



# Detección de cianobacterias tóxicas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real

Gabriela Martínez de la Escalera <sup>a</sup>, Carla Kruk <sup>b,c</sup>, Angel Segura <sup>d</sup>, Claudia Piccini <sup>e</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Microbiología, IIBCE, MEC, Uruguay, gdlemartinez@iibce.edu.uy.*

<sup>b</sup>*Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay, ckruk@yahoo.com.*

<sup>c</sup>*PDU Ecología Funcional de Sistemas Acuáticos, CURE-Rocha, Uruguay, ckruk@yahoo.com.*

<sup>d</sup>*PDU Modelización y Análisis de Recursos Naturales, CURE-Rocha, Uruguay, asegura@cure.edu.uy.*

<sup>e</sup>*Departamento de Microbiología, IIBCE, MEC, Uruguay, cpiccini@iibce.edu.uy.*

**RESUMEN:** Las floraciones de cianobacterias producen cianotoxinas que provocan intoxicaciones en animales y humanos. Entre las más frecuentes se encuentran las microcistinas (hepatotoxinas) y saxitoxinas (neurotoxinas). En Uruguay, las floraciones de cianobacterias cada vez son más frecuentes, sin embargo, es escaso el desarrollo de herramientas para la predicción de su abundancia y toxicidad y fáciles de implementar. En este trabajo se puso a punto un método cuantitativo para la detección de cianobacterias productoras de microcistina y saxitoxinas basado en PCR cuantitativo en tiempo real. El blanco de la amplificación fueron genes codificantes de enzimas de la biosíntesis de toxinas. Mediante curvas de calibración se infirió la abundancia de células potencialmente tóxicas en muestras de agua. Dicho método fue aplicado a distintas muestras naturales desde el embalse de Salto Grande hasta Punta del Este. El método fue exitoso en todos los sitios evaluados y tuvo límite inferior de cuantificación extremadamente bajo (2 células por mililitro). El producto de este trabajo es una metodología novedosa para la evaluación directa del potencial tóxico en agua que puede ser utilizada para el monitoreo y gestión, así como también para la creación de una base de datos biológicos como insumo para modelos de predicción de floraciones.

**PALABRAS CLAVE:** cianobacterias tóxicas, floraciones, PCR en tiempo real, muestras de agua

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Floraciones de cianobacterias tóxicas*

La pérdida de calidad de agua y el desarrollo de floraciones de cianobacterias (crecimiento poblacional abrupto y masivo) son problemáticas actuales en Uruguay y el mundo [1-3]. Las floraciones de cianobacterias afectan la transparencia, concentración de oxígeno y biodiversidad, generando olor y sabor desagradable [6]. Además tienen la capacidad de producir toxinas (cianotoxinas) que afectan al ser humano y animales por contacto, inhalación de vapores y/o consumo del agua [7]. El aumento de la concentración de nutrientes generado por actividades agropecuarias con uso intensivo de fertilizantes y el vertido de desechos no procesados son una de las principales causas del aumento de la frecuencia e intensidad de las floraciones [8,9]. Otras causas son las modificaciones físicas (represamiento, destrucción de la vegetación ribereña) y uso de herbicidas [10,11]. Las floraciones generan inconvenientes sanitarios y sociales, así como importantes pérdidas económicas y de conservación [6,12,13].

Existen diversas especies de cianobacterias que producen floraciones potencialmente tóxicas. Además, las especies pueden producir más de una toxina, y pueden existir poblaciones con o sin

esta capacidad, las condiciones ambientales también afectan la producción [14]. Entre las especies más comunes se encuentran las del género *Microcystis* (Orden Chroococcales) que forman densas floraciones superficiales y pueden producir microcistinas (hepatotoxina) [15]. Otros géneros también producen microcistinas (e.g. *Planktothrix*, *Dolychospermum*); siendo una de las toxinas más frecuentes. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Orden Nostocales) es otra especie frecuente y que está aumentando su distribución geográfica [16]. Esta especie puede producir dos potentes toxinas, cylindrospermopsina (hepatotoxina) y saxitoxina (neurotoxina). Ambas especies, *M.aeruginosa* y *C.raciborskii*, son frecuentes en nuestro país en lagos y aguas corrientes, incluso en aquellas utilizadas como fuente de agua potable, para riego y con fines recreativos [3,17,18].

### 1.2 Bases genéticas de la síntesis de cianotoxinas: microcistinas y saxitoxinas

Se ha descrito que la biosíntesis de las microcistinas se realiza de manera no ribosomal por complejo enzimático polikétido sintetasa [19], el cual está codificado por el cluster genético *mcy*. Este cluster contiene 10 genes, los seis genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyG* codifican al complejo multienzimático sintasa/sintetasa, mientras que el resto de los genes, *mcyF*, *mcyI* y *mcyJ*, codifican para proteínas cuya función es epimerización, deshidratación, y O-metilación respectivamente [20].

La ruta biosintética de las saxitoxinas involucra más de 30 pasos codificados en 26 genes que forman el cluster *sxt* (con genes asignados como *sxtA* a *sxtZ*) [21]. Uno de los genes de la biosíntesis de saxitoxina es *stxI*, el cual codifica para una O-carbamiltransferasa cuya función es la carbamilación de la cadena lateral de hidroximetilo, precursor de la saxitoxina. Se ha visto que genes ortólogos a *stxI* están presentes únicamente en cepas de cianobacterias tóxicas y tienen una gran similitud de secuencia. Esto ha llevado a que se postulara que este gen está presente exclusivamente en organismos procariotas y se caracteriza por una alta tasa de transferencia horizontal [22].

### 1.3 Cuantificación de cianobacterias tóxicas

En Uruguay, las cianobacterias son monitoreadas mediante indicadores no específicos como clorofila-a o de forma específica en microscopio, procesos que requieren horas de preparación, personal específico y no permiten detectar toxicidad. Para cianotoxinas en agua se utiliza ensayo de inhibición de fosfatasa, ELISA (ensayo de inmunoabsorción), HPLC (cromatografía líquida de alta performance), LC-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas), y NMR (resonancia magnética nuclear) [23]. Estos métodos, aunque son sensibles y específicos, requieren equipamiento costoso y personal especializado, no son adecuados para aplicar a un gran número de muestras. Además, dado que existen centenares de variantes de algunas cianotoxinas (ej. microcistina, saxitoxina), no se cuenta con todos los estándares necesarios para su detección. Es necesario desarrollar métodos de detección de cianobacterias que sean rápidos, sensibles, confiables, accesibles y que permitan conocer el potencial tóxico de las cianobacterias. Entre los métodos moleculares se encuentra la detección de genes de las enzimas responsables de la síntesis de toxinas [24], con énfasis en aquellos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La técnica PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) es una herramienta promisorio para la detección y cuantificación de cianobacterias productoras de microcistinas y saxitoxinas: permite determinar la presencia de amplificación en horas, detectar poblaciones tóxicas con baja densidad de células [23], procesar un gran número de muestras en corto tiempo y trabajar con muestras naturales complejas.



## 2 OBJETIVO

El objetivo de esta propuesta fue desarrollar y poner a punto un método cuantitativo, específico y sensible para detectar la presencia de cianobacterias productoras de microcistinas y saxitoxinas basado en PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).

## 3 ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

La estrategia fue generar protocolos para amplificar de manera específica, altamente sensible y cuantitativa, genes de las rutas biosintéticas de microcistina y saxitoxinas mediante qPCR. Para los protocolos de qPCR se emplearon *primers*, tanto de la literatura como diseñados en nuestro laboratorio. Para comprobar la especificidad de los *primers* y poner a punto el protocolo de qPCR se utilizaron cepas de cianobacterias en cultivos uniaxiales a concentraciones celulares conocidas y cuantificadas por microscopía. Además, la especificidad de los *primers* fue confirmada mediante secuenciación de los amplicones. Para la cuantificación absoluta de las copias de los genes en muestras de agua, los fragmentos de ADN amplificados y confirmados en su especificidad se clonaron y se realizaron curvas de calibración mediante diluciones seriadas de los clones. Una vez puesta a punto la metodología para muestras de cianobacterias en cultivo, se procedió a ajustar los parámetros para emplearlo en muestras ambientales. Para ello, se utilizaron muestras naturales de agua obtenidas a lo largo del gradiente río Uruguay-Río de la Plata de frecuencia estacional en seis puntos del gradiente.

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Selección de los primers

Se seleccionaron *primers* de la literatura dirigidos a genes que codifican para la biosíntesis de microcistinas, los cuales se encuentran en el operón *mcy* responsable de la biosíntesis de microcistinas: *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ* [25-28]. Para saxitoxinas se analizaron dos genes blanco, *sxtI* y *sxtU*, involucrados en la síntesis de la misma. Los *primers* para la amplificación de *sxtI* y *sxtU* han sido diseñados previamente en nuestro laboratorio basándonos en cultivos de *Cylindrospermopsis raciborskii*, una cianobacteria productora de saxitoxina [29].

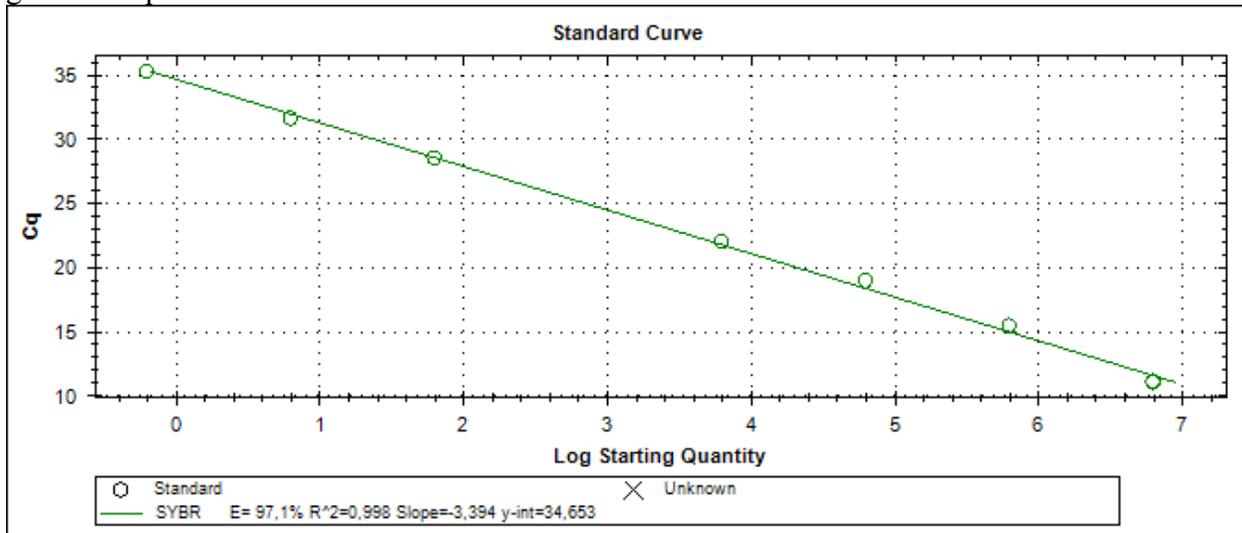
### 4.2 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Se utilizó un método químico-enzimático puesto a punto en el Departamento de Microbiología del IIBCE para la extracción de ADN de muestras de agua [30]. Se puso a punto una metodología basada en qPCR para determinar la presencia y abundancia de cianobacterias productoras de microcistinas y saxitoxinas en muestras de agua. Para las reacciones se usó el kit *Power SYBR Green PCR* (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l: 9,5  $\mu$ l de agua, 0,5  $\mu$ l de BSA (30mg ml<sup>-1</sup>), 7,76  $\mu$ l de mix (*Power SYBR Green PCR*), 0,12  $\mu$ l de cada *primer* (50  $\mu$ M) y 2  $\mu$ l de ADN de la muestra. El termociclador utilizado para los ensayos de qPCR fue *Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BIO RAD) y las condiciones de ciclado fueron: 2 min a 50°C, 15 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C. Al final se realizó la

curva de *melting* desde 65°C a 95°C, en incrementos de 1°C cada 4 sec. para confirmar la especificidad del fragmento amplificado.

#### 4.3 Curva de calibración y cuantificación del número de copias génicas

La eficiencia de amplificación de los genes fue determinada empleando vectores (plásmidos) que contienen los fragmentos génicos clonados. Para la clonación de los genes *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* y *mcyJ* se utilizó la cepa Baygorria140313 de *Microcystis* (proveniente del embalse de Baygorria, Río Negro) y para los genes *sxtI* y *sxtU* se utilizó la cepa MVCC19 de *Cylindrospermopsis raciborskii* (proveniente de los lagos artificiales de Carrasco), el vector TOPO 2.1 (TOPO-TA *cloning kit*, Invitrogen) y células competentes *Escherichia coli*. Para cuantificar el número de copias de cada gen en las muestras se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  de los genes clonados, se realizó el ajuste de la curva (Figura 1) y se determinó el número de copias. Una vez conocido el número de copias génicas que contenía cada reacción de PCR se calculó el número original de copias en la muestra.



**Figura 1.** Ejemplo de una curva de calibración del gen *mcyE*. Valor mínimo corresponde a 0,62 copias/ul y el valor máximo  $6,2 \times 10^6$  copias/ul.

#### 4.4 Muestras

Se tomaron muestras de agua del río Uruguay y Río de la Plata, desde el embalse de Salto Grande, hasta Punta del Este, cada tres meses (2013 -2014). Se midió profundidad, temperatura, pH, conductividad, oxígeno, salinidad y nutrientes. Se tomaron muestras para cuantificar clorofila-a, biovolumen de fitoplancton y biovolumen de cianobacterias y se registro la presencia de colonias y floraciones de cianobacterias a simple vista, así como también se cuantificaron microcistinas y saxitoxinas.



Asociación de Universidades  
GRUPO MONTEVIDEO



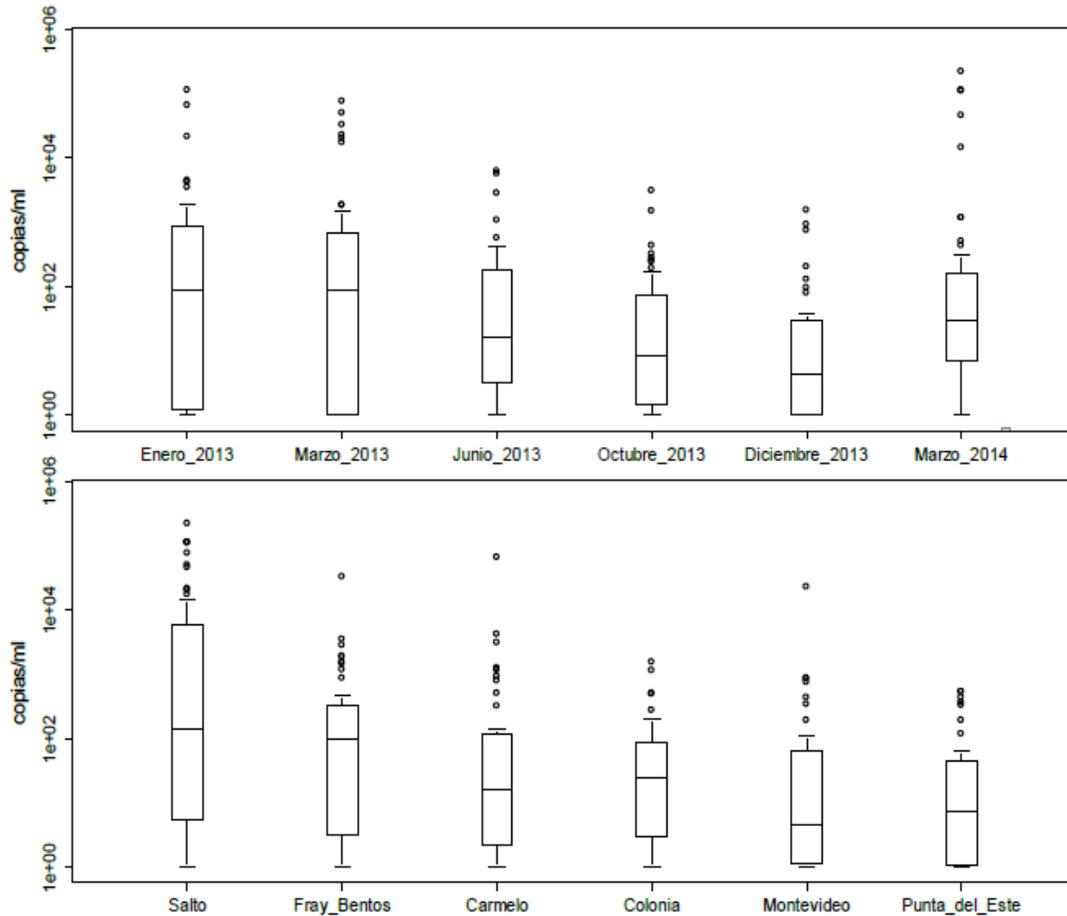
## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 *Puesta a punto de la metodología*

Se puso a punto una metodología basada en qPCR para determinar la presencia y abundancia de cianobacterias productoras de microcistina y saxitoxinas en muestras de agua. Se confirmó la especificidad de los *primers* mediante ensayos de qPCR. Aquellos *primers* que se emplearon como específicos para los cuatro genes del *cluster* para la biosíntesis de microcistinas (*mcy*) no amplificaron ADN de cianobacterias no productoras de microcistinas, tales como cepas de *Planktothrix* sp., *Cylindrospermopsis* sp. y *Dolichospermum* sp., las que fueron previamente analizadas para confirmar la ausencia de microcistina. Únicamente se obtuvo amplificación cuando se empleó ADN de *Microcystis* sp. aisladas de ecosistemas acuáticos de nuestro país. En relación la especificidad de los primers para los dos genes que codifican para las enzimas que sintetizan saxitoxinas (*sxt*), solo se obtuvo amplicón utilizando ADN de *Cylindrospermopsis raciborskii* previamente identificadas como productoras de dicha toxina.

### 5.2 *Genes mcy*

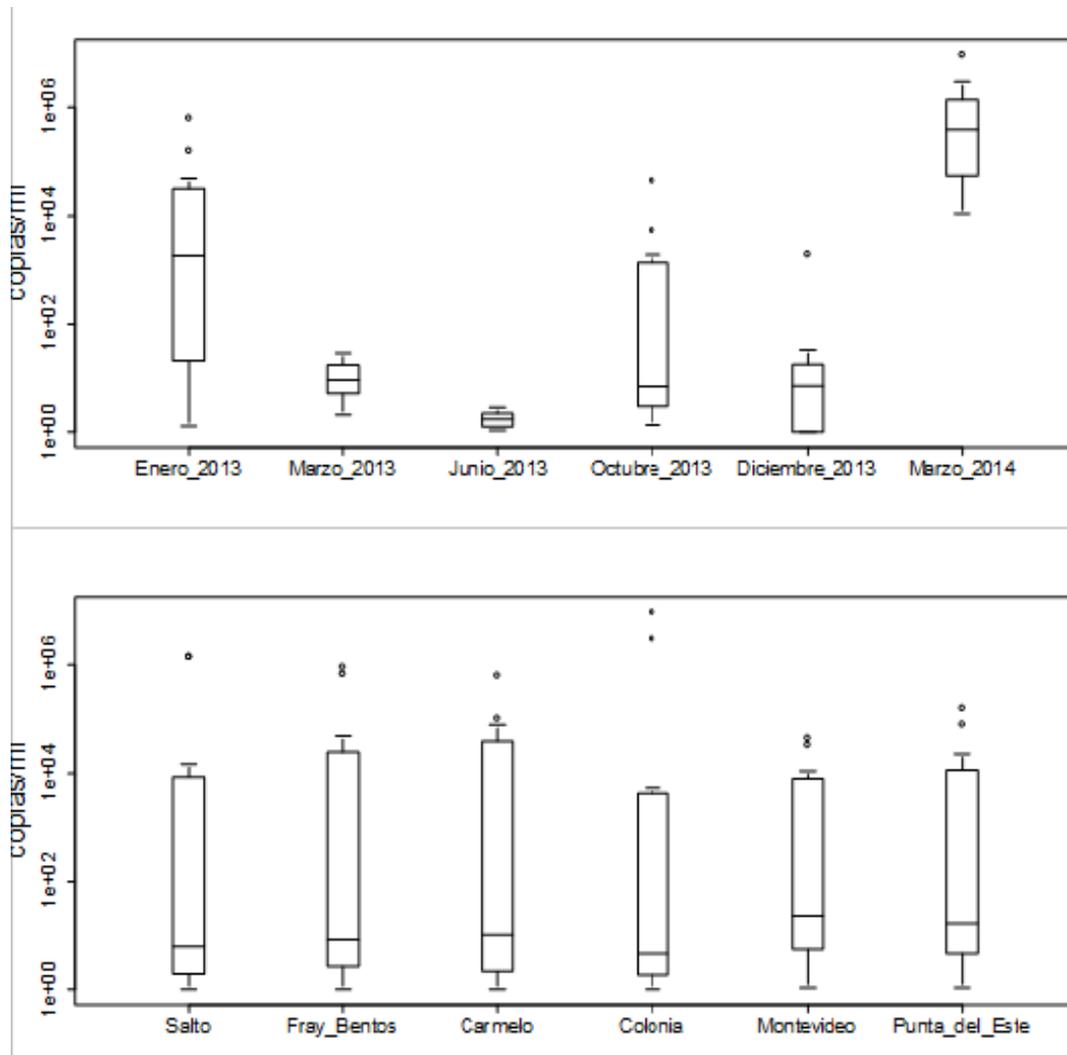
Se detectó la presencia de genes *mcy* en todas las fechas y estaciones de muestreo (Figura 2). Sin embargo, solamente se detectó la variante LR de microcistina mediante HPLC en el embalse de Salto Grande en marzo y junio de 2013. La falta de correlación entre la concentración de microcistina-LR y la abundancia de genes *mcy* podría deberse a una limitación metodológica para detectar otras variantes de la toxina. Las mayores abundancias de los genes *mcy* se registraron en la zona del embalse de Salto Grande y Fray Bentos, disminuyendo notoriamente hacia las estaciones estuarinas (Montevideo y Punta del Este). Respecto a la distribución temporal, se puede observar que la abundancia de los cuatro genes *mcy* aumenta en verano y disminuye en invierno, al igual que la temperatura (Figura 2).



**Figura 2.** Cambios temporal (superior) y espacial (inferior) de la abundancias de los cuatro genes *mcy* juntos (copias/ml), eje "y" en escala logarítmica.

### 5.3 *Genes sxt*

Se detectaron genes *sxt* en todas las fechas y estaciones de muestreo (Figura 3). Estos genes presentaron abundancias máximas de  $10^6$ - $10^7$  copias/mL. Esto resulto sorprendente, ya que en algunos casos se detectó por el método aquí propuesto la presencia de genes y toxina pero no se detectó mediante microscopia la presencia de organismos con potencial productor de la misma. Esta diferencia radica principalmente en los diferentes métodos de análisis utilizados, la técnica de microscopia no es tan sensible como el qPCR o HPLC para la detección de toxinas. La abundancia de ambos genes fue similar en todos los sitios de muestreo (Figura 3). Las mayores abundancias se registraron en (enero 2013 y marzo 2014) disminuyendo en invierno (Junio 2013).



**Figura 3.** Cambios temporal (superior) y espacial (inferior) de la abundancias de los dos genes *sxt* juntos (copias/ml), eje "y" en escala logarítmica.

#### 5.4 Relación entre genotipos tóxicos y otros indicadores de cianobacterias tóxicas

La abundancia del gen *mcyE* se correlacionó positivamente con los indicadores tradicionales de fitoplancton, como ser la clorofila-a, biovolumen total de fitoplancton y biovolumen de cianobacterias ( $rs=0,25-0,68$ ,  $p<0,05$ ). Mientras que la abundancia de *mcyB* y *mcyJ* presentó una fuerte asociación positiva solo con el biovolumen total de cianobacterias. Asimismo, la abundancia de los genes *mcyB* y *mcyE* fue significativamente mayor cuando las colonias de *Microcystis* spp. fueron detectadas a simple vista (KW,  $H=20$ ,  $p<0,05$ ). Estas diferencias en las correlaciones se pueden deber principalmente a las diferentes metodologías, la detección por microscopio es menos sensible que la detección por qPCR, por otro lado la utilización de *primers* de la literatura podrían presentar sesgos ya que los mismos fueron diseñados para la detección de genotipos tóxicos de otras regiones.

## 6 CONCLUSIONES

En este trabajo se ha puesto a punto una herramienta basada en PCR cuantitativo en tiempo real para la detección y cuantificación de cianobacterias potencialmente tóxicas en ecosistemas acuáticos de Uruguay. Dichas herramienta posee un límite de detección de organismos potencialmente tóxicos de aproximadamente 2 células por ml. Esta técnica requiere equipamiento especializado que está disponible en la mayoría de los centro de investigación. Su alta sensibilidad y la posibilidad de analizar varias muestras a la vez, el breve tiempo entre la obtención de la muestra y el resultado las convierten en una herramienta promisoría para el monitoreo, especialmente de agua destinada al consumo humano que presenta bajas concentraciones de cianobacterias pero altos riesgos a la salud pública.

## 7 AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Asociación Honoraria de Salvamentos Marítimos y Fluviales (ADES) ya la Comisión Técnica-Mixta de Salto Grande (CTM Salto Grande) por su valiosa ayuda para realizar muestreos. Este estudio fue apoyado por la subvención ANII-ALGAS (Laboratorio Tecnológico del Uruguay), por PEDECIBA-Biología y por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación de Uruguay (ANII).

## 8 REFERENCIAS

- [1] Paerl, H. W., Huisman, J. 2008. Blooms Like It Hot. *Science*, 320: 57-58.
- [2] Vidal, L., Kruk, C. 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3: 142-151.
- [3] Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., ... & de la Escalera, G. M. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *Innotec*, (10 ene-dic), 9-22.
- [6] Chours, I. 2012. Cyanotoxins: Occurrence, Causes Consequences. Tokyo: Springer 2001. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Dessau-Roßlau: Federal Environment Agency (Umweltbundesamt).
- [7] Chours, I., Bartram, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: Chapman & Hall.
- [8] Mazzeo, N., Rodríguez-Gallego, L., Kruk, C., Meerhoff, M., Gorga, J., Lacerot, G., Quintans, F., Loureiro, M., Larrea, D. & García-Rodríguez, F. 2003. Effect of *Egeria densa* Planch. beds on a shallow lake without piscivorous fish. *Hydrobiologia* 0: 1-12.
- [9] Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L., Rodríguez-Gallego, L., Piccini, C., Meerhoff, E., Rodríguez, L., Gomez, P. & Machado, I. 2006. Procesos estructuradores de las comunidades biológicas en lagunas costeras de Uruguay. En: Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya. Menafrá R., Rodríguez-Gallego L., Scarabino F., Conde D. (eds.), VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo, 611-630.
- [10] Conde, D. 2009. Eutrofización, cambio climático y cianobacterias. En: Cianobacterias. Manual para Identificación y Monitoreo. Bonilla, S. (ed.), Montevideo: UNESCO, vol. 16: 12-15.
- [11] Kruk, C., Rodríguez-Gallego, L., Quintans, F., Lacerot, G., Scasso, F., Mazzeo, N., Meerhoff, M., Paggi, J. C. 2006. Biodiversidad y calidad del agua de 18 pequeñas laguna en la costa sureste de Uruguay. En: Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Menafrá, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F., Conde, D. (eds), VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo, 599-610.



Asociação de Universidades  
GRUPO MONTEVIDEO



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

- [12] Conde, D., Rodríguez-Gallego, L. 2002. Problemática ambiental y gestión de las lagunas costeras atlánticas de Uruguay. En: Perfil ambiental del Uruguay. Domínguez, A., Prieto, R. (eds.), Montevideo: Nordan-Comunidad, 15pp.
- [13] OSE. 2009. Informe del comportamiento de las cianobacterias en el agua bruta de Fray Bentos. Montevideo: Obras Sanitarias del Estado.
- [14] Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., Gonzáles-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C. C., Vidal, L., Kruk, C., Bonilla, S. 2011. Genetic and ecophysiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, 10: 644-653.
- [15] Huisman, J., Huloy, F. D. 2005. Population dynamic of harmful cyanobacteria. En: Harmfulcyanobacteria, Huisman, J., Matthijs, H. C. P., Visser P. M. (eds.), Netherlands: Springer, 143-176.
- [16] Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M. C. S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V. L. M., Lüring, M., Antoniadis, D., Padišák, J., Kruk, C. 2011. What drives the distribution of the bloom forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 594- 607.
- [17] De León, L., Yunes, J. 2001. First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 16: 110-112.
- [18] Kruk, C., De Leon, L. 2002. Asociaciones de fitoplancton en lagos y embalses del Uruguay: validacion y aplicacion a la gestion de sistemas acuaticos. En: El agua en Iberoamerica: de la limnologia a la gestion en Sudamerica. Fernandez-Cirelli, A., Chalar, G. (eds.) CYTED XVII y CETA:143-155.
- [19] Fischbach MA, Walsh CT. 2006. *Chem. Rev.* 106:3468-3496.
- [20] Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T, Neilan BA. 2000. *Chemistry and Biology* 7: 753-764.
- [21] Murray SA, Mihali TK, Neilan BA. 2011. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 1173-1182.
- [22] Kellmann R, Michali TK, Jeon YJ, Pickford R, Pomati F, Neilan BA. 2008. *App. Environ. Microbiol.* 74: 4044-4053
- [23] Brena, B., Bonilla, S. 2009. Producción de toxinas y otros metabolitos. En: Cianobacteriasplanctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión. Bonilla, S. (ed.), Montevideo: UNESCO, 16-18.
- [24] Furukawa, K., Noda, N., Tsuneda, S., Saito, T., Itayama, T., Inamoria, Y. 2006. Highly Sensitive Real-Time PCR Assay for Quantification of Toxic Cyanobacteria Based on Microcystin Synthetase A Gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102: 90-96.
- [25] Hautala, H., Lamminmäki, U., Spoof, L., Nybom, S., Meriluoto, J., Vehniäinen, M., 2013. Quantitative PCR detection and improved sample preparation of microcystin-producing *Anabaena*, *Microcystis* and *Planktothrix*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 87, 49–56.
- [26] Kim, S.-G., Joung, S.-H., Ahn, C.-Y., Ko, S.-R., Boo, S.M., Oh, H.-M., 2010. Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir: population diversity of *Microcystis* spp. during algal bloom. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 93–102. doi:http://dx.doi.org/ 10.1111/j.1574-6941.2010.00947.x.
- [27] Sipari, H., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Oksanen, I., Sivonen, K., 2010. Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase e gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3797–3805. doi:http://dx.doi.org/ 10.1128/AEM.00452-10.
- [28] Kaebernick, M., Neilan, B.A., Borner, T., Dittmann, E., 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3387–3392. doi:http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.8.3387-3392.2000.
- [29] Vico, P., Aubriot, L., Martigani, F., Rigamonti, N., Bonilla, S., & Piccini, C. (2016). Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogs in *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful algae*, 56, 37-43.
- [30] Martínez de la Escalera, G., Antoniadis, D., Bonilla, S., Piccini, C., 2014. Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic cyanobacteria in subtropical freshwater ecosystems. *Mol. Ecol.* 23, 5791–5802. doi:http://dx.doi.org/10.1111/mec.12979.