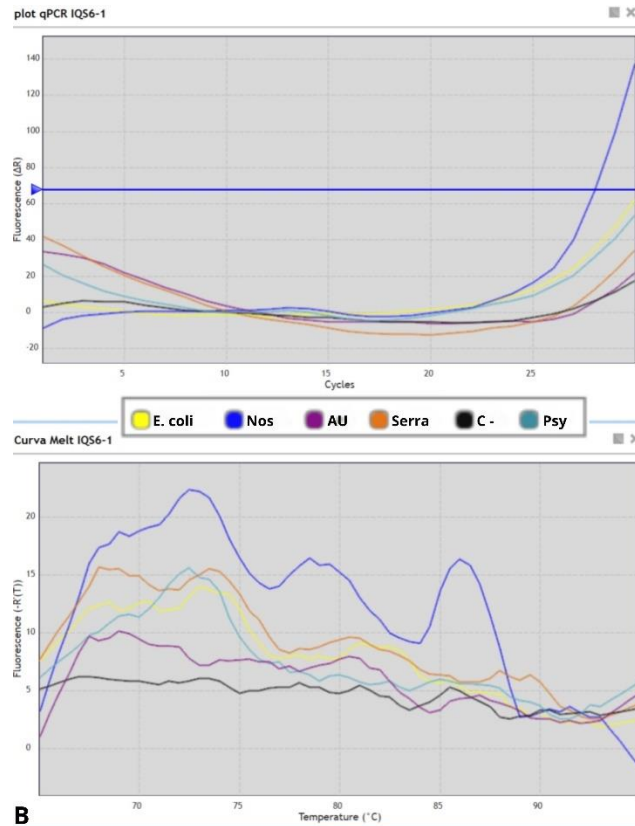
**Figura 14:** Gráficos de curva de qPCR y curva de melting para gen LuxS. A) Resultado de qPCR con los partidores FluxS de *Serratia* sp. B) Resultados de amplificación qPCR con partidores LuxS de *M. aeruginosa*.

El hecho de que el rango de Cq sea variable (Figura 14 A) puede deberse a variaciones técnicas o biológicas de la muestra (Weissensteiner & Lanchbury, 1996). Sin embargo, el control negativo tiene un Cq del mismo rango que la secuencia objetivo, esto puede sugerir que la cantidad de la secuencia objetivo en la muestra es menor que la del control o bien que las muestras hayan presentado un falso positivo por un “contaminante general” que se puede comparar con el resultado de electroforesis en gel de agarosa (Fig 13A). Esta contaminación ocurre a través de medios tales como reactivos, desechables de laboratorio, equipos o en el medio ambiente (Borst et al., 2004). A pesar de las posibles interferencias en los resultados obtenidos en la Figura 14 A, se puede sugerir que es detectable el fragmento de 102 pb en las muestras de Nostocales, como también para *M. aeruginosa*, sin embargo, es de suma importancia repetir la amplificación y optimizar las condiciones de qPCR para mejorar la especificidad y sensibilidad de la detección.



**Figura 15:** Electroforesis en gel de agarosa del gen LuxI (IQS6-1 y IQS10-1) amplificado por PCR. A) Resultados de amplificaciones PCR para el gen LuxI (IQS-6-1) de las muestras de ADN de Nostocales. y las cepas bacterianas control. B) Resultados de amplificaciones de LuxI (IQS10-1) del ADN de la muestra de

Nostocales y las cepas bacterianas control. C-: Control negativo. MPM 1kb: Marcador de peso molecular 1 kb. MPM 200pb: Marcador de peso molecular 200 pb.



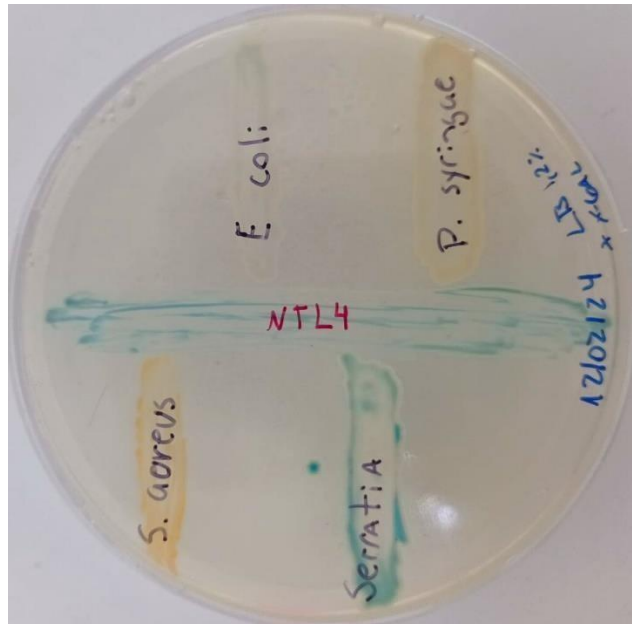
**Figura 16:** Gráficos de qPCR y curva de melting para gen *luxI*. No se observa amplificación PCR de las muestras de ADN para el gen *luxI* con partidores IQS6-1. C-: Control Negativo.

Para la amplificación de IQS6-1 e IQS10-1, a pesar de probar diferentes condiciones de amplificación PCR, no se logra distinguir ninguna banda de amplificación (Figura 15 y Figura 16), La falta de amplificación por PCR en estos microorganismos no necesariamente indica la ausencia de sistema de Quorum Sensing, sino que estos partidores del gen *luxI* pueden ser distintos de los sistemas *luxI*-*luxR* para estas especies (Eisenhofer et al., 2019). Estos partidores según un análisis filogenético son del grupo de Proteobacterias, pero no están

relacionadas con ninguna especie conocida y secuenciada (Hao et al., 2010), incluso clonaron el homólogo LuxI de IQS6-1, IQS10-1 y sintetizaron múltiples AHL, con estructuras novedosas y de cadenas largas (3-O-C14-AHL, 3-O-C16:1-AHL, 3-O-C12-AHL) (Hao et al., 2010), por lo que se sugiere que existe poca especificidad en los reporteros utilizados con las especies que se trabajó.

## **6.6 Screening de la producción de autoinductores por cianobacterias utilizando *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4)**

En el marco de nuestro estudio sobre la producción de autoinductores por cianobacterias, se llevó a cabo un ensayo utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Inicialmente se evaluó la actividad de autoinductores en las cepas bacterianas, estableciendo así una base sólida para posteriormente analizar con las muestras analizadas de cianobacterias. La validación inicial de la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) fue esencial para garantizar la fiabilidad de los resultados (Figura 17). Se observó que la cepa de *Serratia* sp. indujo una respuesta positiva en la cepa biosensora, evidenciando la producción de autoinductores. Por otro lado, en *E. coli*, *P. syringae* y *S. aureus*, no se detectó la presencia de autoinductores de acil homoserina lactona de cadena larga.



**Figura 17:** Placa biosensora probando controles de cepas bacterianas (*S. aureus*, *Serratia sp*, *P. syringae* y *E. coli*).

Se observa las distintas estrías de los diferentes géneros bacterianos, en la cual la cepa biosensora está respondiendo a la presencia de autoinductores de cadena larga producidos por *Serratia sp*. En cambio *P. syringae*, *S. aureus* y *E. coli* no se produce ninguna coloración azulada, lo que se debe a la ausencia de autoinductores AHL de cadena larga.

En *Serratia sp.*, se ha documentado la presencia de una variedad de moléculas de señalización en esta bacteria, incluyendo C4-AHL, C6AHL, 3-oxo-C6AHL, C7-AHL, C8-AHL (Van Houdt et al., 2007), como también a C10-AHL, C12AHL (Kawaguchi et al., 2008). La observación de una coloración azulada en la sección inoculada con *A. tumefaciens* NTL4 en presencia de *Serratia sp.* sugiere la activación de Quorum Sensing, y por ende valida su uso como control positivo en el ensayo posterior.

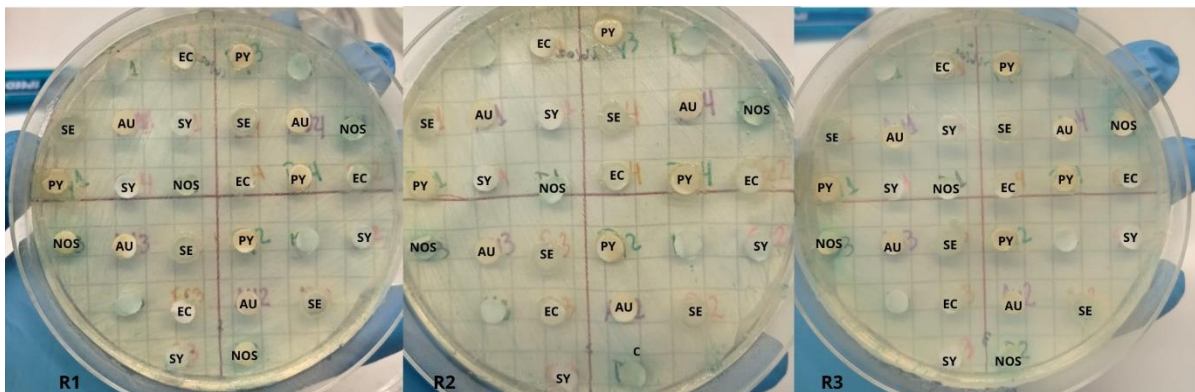
Por otro lado, *S. aureus*, conocida por su comunicación a través de péptidos señalizadores, se estableció como un control negativo fiable en nuestro sistema de detección (Yarwood & Schlievert, 2003). Esta elección se basa en su mecanismo de señalización diferenciado, que no implica la producción de AHL, lo cual es crucial para la especificidad de nuestros ensayos. En cuanto, *E. coli*, se ha determinado que esta bacteria no es capaz de sintetizar moléculas de AHL debido a la ausencia de un gen que codifique la AHL sintasa, sin embargo, produce una proteína similar al gen receptor luxR (gen SdiA) (Walters & Sperandio, 2006; Wang et al., 1991). Además, *E. coli* cuenta con un sistema de Quorum Sensing LuxS (Surette et al., 1999), por lo que también se puede sugerir como control negativo. En cuanto el inóculo de *P. syringae* no generó una coloración azulada del biosensor. Esta bacteria debería ser capaz de sintetizar autoinductores como el C6-AHL y el 3-oxo-C6-AHL, los cuales pueden ser detectados por la cepa biosensora utilizada en nuestro estudio (Fuqua et al., 1994; Morohoshi et al., 2020), nuestros ensayos no reflejaron esta capacidad. Esta discrepancia llevó a considerar factores adicionales que podrían influir en la producción de autoinductores.

Es sabido que en los sistemas de Quorum Sensing, la producción de autoinductores puede ser altamente variable, dependiendo de una serie de factores como las condiciones ambientales, la fase de crecimiento bacteriano y la expresión de genes específicos involucrado en su síntesis (Venturi, 2006). En este caso, es posible que las condiciones particulares bajo las cuales se llevó a cabo el ensayo no fueran las óptimas para inducir la producción de autoinductores en *P. syringae*.

Además, es importante destacar que *P. syringae* posee un sistema regulatorio complejo, que incluye múltiples reguladores como GacA/GacS y AefR (Venturi, 2006). Estos reguladores pueden tener un papel significativo en la modulación de la producción y respuesta a los autoinductores, por lo que la interacción entre estos sistemas regulatorios y la importancia de considerar el contexto ambiental y

fisiológico podría haber influido en la ausencia de detección de autoinductores en los ensayos.

Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de sensidiscos utilizando sobrenadantes de las cianobacterias Nostocales y *Synechococcus* sp. Este enfoque nos permitió evaluar la presencia de autoinductores de cadena larga en estas cianobacterias utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (Figura 18).



**Figura 18:** Fotografías de la actividad de AHL de cadena larga con sobrenadante de cianobacterias. Se observan 3 réplicas de placas reporteras, y en cada una hay 4 réplicas con sobrenadante. NOS: Nostocales, SY: *Synechococcus* sp., EC: *E. coli*, SE: *Serratia* sp., PY: *P. syringae*, AU: *S. aureus*.

Estos resultados se resumen en la Tabla 6, donde se detalla la respuesta obtenida de los diferentes sobrenadantes. La variabilidad en la detección de autoinductores entre estas especies es un punto de discusión importante, ya que, podría reflejar diferencias intrínsecas en los mecanismos de Quorum Sensing de cada género de cianobacteria, o posiblemente diferencias en las condiciones de cultivo o en la etapa de crecimiento en la que se encontraban las células al momento de la recolección del sobrenadante.

**Tabla 6:** Respuesta del ensayo con la cepa receptora *A. tumefasciens* NTL4 (pZLR4) del sobrenadante de cianobacterias en sensidiscos.

Especies	Nomenclatura	Placa 1				Placa 2				Placa 3			
Replicas		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Nostocales	NOS	±	+	±	+	+	+	+	+	+	±	+	±
<i>Synechococcus</i> sp.	SY	±	±	+	+	-	-	±	-	-	±	-	-
<i>Escherichia coli</i>	EC	-	+	+	-	-	-	±	-	±	-	±	-
<i>Serratia</i> sp.	SE	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	+	±
<i>Staphylococcus aureus</i>	AU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	PY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Simbología: (+) respuesta positiva. (-) respuesta negativa. (±) leve respuesta. R1: replica 1, R2: replica 2, R3: replica 3, R4: replica 4.

En el análisis de datos, las respuestas positivas se caracterizan por la presencia de una coloración azulada significativa alrededor o sobre los sensidiscos que contienen sobrenadante de las muestras analizadas, indicando la presencia de autoinductores (AHL) detectados por la bacteria biosensora *A. tumefasciens* NTL4. Por otro lado, las respuestas leves se identifican por una coloración azulada de menor intensidad en los sensidiscos, mientras que una respuesta negativa se determina por la ausencia de coloración azul en los sensidiscos, lo que indica la falta de presencia de autoinductores (AHL). Las réplicas de sobrenadantes con la muestra de Nostocales presento un 67% de respuestas positivas, esta cianobacteria mostró una capacidad considerable para producir autoinductores AHL de cadena larga, con un 33% de respuestas leves puede indicar que, aunque la producción de autoinductores es prominente, existe una variabilidad en su expresión o sensibilidad del sistema de detección. En *Synechococcus* sp. la respuesta positiva fue solo un 16,7% de las réplicas, junto con un 33% de respuestas leves, sugiriendo una actividad de Quorum Sensing menos pronunciada en comparación con la muestra del grupo Nostocales.

Estudios recientes evaluaron la respuesta de 9 AHL's sintéticos en *M. aureginosa* y *Cylindrospermopsis raciborskii*, este último perteneciente al orden Nostocales (Herrera & Echeverri, 2021), obtuvieron resultados que esta especie de cianobacteria responden a la presencia de autoinductores modulando la proliferación celular o la producción de toxinas dependiendo del tamaño del autoinductor AHL añadido. En nuestro estudio se demostró la presencia de AHL de cadena larga en los cultivos de cianobacterias del orden Nostocales y *Synechococcus* sp. Aunque no se ha mencionado investigaciones en el campo del Quorum Sensing en estos grupos, se ha estudiado bastante en la especie de *M. aureginosa* (Lamas-Samanamud et al., 2023; Wang et al., 2021; Xu et al., 2024; Yan et al., 2023; Zhai et al., 2012).

Lamentablemente no se logró realizar este ensayo en el cultivo de *M. aureginosa* debido a la contaminación cruzada que inhibió el crecimiento de colonias de *M. aureginosa*. Sin embargo, los estudios realizados con esta cepa refuerzan los resultados que sugiere la producción de autoinductores en el cultivo de cianobacterias. Recientemente se ha logrado identificar la presencia de una nueva molécula autoinductora  $C_{13}H_{19}O_8N$  utilizando una cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55, para posteriormente observar cómo se ven afectados los comportamientos de crecimiento, agregación, flotabilidad y producción de MRC-LR (Xu et al., 2024).

Para nuestras cepas controles, *Serratia* sp, se evidenció un alto porcentaje de respuesta positiva (75%), confirmando su capacidad conocida para producir autoinductores AHL, la presencia de un 16,7% de respuestas leves, se podría atribuir a variaciones en la concentración de autoinductores. Para *S. aureus* no se activó la producción azulada de la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (Yarwood & Schlievert, 2003) debido a que presentan un tipo de mecanismo de comunicación con péptidos.

## 6.7 RECOMENDACIONES FUTURAS

Para poder verificar que la actividad de autoinductores se produzca por la cianobacteria, es necesario someter los cultivos a un riguroso proceso de aislamiento. En el estudio de Xu et al. (2024), sometieron a ultrasonido (150 W, 5 minutos), lavado por centrifugación, filtración y adición de antibióticos para purificar la cepa de *M. aeruginosa* y se verificó bajo un método de tinción DAPI y microscopía electrónica de barrido (SEM). En los cultivos realizados se logró controlar el crecimiento de células eucariotas utilizando cicloheximida y bajo microscopio la formación de colonias globosas de bacterias, sin embargo, la mínima presencia de estos puede interferir en la sensibilidad de la detección de autoinductores con la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4 (hasta 100nM) (Kawaguchi et al., 2008), por lo que implementar medidas de purificación en los cultivos garantizaría una mejor detección para los cultivos de cianobacterias.

A partir de la respuesta positiva de AHL de cadena larga, se puede realizar un análisis más limitado con los genes asociados a Quorum Sensing de bacterias productoras de AHL de cadena larga detectables con la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4 y probarlos en las cepas de cianobacterias.

## 7 CONCLUSIÓN

En relación con el primer objetivo específico, se logró avances significativos sobre la identificación taxonómica y aislamiento de cepas de cianobacterias, incluyendo Nostocales y *Synechococcus* sp. A pesar de no haber realizado secuenciación genética, que hubiera proporcionado una identificación más precisa.

En cuanto al segundo objetivo específico, la falta de amplificación específica para ciertas muestras y la posible contaminación destacan la necesidad de revisar otros posibles cebadores utilizados para mejorar la especificidad y así prevenir la obtención de resultados falsos positivos.

Es importante destacar que la identificación de genes de Quorum Sensing en cianobacterias es un área compleja y relativamente nueva en la investigación microbiológica. La falta de detección de estos genes en la investigación no descarta su presencia; más bien, destaca la necesidad de optimizar las condiciones de PCR o los partidores utilizados no fueron óptimos para su detección.

Los resultados obtenidos para el último objetivo específico sugieren evidencia significativa en apoyo de la hipótesis inicial de que las cianobacterias productoras de floraciones son capaces de sintetizar moléculas autoinducidas del tipo acilhomoserina lactona (AHL).

Con esta investigación se ha logrado abrir nuevas perspectivas para la investigación sobre la regulación del comportamiento celular en cianobacterias y su impacto en los ecosistemas acuáticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, A., Almanza, V., Haakonsson, S., Palacio, H., Rodas, G., Barros, M., Capelo, J., Urrutia, R., Aubriot, L., & Bonilla, S. (2023). Cyanobacterial bloom monitoring and assessment in Latin America. *Harmful Algae*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102429>
- Almanza Marroquín, V. (2016a). Floraciones de fitoplancton en ambientes eutróficos Dinámica y factores condicionantes en los lagos someros de Concepción, Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción, Chile.
- Almanza, V., Parra, O., & Bicudo, C. (2016b). Guía Para el Estudio de Cianobacterias en el sistema la cumbre del Gran Concepción: aspectos taxonómicos, ecológicos, toxicológicos y de control-vigilancia. *Rev. EULA-CHILE Centro de Ciencias Ambientales*, 4(1), 11-100.
- Almanza, V., Pedreros, P., Laughinghouse IV, H., Féliz, J., Parra, O., Azócar, M., & Urrutia, R. (2019). Association between trophic state, watershed use, and blooms of cyanobacteria in south-central Chile. *Limnologica*, 75, 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2018.11.004>
- Andrinolo, D., Sedan, D., Petcheneshsky, T., & Giannuzzi, L. (2017). Cianotoxinas. Farmacología y efectos de las principales toxinas presentes en Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. 49- 66.

- Bakaraki, N., Chormey, D. S., Bakirdere, S., & Engin, G. O. (2016). Development of a sensitive liquid–liquid extraction method for the determination of N-butyryl-homoserine lactone produced in a submerged membrane bioreactor by gas chromatography mass spectrometry and deuterated anthracene as the internal standard. *Analytical Methods*, 8(12), 2660-2665. <https://doi.org/10.1039/C6AY00317F>
- Bandara, H., Lam, O., Jin, L., & Samaranayake, L. (2012). Microbial chemical signaling: a current perspective. *Critical reviews in microbiology*, 38(3), 217-249. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.652065>
- Bao, J., Guo, D., Jin, L., Li, T., & Shi, H. (2022). Accurate identification of diverse Nacyl homoserine lactones in marine *Vibrio fluvialis* by UHPLC-MS/MS. *Current microbiology*, 79(6). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02879-5>
- Beltrán, J. B., Lara, F., Castillo, L., & Muñoz, N. Una aproximación interdisciplinaria al estudio de floraciones de algas nocivas (FAN) en lagos urbanos en Chile. *Desarrollo sustentable*, 1, 133-146.
- Bonilla, S., Aguilera, A., Aubriot, L., Huszar, V., Almanza, V., Haakonsson, S., Izaguirre, I., O'farrell, I., Salazar, A., & Becker, V. (2023). Nutrients and not temperature are the key drivers for cyanobacterial biomass in the Americas. *Harmful Algae*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102367>
- Borst, A., Box, A., & Fluit, A. (2004). False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 23, 289-299. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1100-1>

- Brown, E., Cepeda, M., Mascuch, S., Poulson-Ellestad, K., & Kubanek, J. (2019). Chemical ecology of the marine plankton. *Natural Product Reports*, 36, 1093-1116. <https://doi.org/10.1039/C8NP00085A>
- Callieri, C. (2008). Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater reviews*, 1, 1-28. <https://doi.org/10.1608/FRJ-1.1.1>
- Callieri, C. (2017). Synechococcus plasticity under environmental changes. *FEMS Microbiology Letters*, 364(23), 1-8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx229>
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R., & Eaglesham, G. K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109(7), 663-668. <https://doi.org/doi:10.1289/ehp.01109663>
- Chhabra, S. R., Philipp, B., Eberl, L., Givskov, M., Williams, P., & Cámara, M. (2005). Extracellular communication in bacteria. *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*, 279-315. <https://doi.org/10.1007/b98319>
- Chorus, I., & Bartram, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, World Health Organization, 72-125. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>

- Chorus, I., Fastner, J., & Welker, M. (2021). Cyanobacteria and Cyanotoxins in a Changing Environment: Concepts, Controversies, Challenges. *Water*, 13(18). <https://doi.org/10.3390/w13182463>
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., & Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5074-5078. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501526102>
- Deglint, J. L., Jin, C., & Wong, A. (2018). Investigating the automatic classification of algae using fusion of spectral and morphological characteristics of algae via deep residual learning. *Cornell University*, 1-19. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1810.10889>
- Carmo Bittencourt-Oliveira, M. (2003). Detection of potential microcystinproducing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. *Harmful Algae*, 2(1), 51-60. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00004-0)
- Doherty, N., Holden, M. T., Qazi, S. N., Williams, P., & Winzer, K. (2006). Functional analysis of luxS in *Staphylococcus aureus* reveals a role in metabolism but not quorum sensing. *Journal of bacteriology*, 188(8), 2885-2897. <https://doi.org/10.1128/jb.188.8.2885-2897.2006>
- Eisenhofer, R., Minich, J. J., Marotz, C., Cooper, A., Knight, R., & Weyrich, L. S. (2019). Contamination in low microbial biomass microbiome studies: issues and recommendations. *Trends in microbiology*, 27(2), 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.11.003>

- Fuqua, W., Winans, S., & Greenberg, E. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269-275. <https://dx.doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Genuario, D. B., Sant'Anna, C. L., & Melo, I. S. (2018). Elucidating the Cronbergia (Cyanobacteria) dilemma with the description of Cronbergia amazonensis sp. nov. isolated from Solimões river (Amazonia, Brazil). *Algal research*, 29, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.034>
- Giannakopoulos, C., Panou, M., & Gkelis, S. (2024). Phylogenetic analysis of Nostocales (Cyanobacteria) based on two novel molecular markers, implicated in the nitrogenase biosynthesis. *FEMS microbiology letters*, 371, 1-8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnad136>
- Giannuzzi, L., Amé, M., Andrinolo, D., Bauzá, L., Benítez, R., Titto, E., Echenique, R., Hansen, M., Kolman, M., & Petcheneshsky, T. (2011). Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud, Benitez R. & de Titto E. (Ed). *Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación, Argentina*.
- Grewe, C. B., & Pulz, O. (2012). The biotechnology of cyanobacteria. In *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*, Springer, 707-739. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3\\_26](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_26)
- Hao, Y., Winans, S., Glick, B., & Charles, T. (2010). Identification and characterization of new LuxR/LuxI-type quorum sensing systems from metagenomic libraries. *Environmental Microbiology*, 12(1), 105-117. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02049.x>

Hept, M. A., & Greene, L. H. (2023). Extracting high-molecular weight DNA from cyanobacteria using Promega's Wizard® HMW DNA extraction kit with a modified protocol, METIS. *MethodsX*, 11, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102341>

Herrera, N., & Echeverri, F. (2021). Evidence of quorum sensing in cyanobacteria by homoserine lactones: the origin of blooms. *Water*, 13, 1-15. <https://doi.org/10.3390/w13131831>

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. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>

Jacinavicius, F. R., Gama Júnior, W., Azevedo, M. d. P., & Santanna, C. (2013). Manual para cultivo de cianobactérias. *São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa em Ficologia*, 1-32.

Jayaraman, A., & Wood, T. K. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 145-167. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536>

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. (2021). CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water research*, 196, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117017>

- Kalff, J. (2002). Chapter 4: Water Resources, Water Pollution, and Lakes. Limnology: inland water ecosystems. *Prentice Hall, Upper Saddle River*, 41-91.
- Kawaguchi, T., Chen, Y. P., Norman, R. S., & Decho, A. W. (2008). Rapid screening of quorum-sensing signal N-acyl homoserine lactones by an in vitro cell-free assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3667-3671. <https://doi.org/10.1128/AEM.02869-07>
- Komárek, J., Kopecký, J., & Cepák, V. (1999). Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes Cyanobium, Cyanobacterium and Synechococcus. *Cryptogamie Algologie*, 20(3), 209-222. [https://doi.org/10.1016/S0181-1568\(99\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S0181-1568(99)80015-4)
- Komárek, J., Zapomelova, E., & Hindak, F. (2010). *Cronbergia* gen. nov., a new cyanobacterial genus (Cyanophyta) with a special strategy of heterocyte formation. *Cryptogamie, Algologie*, 31(3), 321-341.
- Kosten, S., Huszar, V. L., Bécares, E., Costa, L. S., van Donk, E., Hansson, L. A., Jeppesen, E., Kruk, C., Lacerot, G., & Mazzeo, N. (2012). Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology*, 18(1), 118-126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02488.x>
- Kurmayer, R., & Kutzenberger, T. (2003). Application of Real-Time PCR for Quantification of Microcystin Genotypes in a Population of the Toxic Cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6723-6730. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.69.11.6723-6730.2003>

- Lamas-Samanamud, G., Montante, A., Mertins, A., Phan, D., Loures, C., Naves, F., Reeves, T., & Shipley, H. J. (2023). The Role of Quorum Sensing in the Development of *Microcystis aeruginosa* Blooms: Gene Expression. *Microorganisms*, *11*(2), 1-13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020383>
- Liu, L., Pohnert, G., & Wei, D. (2016). Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential. *Marine Drugs*, *14*(10), 1-19. <https://doi.org/10.3390/md14100191>
- Liu, X., Liu, Q., Sun, S., Sun, H., Wang, Y., Shen, X., & Zhang, L. (2022). Exploring AI-2-mediated interspecies communications within rumen microbial communities. *Microbiome*, *10*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01367-z>
- Loaiza-González, J. M., Rubio-Clemente, A., & Peñuela, G. A. (2023). Aplicación de ultrasonido para el control de cianobacterias y la degradación de cianotoxinas. *Revista UIS Ingenierías*, *22*(4), 51-60. <https://doi.org/10.18273/revuin.v22n4-2023005>
- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC* (15), 1-10.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., & Bycroft, B. W. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, *143*(12), 3703-3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>

- Ming, H., Yan, G., Zhang, X., Pei, X., Fu, L., & Zhou, D. (2022). Harsh temperature induces *Microcystis aeruginosa* growth enhancement and water deterioration during vernalization. *Water research*, 223, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118956>
- Morohoshi, T., Oshima, A., Xie, X., & Someya, N. (2020). Genetic and functional diversity of Psyl/PsyR quorum-sensing system in the *Pseudomonas syringae* complex. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2), 1-12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa254>
- Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of bacteriology*, 104(1), 313-322. <https://doi.org/10.1128/jb.104.1.313-322.1970>
- Niu, C., Robbins, C. M., Pittman, K. J., Osborn, J. L., Stubblefield, B. A., Simmons, R. B., & Gilbert, E. S. (2013). LuxS influences *Escherichia coli* biofilm formation through autoinducer-2-dependent and autoinducer-2-independent modalities. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(3), 778-791. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12034>
- Oliveira de Fernandes, V., Cavati, B., de Oliveira, L. B., & de Souza, B. D. Â. (2009). Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. *Oecologia Brasiliensis*, 13(2), 247-258.
- Oliver, R., & Ganf, G. (2000). Freshwater blooms. In *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, Springer, 149-194.

Omidi, A., Esterhuizen-Londt, M., & Pflugmacher, S. (2018). Still challenging: the ecological function of the cyanobacterial toxin microcystin—What we know so far. *Toxin reviews*, 37(2), 87-105. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1326059>

Paerl, H. (2014). Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. *Life*, 4(4), 988-1012. <https://doi.org/10.3390/life4040988>

Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental microbiology reports*, 1(1), 27-37. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x>

Pagels, F., Guedes, A. C., Vicente, A. A., & Vasconcelos, V. (2023). CyanobacteriaBased Bioprocess for Cosmetic Products—Cyanobium sp. as a Novel Source of Bioactive Pigments. *Phycology*, 3(1), 47-64. <https://doi.org/10.3390/phycolgy3010004>

Pantoja, C. (2023). *Cianobacterias como indicador biológico de cuerpos de agua eutrofizados en zona centro sur de Chile*, tesis para optar al título de Ingeniería en Energía y Sustentabilidad Ambiental, Universidad San Sebastián, Concepción.

Parker, C. T., & Sperandio, V. (2009). Cell-to-cell signalling during pathogenesis. *Cellular microbiology*, 11(3), 363-369. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01272.x>

- Pedraza, A. C., Chona, J. A. R., Maldonado, J. I. M., & Carrillo, J. L. O. (2016). Estudio cinético de bacterias metanogénicas a diferentes temperaturas. *Bistua Revista De La Facultad De Ciencias Basicas*, 14(1), 38-46.
- Pereira, D. A. (2014). Quorum sensing em cianobactérias [tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre]. Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Pérez de Castro, A. M. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), guía práctica, Universidad de Valencia, *Departamento de Biotecnología*, 1-10.
- Rodríguez González, M. Á. (2022). Aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal con actividad quorum quenching frente a estrés biótico y abiótico, tesis para optar al título de Doctor en Biología Fundamental y de Sistemas, Universidad de Granada, *Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología*, 1-291.
- Rosselló, G. A. M., & Bouza, J. M. E. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clínica*, 141(8), 353-357. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.02.031>
- Sant'Anna, C. L., Melcher, S. S., Carvalho, M. d. C., Gelmego, M. P., & Azevedo, M. T. d. P. (2007). Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 30, 1-17. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042007000100002>

- Schauder, S., & Bassler, B. L. (2001). The languages of bacteria. *Genes & development*, 15(12), 1468-1480. <https://doi.org/10.1101/gad.899601>
- Sena D'Anna, L., De Sisto, A., Duque, Z., Rojas, D., & Naranjo, L. (2013). Análisis morfológico y localización de las especies bacterianas que cohabitan con la cianobacteria *Arthrospira* sp. Utilizando microscopía electrónica de barrido. *Acta Microscopica*, 22(2), 195-204.
- Sena, L., Rojas, D., Montiel, E., González, H., Moret, J., & Naranjo, L. (2011). A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. cyanobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1045-1053. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0549-6>
- Shao, J., Wu, Z., Yu, G., Peng, X., & Li, R. (2009). Allelopathic mechanism of pyrogallol to *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (Cyanobacteria): from views of gene expression and antioxidant system. *Chemosphere*, 75(7), 924-928. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.021>
- Sharif, D. I., Gallon, J., Smith, C. J., & Dudley, E. (2008). Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeothece* PCC6909. *The ISME journal*, 2(12), 1171-1182. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.68>
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan Jr, J. E., Rinehart, K. L., & Farrand, S. K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), 6036-6041. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6036>

- Śliwińska-Wilczewska, S., Maculewicz, J., Barreiro Felpeto, A., & Latała, A. (2018). Allelopathic and bloom-forming picocyanobacteria in a changing world. *Toxins*, 10(1), 1-20. <https://doi.org/10.3390/toxins10010048>
- Smith, J. L., Boyer, G. L., & Zimba, P. V. (2008). A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, 280(14), 5-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.007>
- Steindler, L., & Venturi, V. (2007). Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00501.x>
- Stock, F., Bilcke, G., De Decker, S., Osuna-Cruz, C. M., Van den Berge, K., Vancaester, E., De Veylder, L., Vandepoele, K., Mangelinckx, S., & Vyverman, W. (2020). Distinctive growth and transcriptional changes of the diatom *Seminavis robusta* in response to quorum sensing related compounds. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01240>
- Stockner, J., Callieri, C., & Cronberg, G. (2002). Picoplankton and other non-bloomforming cyanobacteria in lakes. *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, 195-231. [https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7\\_7](https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_7)
- Surette, M. G., Miller, M. B., & Bassler, B. L. (1999). Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1639-1644. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1639>

Turan, N. B., Chormey, D. S., Büyükpınar, Ç., Engin, G. O., & Bakirdere, S. (2017). Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.007>

UNESCO. (2009). Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Bonilla, S. (Ed). Documento Técnico PHILAC, N° 16. Montevideo, Uruguay. 105pp.

Van Houdt, R., Givskov, M., & Michiels, C. W. (2007). Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 407-424. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00071.x>

Velázquez, L., Alejos, Martínez, & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 1, 1-26.

Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 274-291. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00012.x>

Walters, M., & Sperandio, V. (2006). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.041>

- Wang, J., Quan, C., Wang, X., Zhao, P., & Fan, S. (2011). Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. *Microbial biotechnology*, 4(4), 479-490. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00197.x>
- Wang, S., Ding, P., Lu, S., Wu, P., Wei, X., Huang, R., & Kai, T. (2021). Cell density dependent regulation of microcystin synthetase genes (mcy) expression and microcystin-LR production in *Microcystis aeruginosa* that mimics quorum sensing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112330>
- Wang, X., de Boer, P. A., & Rothfield, L. I. (1991). A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, 10(11), 3363-3372. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112330>
- Weissensteiner, T., & Lanchbury, J. S. (1996). Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. *Biotechniques*, 21(6), 1102-1108. <https://doi.org/10.2144/96216rr03>
- Whitton, B. A., & Potts, M. (2012). Introduction to the Cyanobacteria. In B. A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, Springer Netherlands. 1-13. DOI: [10.1007/0-306-46855-7](https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7)
- Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., Jørgensen, F., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P., & Stewart, G. S. (1998). Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 163(2), 185-192. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13044.x>

- Winson, M. K., Swift, S., Hill, P. J., Sims, C. M., Griesmayr, G., Bycroft, B. W., Williams, P., & Stewart, G. S. (1998). Engineering the luxCDABE genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn 5 constructs. *FEMS Microbiology Letters*, 163(2), 193-202. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13045.x>
- Xu, C., Ni, L., Li, S., Du, C., Sang, W., & Jiang, Z. (2024). Quorum sensing regulation in *Microcystis aeruginosa*: Insights into AHL-mediated physiological processes and MC-LR production. *Science of The Total Environment*, 919, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170867>
- Yan, G., Fu, L., Ming, H., Chen, C., & Zhou, D. (2023). Exploring an Efficient and Eco-Friendly Signaling Molecule and Its Quorum Quenching Ability for Controlling Microcystis Blooms. *Environmental Science & Technology*, 57(44), 16929-16939. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02395>
- Yang, C., Fang, S., Chen, D., Wang, J., Liu, F., & Xia, C. (2016). The possible role of bacterial signal molecules N-acyl homoserine lactones in the formation of diatom-biofilm (*Cylindrotheca* sp.). *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.010>
- Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2003). Quorum sensing in Staphylococcus infections. *The Journal of clinical investigation*, 112(11), 1620-1625. <https://doi.org/10.1172/JCI20442>

- Zamora, C., Nandini, S., & Sarma, S. (2023). Revisión de cianobacterias potencialmente nocivas. *Tecnología y ciencias del agua*, 14(3), 250-313. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-14-03-06>
- Zhai, C., Zhang, P., Shen, F., Zhou, C., & Liu, C. (2012). Does *Microcystis aeruginosa* have quorum sensing? *FEMS Microbiology Letters*, 336(1), 38-44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02650.x>
- Zhu, H., Thuruthyil, S. J., & Willcox, M. D. (2002). Determination of quorum-sensing signal molecules and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from contact lens-induced microbial keratitis. *Journal of medical microbiology*, 51(12), 1063-1070. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-12-1063>.
- Zhu, H., Sun, S.-J., & Dang, H.-Y. (2008). PCR detection of *Serratia* spp. using primers targeting pfs and luxS genes involved in AI-2-dependent quorum sensing. *Current microbiology*, 57, 326-330. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9197-6>