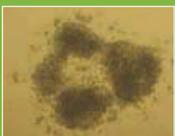




Las cianobacterias han proliferado en los ambientes acuáticos en coincidencia con el alto grado de eutrofización antropogénica y el cambiante ambiente acuático, modificado por el cambio climático global.



Tanto las cianobacterias como las cianotoxinas pueden generar efectos adversos en la salud del hombre y los animales. Este grave problema sanitario presenta sintomatologías similares a otras afecciones, por lo que es posible que no sea correctamente diagnosticado.



Por ello, el manual ha sido pensado para el personal del área de la salud que enfrenta esta nueva problemática. Contempla las consideraciones generales de las cianobacterias y cianotoxinas, los factores ambientales y antropogénicos que las modulan, los efectos más notorios vinculados de la exposición aguda y crónica en la salud humana y animal, los efectos en el ecosistema acuático, los nuevos métodos de detección, las perspectivas para su control, los riesgos en los ambientes de trabajo, y la gestión desde el Estado Nacional. Es de esperar que, conociendo las bases científicas de las cianobacterias y cianotoxinas, podamos en conjunto diagnosticar y tratar las afecciones en humanos, así como tender a la prevención y control del fenómeno que afecta a diversas áreas de nuestro país.

CIANOBACTERIAS COMO DETERMINANTES AMBIENTALES DE LA SALUD

Salud Ambiental

# CIANOBACTERIAS

## COMO DETERMINANTES AMBIENTALES DE LA SALUD



Edición 2017

SERIE: TEMAS DE SALUD AMBIENTAL N° 5

PROGRAMA NACIONAL CALIDAD DE AGUA Y SALUD  
DEPARTAMENTO DE SALUD AMBIENTAL

República Argentina   
salud.gov.ar

Av. 9 de Julio 1925. Buenos Aires. Argentina



Ministerio de Salud  
Presidencia de la Nación



Ministerio de Salud  
Presidencia de la Nación

## **Autoridades**

PRESIDENTE DE LA NACIÓN  
[Ing. Mauricio Macri](#)

MINISTRO DE SALUD  
[Dr. Jorge Daniel Lemus](#)

SECRETARÍA DE RELACIONES NACIONALES E INTERNACIONALES  
[Dr. Rubén Nieto](#)

SUBSECRETARÍA DE RELACIONES INSTITUCIONALES  
[Dra. Miguela Pico](#)

DIRECCIÓN NACIONAL DE DETERMINANTES DE LA SALUD  
[Dr. Ernesto de Titto](#)

DEPARTAMENTO DE SALUD AMBIENTAL  
[Ing. Ricardo Benítez](#)

GRUPO DE TRABAJO SOBRE ASPECTOS SANITARIOS  
DE LA PRESENCIA DE CIANOBACTERIAS EN AGUAS  
[Lic. Tatiana Petcheneshky \(Coordinadora\).](#)

# **Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud**

Edición 2017

MINISTERIO DE SALUD DE LA NACIÓN

PRESIDENCIA DE LA NACIÓN

Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud / Tatiana Petcheneshsky ... [et al.]; compilado por Leda Giannuzzi ; Tatiana Petcheneshsky ; editor literario Leda Giannuzzi ; Tatiana Petcheneshsky ; Marcelo Hansen. - 2a ed. ampliada. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Ministerio de Salud de la Nación. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación, 2017.  
Libro digital, PDF - (Temas de salud ambiental / de Titto, Ernesto; 5)

Archivo Digital: descarga y online  
ISBN 978-950-38-0255-7

1. Salud Pública. 2. Bacterias. I. Petcheneshsky, Tatiana II. Giannuzzi, Leda, comp. III. Petcheneshsky, Tatiana, comp. IV. Giannuzzi, Leda, ed. Lit. V. Petcheneshsky, Tatiana, ed. Lit. VI. Hansen, Marcelo, ed. Lit.  
CDD 613.6

#### **Cianobacterias como Determinantes Ambientales de la Salud**

Primera edición: 2011

Segunda edición corregida y ampliada (digital) 2017

Serie: Temas de Salud Ambiental

© Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud.  
Ministerio de Salud de la Nación

Ministerio de Salud de la Nación  
Av. 9 de Julio 1925, Piso 12  
CP C1073ABA – Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
Teléfono: (011) 4379-9086 (directo) Conmutador: 4379-9000 Int. 4854 Fax: 4379-9133  
[www.msal.gov.ar](http://www.msal.gov.ar)

ISBN 978-950-38-0255-7

Foto de tapa: muelles del Club de la Asociación de Pescadores y Cazadores Aficionados Cordobeses (APYCAC), 2010. Gentileza del Área de Limnología Aplicada y Calidad de Aguas, INA-CIRSA.

Fecha de publicación: Noviembre de 2017

Libro de edición argentina

Queda hecho el depósito que establece la ley 11.723

Este documento puede ser reproducido en forma parcial o total sin permiso especial, siempre y cuando se mencione la fuente de información.

## Equipo de redacción

### Editores

Leda Giannuzzi  
Tatiana Petcheneshsky  
Marcelo Hansen

### Comité editorial

Ricardo Benítez  
Ernesto de Titto

### Autores

Anabella Aguilera  
María Valeria Amé  
Darío Andrinolo  
Letizia Bauzá  
Ricardo Benítez  
Melina Crettaz Minaglia  
Ernesto de Titto  
Ricardo Echenique  
Leda Giannuzzi  
Marcelo Hansen  
María A. Kolman  
Ernesto Odriozola  
Tatiana Petcheneshsky  
Eduardo Jorge Rodríguez  
Lorena Rosso  
Marcia Ruiz  
Graciela L. Salerno  
Daniela Sedan  
Daniel Alberto Wunderlin

Director de la Serie Temas de Salud Ambiental

Ernesto de Titto



## Métodos moleculares para la detección de cianobacterias formadoras de floraciones y su potencial toxigénico

María A. Kolman y Graciela L. Salerno

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN BIODIVERSIDAD Y BIOTECNOLOGÍA (INBIOTEC-CONICET), Y FUNDACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS APLICADAS (FIBA), C.C. 1348, VIEYTES 3103, 7600 MAR DEL PLATA, ARGENTINA

### Resumen

Ante el aumento en frecuencia y extensión geográfica de la aparición de florecimientos de cianobacterias toxígenas en cuerpos de agua que se utilizan para actividades humanas surge la necesidad de determinar precozmente su presencia y realizar monitoreos para la prevención y manejo de riesgos para la salud. La identificación morfológica de las células presentes en una floración no permite discriminar entre la ocurrencia de cepas toxígenas y no toxígenas. El diagnóstico molecular, que emplea metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituye un poderoso complemento de las técnicas microscópicas que permite la identificación precoz de cepas toxígenas presentes en los cuerpos de agua, aún en muy baja concentración celular, y constituye una herramienta para alertar tempranamente sobre la posible presencia de toxinas. Por lo tanto, estas metodologías son de suma importancia para el manejo de los riesgos para la salud asociados a una floración. Las técnicas moleculares son relativamente sencillas, altamente reproducibles y muy específicas, aunque requieren equipamiento especializado y personal entrenado. Por otra parte, los resultados en algunos casos son indicativos de riesgo tóxico (por ejemplo, si se trata de cepas del género *Microcystis*, pueden alertar sobre la potencialidad de síntesis de microcistinas), y en otros casos el diagnóstico es certero (por ejemplo, cuando se detecta *Nodularia spumigena*, que siempre produce nodularina). El presente capítulo abordará una breve revisión de los métodos moleculares empleados en la actualidad a nivel mundial para la caracterización e identificación de cianobacterias toxígenas presentes en ambientes naturales, y se discutirán sus alcances y limitaciones.

**Palabras clave:** DNA ambiental, diagnóstico precoz, *Microcystis*, microcistina, nodularina, PCR

### 1. Introducción

La calidad del recurso hídrico proveniente de lagos, ríos y embalses que proveen agua para el consumo humano y animal, y para actividades recreativas se ha visto seriamente afectada en los últimos años. El aumento de las actividades industriales y agrícola-ganaderas viene acompañado de un incremento en el vertido de desechos ricos en nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, los cuales alteran el estado trófico de los cuerpos de agua (fenómeno conocido como eutrofización antrópica). Ejemplos de esto son la contaminación causada por aguas servidas sin tratar y residuos cloacales vertidos en embalses localizados en Córdoba, Bahía Blanca y Santiago del Estero, y el aporte de desechos industriales en el cordón industrial de los ríos Paraná y de la Plata, en la cuenca Matanza-Riachuelo y en el río Reconquista [1].

La eutrofización de los sistemas acuáticos sumada al incremento de las temperaturas producto del calentamiento global, ocasionan cambios importantes en las comunidades biológicas, y favorecen el aumento masivo de grupos de organismos competitivamente exitosos en estas condiciones [2]. Esto

se ha evidenciado en las últimas décadas con la aparición de floraciones de cianobacterias (inicialmente denominadas algas verde-azules), de manera cada vez más frecuente y más extendida geográficamente. La presencia de dichas floraciones no sólo afecta negativamente la estética de un cuerpo de agua por la acumulación de “espuma verde” y por la generación de olores desagradables (provenientes de la producción de compuestos como la geosmina y metilisoborneol), sino que también, y mucho más importante, puede afectar severamente la salud humana y animal, debido a que muchas cepas cianobacterianas son capaces de producir toxinas (cianotoxinas) [3] Es por eso que surge la necesidad de determinar la presencia de cepas toxígenas en dichos cuerpos de agua, para la prevención y manejo de riesgos para la salud aplicando metodologías que generen resultados confiables, reproducibles y comparables entre laboratorios, empleando procedimientos específicos, sensibles, relativamente fáciles de implementar y que demanden poco tiempo.

En el Capítulo 1, se ha descrito la identificación taxonómica de cianobacterias, dando cuenta que son numerosas las cepas que pueden desarrollar crecimientos extensivos. El uso de la microscopía óptica no sólo aporta información importante en cuanto a la identificación morfológica de los organismos presentes en la floración, sino que también permite el recuento celular y el monitoreo del cuerpo de agua. Esta metodología es ampliamente utilizada por su bajo costo, aunque requiere de personal técnico entrenado. Sin embargo, los aspectos morfológicos de las células presentes en una floración no permiten discriminar entre la presencia de cepas toxígenas y no toxígenas, estando bien documentado que en una floración pueden coexistir ambos tipos celulares [4, 5].

El desarrollo de métodos basados en los conocimientos de la biología molecular para la caracterización e identificación de microorganismos ha permitido introducir herramientas novedosas de análisis para la identificación de poblaciones de cianobacterias productoras de toxinas presentes en ambientes naturales. Estos métodos ofrecen la ventaja adicional de que pueden detectar cepas que están en muy baja concentración. Por lo tanto, el diagnóstico molecular constituye un poderoso complemento de las técnicas microscópicas que adiciona la identificación precoz de cepas toxígenas presentes en los cuerpos de agua, aún en muy baja concentración celular. El desarrollo de estas metodologías ha sido posible a partir de numerosos trabajos científicos que describen el aislamiento de cepas de cianobacterias, tanto productoras como no productoras de toxinas, su puesta en cultivo en el laboratorio y su posterior caracterización molecular. Ésta comprende la amplificación y secuenciación de genes específicos utilizados para identificación, o de genes constituyentes de operones involucrados en la síntesis de cianotoxinas [4-8]. La información obtenida a partir de cepas aisladas ha sido utilizada para poner a punto métodos basados en la amplificación de fragmentos de DNA a partir de muestras ambientales, sin necesidad de contar con el aislamiento previo de las cepas. Además de ser rápidos y simples, su costo está ampliamente compensado por su elevado grado de sensibilidad y especificidad, lo que permite analizar un gran número de muestras. Los métodos más ampliamente utilizados están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuyo fundamento es la detección de fragmentos de ácidos nucleicos que permite diagnosticar el riesgo tóxico de una floración e identificar las cepas presentes [7].

En el presente capítulo se hará una breve revisión de los métodos moleculares empleados en la actualidad a nivel mundial para la caracterización e identificación de cianobacterias toxígenas presentes en ambientes naturales, sus alcances y limitaciones. Estas técnicas moleculares son sencillas, altamente reproducibles, y muy específicas. Sin embargo, el personal que las aplique debe recibir entrenamiento y capacitación previos, ya sea en cursos específicos que se organizan periódicamente en nuestro país, o en estancias en los laboratorios de referencia de la red CyanoSur. Este entrenamiento es importante, por un lado, para reducir costos en la puesta a punto de las metodologías y, por otro, para armonizar los criterios empleados en los distintos laboratorios que realizan identificación y caracterización de cianobacterias toxígenas en el país.

## **2. Metodologías para la identificación y clasificación de las cianobacterias con potencialidad para producir toxinas**

### **2.1. Métodos basados en la PCR convencional para la identificación molecular de cianobacterias**

#### ***Conceptos generales***

La metodología molecular utilizada con más frecuencia para la identificación de cepas cianobacterianas consiste en la amplificación *in vitro* de secuencias de DNA utilizando cebadores (iniciadores o "primers") específicos. Para ello es necesario contar con el conocimiento previo de secuencias nucleotídicas de genes (o fragmentos de genes) de interés de numerosas cepas, información que se encuentra disponible en bases de datos públicas. Para la identificación molecular, las secuencias génicas que se analizan deben ser informativas, y para ello, tienen que pertenecer a genes esenciales y característicos de estos microorganismos. Además, deben cumplir otros dos requisitos: i) las secuencias de nucleótidos deben estar muy conservadas entre las distintas cepas; ii) en alguna región de dichas secuencias debe haber una subregión variable, lo cual permite diferenciar las cepas entre sí, como si fueran huellas dactilares ("fingerprinting"). O sea, la identificación está basada en las diferencias encontradas en estas secuencias variables.

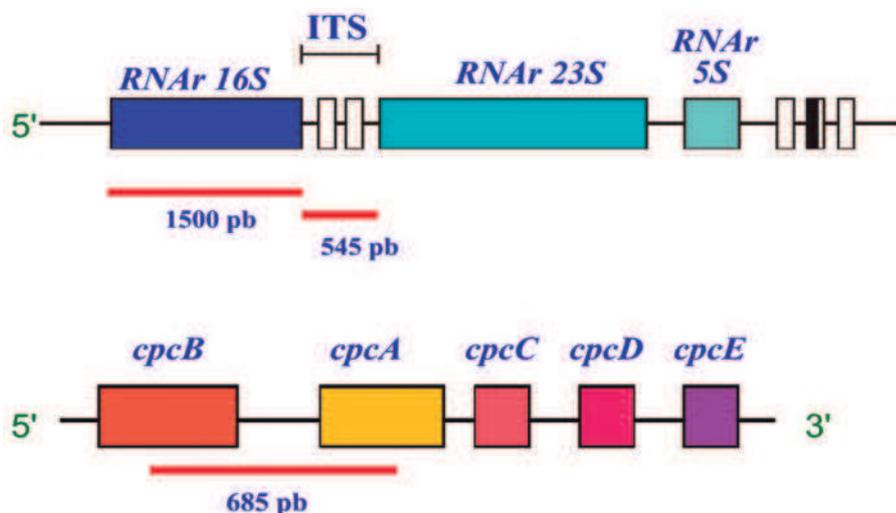
La metodología basada en la PCR permite la replicación del fragmento de DNA de interés en una mezcla de reacción que contiene: i) DNA molde que incluye la región a ser amplificada; ii) un par de cebadores que son oligonucleótidos complementarios a cada una de las dos hebras del DNA, diseñados a partir de la secuencia blanco de interés; iii) los cuatro desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), sustratos para polimerizar nuevo DNA; iv) DNA polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70°C (la más común es la polimerasa Taq); y v) iones y tampón para la reacción de la polimerasa. Para llevar a cabo la replicación de DNA es necesario contar con un termociclador, que es el equipo que permite mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo del programa de amplificación. Como resultado se generan numerosas copias del fragmento de DNA blanco que pueden visualizarse después de su separación por electroforesis en un gel de agarosa y de su tinción con un colorante apropiado [9]. En un paso posterior, se obtiene la secuencia de nucleótidos de dicho fragmento, que en general, si no se cuenta con un equipo de secuenciación de DNA, puede ser realizado en un servicio externo especializado. La identificación final de las cepas se realiza mediante la comparación de las secuencias nucleotídicas obtenidas con aquéllas depositadas en las bases de datos públicas (GenBank, EMBL, the Ribosomal Database Project, etc.).

#### ***Secuencias de genes usadas actualmente para identificar cepas de cianobacterias***

Los RNA ribosomales (RNAr) son componentes esenciales celulares involucrados en la síntesis de las proteínas y tienen un alto grado de conservación. Es así que las primeras secuencias utilizadas para la caracterización molecular de organismos procariotas fueron las de los genes codificantes de las subunidades de los RNAr. En el caso de la identificación de cianobacterias, las variaciones en las secuencias de nucleótidos del gen codificante de la subunidad ribosomal 16S (RNAr 16S) ha sido la más frecuentemente usada [Tabla 1] [7]. También ha sido utilizada como herramienta la comparación de las secuencias nucleotídicas de una región espaciadora entre los genes ribosomales (ITS) [Figura 1 A, Tabla 1]. La utilización de las secuencias de estos genes como marcadores para la identificación de cianobacterias en una muestra ambiental presenta la desventaja de que la muestra puede contener bacterias heterótrofas que no son objeto del análisis de floraciones, lo que ha motivado la búsqueda de otros genes más específicos que permitan identificar solamente cianobacterias.

Dado que la ficocianina (PC) es un pigmento característico de las cianobacterias, se ha elegido como blanco de amplificación por la PCR una secuencia de DNA correspondiente a una región localizada entre los genes

*cpcB* y *cpcA* (IGS-PC, “intergenic sequence”) integrantes del operón codificante de proteínas involucradas en la síntesis de la PC [Figura 1 B, Tabla 1]. La identificación está basada en comparar las secuencias intergénicas IGS-PC obtenidas por secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados por la PCR con registros depositados en bases públicas de datos [6]. En general, con la caracterización de la secuencia de las regiones IGS-PC se puede predecir el género de las cianobacterias presentes en la muestra con alta certeza, y en algunos casos hasta la especie.



**Figura 1:** Esquema de la estructura genética de los operones de los RNA ribosomales (*RNAr*) (A) y de la biosíntesis de ficocianina (B). Los genes están representados como cajas y las regiones espaciadoras como líneas. En (A) están indicadas las posiciones de los fragmentos que son amplificados por metodología basada en la PCR correspondientes al gen codificante de la subunidad *RNAr 16S* (1500 pb) y a la región intergénica (*ITS*) (545 pb). En (B) se indican los genes que codifican las proteínas involucradas en la síntesis de ficocianina (PC) y la posición del fragmento de DNA de 685 pb cuya secuencia es amplificada por PCR y es usada para la identificación de cianobacterias.

## 2.2. Métodos basados en la PCR convencional para identificación molecular de cepas tóxicas

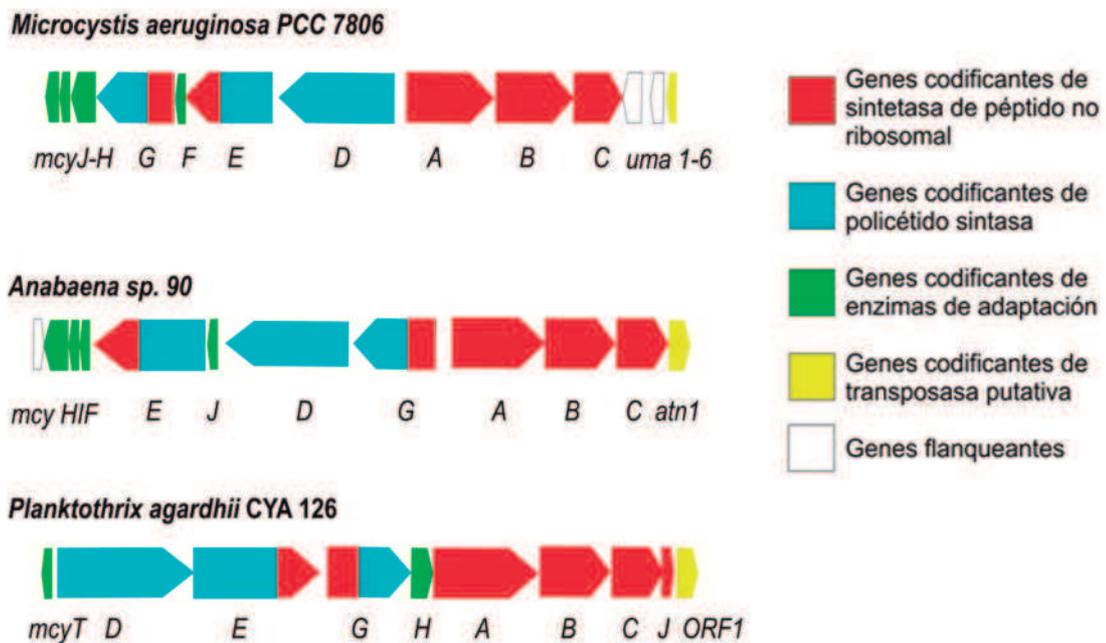
El análisis de las secuencias de los *RNAr*, *ITS* e *IGS-PC*, en general, permite identificar cianobacterias potencialmente tóxicas, pero no permite hacer diagnósticos de toxicidad en muestras ambientales, ya que las cepas tóxicas y no tóxicas pueden coexistir en una floración, presentando una distribución errática. Esto está muy documentado para el caso de floraciones de *Microcystis* spp. Una excepción ha sido la posibilidad de diferenciar miembros tóxicos y no-tóxicos del género *Nodularia* a través de la comparación de secuencias de *RNAr 16S*, que permite conocer si se trata de *Nodularia spumigena* (especie tóxica) o de otras especies de *Nodularia* (no tóxicas) [10].

Las técnicas moleculares, de alta sensibilidad y especificidad, también ofrecen una alternativa a los ensayos biológicos, físico-químicos y bioquímicos para la identificación y detección de cianotoxinas. Con metodologías basadas en la PCR es posible detectar la presencia de genes involucrados en la síntesis de las diferentes toxinas y de este modo conocer la potencialidad toxigénica de las cepas presentes en un cuerpo de agua [11].

Como se ha visto anteriormente (Capítulo 2), las estructuras de las cianotoxinas son complejas y diversas. El conocimiento de la secuencia del genoma de una cepa de *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806) en el año 2000, permitió conocer la biosíntesis de las microcistinas con la participación de

varias proteínas (organizadas en complejos enzimáticos) codificadas por genes (denominados *mcy*) organizados en una estructura de operón [12]. Posteriormente, se encontraron genes homólogos a los *mcy* en otras cepas de *Microcystis*, en *Anabaena* y en *Planktothrix* (Figura 2), demostrándose que la organización dentro del operón varía entre las cepas. Basándose en las secuencias de genes *mcy* se diseñaron cebadores específicos para amplificar por medio de la PCR fragmentos de DNA ubicados en los distintos genes del operón, pudiéndose determinar con éxito la potencialidad toxigénica de cepas presentes en muestras ambientales [13].

También se describió el mecanismo de biosíntesis de saxitoxina (genes *sxt*) y se caracterizaron los genes involucrados en cepas de los géneros *Aphanizomenon*, *Anabaena* y *Cylindrospermopsis*. Más recientemente se publicaron las secuencias de genes involucrados en la biosíntesis de nodularina (genes *nda*) y cilindrospermopsina (genes *cyr*) [14, 15]. Es importante resaltar que los genes *mcy* y los genes *nda* pueden estar presentes en miembros de más de un género (*Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Planktothrix*) [13]. En el año 2010 se han identificado los genes responsables de la biosíntesis de anatoxina-a y homoanatoxina-a en *Oscillatoria* sp. PCC 6506, como así también los genes involucrados en la síntesis de otros dos tipos de neurotoxinas [16].



**Figura 2.** Estructura de la organización de los genes involucrados en la síntesis de microcistina en los genomas de *Microcystis*, *Anabaena* y *Planktothrix* (Börner & Dittman, 2005).

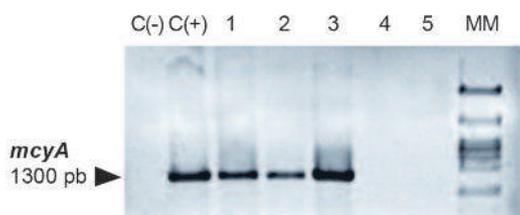
### Secuencias de genes usadas para detectar cepas de cianobacterias toxígenas

Los conocimientos recientemente adquiridos sobre las secuencias de los genes involucrados en la producción de las toxinas sentaron las bases para el desarrollo de los métodos actuales para detectar cepas productoras de toxinas [8, 17]. El potencial tóxico de un florecimiento se puede determinar aislando el DNA ambiental total y aplicando la metodología de la PCR con cebadores para la amplificación de genes claves del camino de la biosíntesis de cada toxina [Tabla 1]. Una gran ventaja que ofrece este enfoque experimental es que permite detectar la presencia de cepas toxígenas aunque sean minoritarias en una floración, y hasta indetectables al microscopio óptico, en un corto tiempo (entre 1 y 3 horas).

**Tabla 1:** Aplicaciones de metodologías basadas en PCR convencional para la detección de cianobacterias toxígenas

Aplicación	Gen amplificado	Cebadores	Referencia
Detección de cepas productoras de microcistinas	<i>mcyB</i>	FAA-RAA	[18]
	<i>mcyA</i> -NMT	MSF-MSR	[19]
Diferenciación entre cepas de <i>Microcystis</i> toxígenas y no toxígenas	<i>RNAr 16S</i> - ITS	23S ITS - 16S ITS	[20]
	<i>cpcB-cpcA</i>	PCbF-PCaR	
Detección específica de cepas hepatotoxígenas de <i>Microcystis</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyE</i> F2 - <i>mcyE</i> R8	[17]
Detección específica de cepas toxígenas de <i>Nodularia</i>	<i>RNAr 16S</i>	NTS1 - 494R	[10]
Detección específica de cepas toxígenas de <i>Nodularia</i>	<i>ndaF</i>	NPF - NPR	[10]
Detección específica de cepas toxígenas de los géneros <i>Cylindrospermopsis</i> y <i>Aphanizomenon</i>	Homólogo de poliketido sintasa	M4 - M5	[14]
	Homólogo de péptido sintetasa no ribosomal	M13 - M14	
Detección específica de cepas hepatotoxígenas <i>Microcystis</i> y <i>Nodularia</i>	<i>mcyE-ndaF</i>	<i>mcyE</i> F2 - <i>mcyE</i> R4	[21]
Detección específica de cepas hepatotoxígenas de <i>Anabaena</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyE</i> F2 - <i>mcyE</i> 12R	[21]
Detección específica de cepas hepatotoxígenas de <i>Planktothrix</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyE</i> F2 - <i>mcyE</i> PlaR3	[21]
Detección específica de genes relacionados con la síntesis de hepatoxinas	<i>mcyE-ndaF</i> (dominio aminotransferasa)	HEPF - HEPR	[17]
Detección específica de genes relacionados con la síntesis de cilindrospermopsina	<i>cyrA</i> (dominio aminotransferasa)	CYLATf-CYLATr	[22]
	<i>cyrB</i> (dominio aminotransferasa)	CPSf-CPSr	
	<i>cyrJ</i> (dominio cetosintasa)	CyrJf-CyrJr	
Detección específica de genes relacionados con la síntesis de saxitoxina	<i>sxtA4</i> (dominio aminotransferasa)	SXTA4f-SXTA4r	[22]
	<i>sxtI</i> (carbamil-transferasa)	OCTf-OCTr	
	<i>sxtB</i> (deaminasa)	SXTBf-SXTBr	
Ensayo "multiplex" para detección simultánea de genes relacionados con la síntesis de microcistinas en cepas de <i>Microcystis</i>	<i>mcyA</i>	MSF - MSR	[22]
	<i>mcyB</i>	2156-F - 3111-R	
	<i>mcyC</i>	PSCF3 - PSCR3	
	<i>mcyD</i>	PKDF2 - PKDR2	
	<i>mcyE</i>	PKEF1 - PKER1	
	<i>mcyG</i>	PKGf1 - PKGR1	

Los métodos moleculares que más se usan en la actualidad para detectar cianobacterias hepatotóxicas (mayoritariamente del género *Microcystis*) emplean tecnología basada en la PCR convencional, y los cebadores utilizados están resumidos en la *Tabla 1*. Cuando se emplearon cebadores que tienen como blanco a los genes *mcyB*, *mcyA* o *mcyE* se obtuvo una buena correlación entre la identificación de *Microcystis* toxígenas y la presencia de microcistina cuantificada por cromatografía líquida de alta performance [18, 21]. A modo de ejemplo, en la *Figura 3* se muestra la detección de la presencia de cianobacterias con potencialidad de producir microcistinas en muestras ambientales por la visualización del fragmento de DNA de 1300 pb correspondiente al gen *mcyA*, amplificado por PCR.



**Figura 3:** Detección de la presencia de cianobacterias con potencialidad de producir microcistinas. Mediante metodología basada en la PCR convencional se amplificó el gen *mcyA* a partir de DNA extraído de muestras ambientales de floraciones de *Microcystis aeruginosa* (calles 1 a 5). Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y los fragmentos de DNA se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Simultáneamente, se realizó la amplificación del DNA extraído de una cepa de *Microcystis aeruginosa* aislada del ambiente, productora de microcistina (C+, control positivo) y de *Synechococcus* sp. PCC 7002, cianobacteria no productora de toxinas (C-, control negativo). Los resultados indican que mientras las muestras 1, 2 y 3 contienen cianobacterias con potencialidad de producir microcistinas, las muestras 4 y 5 corresponden a cepas no toxígenas. Como referencia se muestran marcadores de tamaño molecular (MM).

La detección específica de cepas hepatotóxicas en una sola reacción de amplificación por PCR fue realizada recientemente usando un cebador universal para el gen *mcyE* (*mcyE*-F2) y un oligonucleótido reverso específico para cada uno de los siguientes géneros: *Anabaena* (*mcyE*-12R), *Microcystis* (*mcyE*-R8) y *Planktothrix* (*mcyE*-Plar3) [Tabla 1] [21]. Estos resultados demuestran la importancia de ajustar el diseño de los cebadores para poder incluir la detección de cepas de géneros diferentes en cada cuerpo de agua y poder realizar su monitoreo.

Se ha desarrollado otra estrategia basada en la PCR según la cual se amplifican en forma simultánea varios genes *mcy* (ensayo de tipo "multiplex"), usando varios pares de cebadores en una misma reacción de amplificación [Tabla 1] y los resultados se corresponden con la presencia de microcistina en muestras ambientales [23]. Sin embargo, para asegurar la calidad del agua para suministro público, se aconseja hacer ensayos complementarios de toxicidad por alguno de los métodos analíticos ya descritos.

Los ensayos moleculares basados en la detección de genes *nda* dan resultados inequívocos, ya que la producción de nodularina está limitada a las cepas de *N. spumigena* que siempre producen la toxina, mientras que otras estirpes del mismo género (*N. harveyana* y *N. sphaerocarpa*) carecen de genes *nda* y por lo tanto no son toxígenas [10].

En cuanto a las cepas productoras de cilindrospermopsinas, recientemente se han desarrollado cebadores para la amplificación de los genes *cyrA*, *cyrB* y *cyrJ* (genes integrantes del operón involucrado en su síntesis) los cuales han sido utilizados para la determinación de genotipos potencialmente tóxicos en muestras ambientales [22]. Del mismo modo, se han diseñado cebadores específicos para la identificación de cepas cianobacterianas con potencialidad para producir saxitoxinas (amplificación de los genes *sxtA4*, *sxtB* y *sxtB*) [Tabla 1] [22].

### 2.3. Métodos basados en la PCR en tiempo real para detectar cepas toxígenas

La PCR en tiempo real, también denominada PCR cuantitativa o qPCR (por "quantitative PCR") es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que permite amplificar un fragmento de DNA blanco y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación. En este caso, además de los componentes de la mezcla de reacción descritos para la PCR convencional, se usan cebadores específicos, una DNA polimerasa especial y una sustancia fluorescente que se une específicamente al DNA y que emite fluorescencia al ser excitada por un láser. Este tipo de reacciones se realizan en un termociclador con la capacidad de detectar la fluorescencia emitida por el compuesto excitado a medida que se va generando (en tiempo real) que es proporcional a la cantidad de producto amplificado. El equipamiento requerido tiene un costo muy superior a los

termocicladores usados para realizar PCR convencional. Por otra parte, la optimización de las reacciones suele ser laboriosa, pero una vez puestas a punto las condiciones, los resultados son precisos y confiables.

En una primera etapa, la aplicación de la qPCR utilizando DNA proveniente de muestras ambientales se limitó a la cuantificación de genotipos productores de toxinas, determinándose la abundancia relativa de los genes relacionados con la síntesis de microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsina y saxitoxinas [24-26]. En la actualidad, se están realizando ensayos para aplicar la qPCR en la detección y cuantificación del RNA ambiental, lo cual refleja en forma directa la actividad transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de las toxinas. Aunque esta metodología aún no se utiliza en la rutina de los laboratorios, se ha probado en muestras ambientales para evaluar la producción de microcistina y cilindrospermopsina.

#### 2.4. Métodos basados en la utilización de microarreglos

Un microarreglo de DNA ("microarray" o chip de DNA) es una superficie sólida a la cual se le han unido diferentes fragmentos de DNA de secuencias conocidas. El principio en que se basa su aplicación es la hibridación que se produce por complementariedad de bases entre alguno de los fragmentos de DNA fijados y otro complementario presente en una muestra. El procedimiento comienza con el aislamiento de los ácidos nucleicos de una muestra dada y la amplificación mediante PCR convencional de alguna secuencia de interés usando nucleótidos marcados con un fluorocromo. Los fragmentos de DNA amplificados fluorescentes se utilizan para hibridar el chip de DNA. Las secuencias que se unen a su complementaria en el chip emitirán fluorescencia cuando sean excitadas con un láser. Se procede luego al escaneo del chip con un lector de fluorescencia y a la visualización y análisis de los resultados. De esta forma se puede identificar a qué secuencia corresponde el fragmento de DNA amplificado de la muestra. Hasta el presente han sido muy poco utilizados para la identificación de cianobacterias, pero ofrecen ventajas en los estudios de floraciones, ya que posibilitan trabajar con un gran número de muestras en monitoreos ambientales. Permiten también detectar cianobacterias potenciales productoras de toxinas. Uno de los primeros chips diseñados se basó en una membrana conteniendo secuencias específicas de *RNAr 16S*, y permitía identificar hasta 19 géneros de cianobacterias con alta especificidad [27]. Un avance importante fue el desarrollo de un chip basado en los genes *mcyE/ndaF* que permite detectar la presencia de cepas con capacidad para producir microcistinas y nodularinas [28].

Los chips de DNA también pueden ser diseñados para detectar RNA, reflejando de este modo, la transcripción de genes involucrados en la síntesis de toxinas. En este caso, los RNA presentes en las muestras tienen que retrotranscribirse a DNA copia (DNAc) utilizando una enzima transcriptasa reversa. De esta manera lo que se utiliza para hibridar el chip son DNAc y la intensidad de la fluorescencia registrada permite evaluar diferencias en la cantidad de un determinado transcripto (RNA mensajero, RNAm). Recientemente se ha utilizado un chip de DNA para la cuantificación de RNAm del gen *mcyE* en muestras ambientales [29].

Una de las mayores desventajas de esta metodología es su elevado costo, incluyendo los chips, reactivos especiales y equipamiento para cuantificar la fluorescencia, en adición a los equipos para realizar la PCR. Por otra parte, la optimización de la metodología para obtener resultados comparables entre muestras es muy laboriosa. En la actualidad se están realizando avances tendientes a la implementación de esta metodología en monitoreo de cuerpos de agua.

### 3. Conclusiones

La problemática de las floraciones de cianobacterias tóxicas está mundialmente extendida. En los países desarrollados la aplicación de las modernas metodologías moleculares es una herramienta indiscutible para la prevención y evaluación de riesgos sanitarios, y sin dudas, deberán integrarse en los sistemas de alerta temprana en la Argentina. Las metodologías basadas en la PCR convencional son en el presente las de más fácil

implementación y permiten identificar, en forma reproducible y con certeza el género y muchas veces la especie de cianobacterias presentes en muestras de agua, aún cuando las células estén en muy baja concentración. También permiten aportar información sobre la existencia de cianobacterias portadoras de la capacidad genética para sintetizar toxinas en pocas horas a partir de la toma de muestra, siendo por eso de aplicación para la detección precoz, el monitoreo y el manejo de riesgos para la salud en aguas destinadas a actividades humanas.

En la Argentina todavía son muy pocos los laboratorios con experiencia en técnicas moleculares aplicadas a cianobacterias tóxicas y no se han establecido centros de referencia. Sin embargo, se cuenta con herramientas moleculares, recursos humanos y capacidad instalada al alcance de los responsables del cuidado y gestión del recurso agua.

## Referencias

1. Porchat V: Recursos hídricos. In.: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva; 2012.
2. Paerl HW, Huisman J: Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ Microbiol Rep* 2009, 1(1):27-37.
3. Codd GA, Lindsay J, Young FM, Morrison LF, Metcalf JS: Harmful cyanobacteria. From mass mortalities to management measures In: *Harmful cyanobacteria*. Edited by Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM, vol. 3. Netherlands. Springer; 2005.
4. Neilan BA, Jacobs D, Blackall LL, Hawkins PR, Cox PT, Goodman AE: rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int J Syst Bacteriol* 1997, 47(3):693-697.
5. Saker ML, Vale M, Kramer D, Vasconcelos VM: Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Appl Microbiol Biotech* 2007, 75(2):441-449.
6. Neilan BA, Jacobs D, Goodman AE: Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl Environ Microbiol* 1995, 61(11):3875-3883.
7. Neilan BA, Pearson LA, Moffitt MC, Mihali KT, Kaebnick M, Kellmann R, Pomati F: The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Edited by Hudnell K: Springer, 2008, pp. 417-452.
8. Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan BA. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 2010, 8(5):1650-1680.
9. Sambrook J, Russell David W: Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 3: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
10. Moffitt MC, Blackburn SI, Neilan BA: rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, 51(2):505-512.
11. Pearson LA, Neilan BA: The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr Op Biotech* 2008, 19(3):281-288.
12. Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Dohren H, Borner T, Neilan BA: Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem & Biol* 2000, 7(10):753-764.
13. Borner T, Dittmann E: Molecular biology of cyanobacterial toxins. In: *Harmful cyanobacteria*. Edited by Matthijs HCP, Visser P. The Netherlands: Springer; 2005: 25-40.
14. Schembri MA, Neilan BA, Saint CP: Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol* 2001, 16(5):413-421.
15. Moffitt MC, Neilan BA: Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(11):6353-6362.
16. Mejean A, Mazmouz R, Mann S, Calteau A, Medigue C, Ploux O: The genome sequence of the cyanobacterium *Oscillatoria* sp. PCC 6506 reveals several gene clusters responsible for the biosynthesis of toxins and secondary metabolites. *J Bacteriol* 2010, 192(19):5264-5265.

17. Jungblut A-D, Neilan BA: Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch Microbiol* 2006, 185(2):107-114.
18. Neilan BA, Dittmann E, Rouhiainen L, Bass RA, Schaub V, Sivonen K, Borner T: Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol* 1999, 181(13):4089-4097.
19. Tillett D, Parker DL, Neilan BA: Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67(6):2810-2818.
20. Neilan BA: The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria. *Curr Issues Mol Biol* 2002, 4:1-12.
21. Rantala A, Rajaniemi-Wacklin P, Lyra C, Lepisto L, Rintala J, Mankiewicz-Boczek J, Sivonen K: Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72(9):6101-6110.
22. Hoff-Rissetti C, Dorr FA, Schaker PDC, Pinto E, Werner VR, Fiore MF: Cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. *PLoS One* 2013, 8(8):e74238.
23. Ouahid Y, del Campo FF: Typing of toxinogenic *Microcystis* from environmental samples by multiplex PCR. *Appl Microbiol Biotech* 2009, 85(2):405-412.
24. Koskeniemi K, Lyra C, Rajaniemi-Wacklin P, Jokela J, Sivonen K: Quantitative real-time PCR detection of toxic *Nodularia* cyanobacteria in the Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73(7):2173-2179.
25. Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MR, Bridgeman TB, Wilhelm SW: Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environ Sci Technol* 2005, 39(11):4198-4205.
26. Al-Tebrineh J, Pearson LA, Yasar SA, Neilan BA: A multiplex qPCR targeting hepato- and neurotoxic cyanobacteria of global significance. *Harmful Algae* 2012, 15:19-25.
27. Rudi K, Skulberg OM, Skulberg R, Jakobsen KS: Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66(9):4004-4011.
28. Rantala A, Rizzi E, Castiglioni B, de Bellis G, Sivonen K: Identification of hepatotoxin-producing cyanobacteria by DNA-chip. *Environ Microbiol* 2008, 10(3):653-664.
29. Sipari H, Rantala-Ylilinen A, Jokela J, Oksanen I, Sivonen K: Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase E gene expression. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76(12):3797-3805.