



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE
CIANOBACTERIAS NOCIVAS PRESENTES EN CUERPO DE
AGUA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

JORGE GREGORIO LOZANO OROZCO

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA

LOS REYES IZTACALA, MÉXICO

JUNIO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de abril de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del (la) alumno(a) **LOZANO OROZCO JORGE GREGORIO** con número de cuenta **095029533** con la tesis titulada **"HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE CIANOBACTERIAS NOCIVAS PRESENTES EN CUERPOS DE AGUA"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA:**

Presidente: DR. SINGARAJU SRI SUBRAHMANYA SARMA
Vocal: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
Secretario: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA
Suplente: DRA. NANDINI SARMA
Suplente: DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de junio de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

DEDICATORIAS

A MIS PADRES IRMA OROZCO ESCALONA Y JOSÉ TOMAS
LOZANO CORTES POR SU APOYO INCONDICIONAL QUE
ME HAN BRINDADO A LO EXTENSO DE MI VIDA Y CREER
EN MÍ.

A MIS HERMANOS CELIA, ENRIQUE, YULIA, SANDY E
IRAS CON QUIENES HE COMPARTIDO VIVENCIAS Y
SIEMPRE ME HAN AYUDADO E IMPULSADO EN LOS
PROYECTOS QUE EMPRENDO

A MIS TIAS TERESA, SOLEDAD, EUGENIA Y FELICITAS
QUE SIEMPRE ME HAN ORIENTADO A SEGUIR POR EL
CAMINO DE LA CIENCIA

A LUISA CON QUIEN HE COMPARTIDO ESTA FASE DE MI
VIDA ACADÉMICA, QUIEN HA SIDO MI SOSTEN
EMOCIONAL BRINDÁNDOME SU COMPAÑÍA EN MOMENTOS
BUENOS Y MALOS, Y SIN ELLA NO HUBIERA SIDO TAN
FÁCIL ALCANZAR ESTA META.

MUCHOS AMORES Y FELICIDAD

SIN DEJAR DE MENCIONAR A CHANNY-CHANNEL QUIEN ME
HA CEVIDO MOMENTOS INTENSOS PERO AGRADABLES Y
ME VINCULA CON MI PROFESIÓN.

A TODOS Y CADA UNO DE ELLOS, GRACIAS!!!!

AGRADECIMIENTOS

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM.

AL COMITÉ DE ZUMEN FUI BECARIO CON CUN 218084

AL DIRECTOR DE TESIS DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA ZUMEN CREYÓ EN MÍ, PERMITIENDO ENTRAR A SU GRUPO DE TRABAJO Y ME DIÓ SU APOYO SIEMPRE.

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL: DRA. WANDINA SARMA Y DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR, DE ZUMENES SIEMPRE ME GUIARON EN MI PROYECTO.

MUCHO EN ESPECIAL AL DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE, ZUMEN DESDE MI TESIS DE LICENCIATURA Y AHORA DE MAESTRÍA, ME HA DOTADO DE MÚLTIPLES CONOCIMIENTOS, LIGADO A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y AUXILIADO INCONDICIONALMENTE EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO EXPERIMENTAL.

A TODOS MIS AMIGOS DE LA FES CUANTITLAN Y DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUE FUERON Y SERÁN SIEMPRE EL COMPLEMENTO DE MI VIDA ACADÉMICA

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR: UNAM | DGAPA-PAP197 M 203107 Y FES | PAPCA 2008

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Planteamiento del problema.....	12
Hipótesis.....	14
Objetivos.....	14
Material y	15
métodos.....	
Resultados.....	23
Discusión.....	26
Conclusiones.....	30
Bibliografía.....	31
Anexos.....	34

RESUMEN

La Eutrofización de los ambientes acuáticos favorece el crecimiento masivo de algas y cianobacterias (blooms), lo que trae como consecuencia el deterioro de la calidad del agua, tanto desde el punto de vista estético como de su contenido en metabolitos secundarios. Más del 50% de las proliferaciones de cianobacterias son tóxicas y tienen una importante repercusión en la salud pública y en sanidad animal. Cuando se presentan niveles altos de toxinas, que provocan efectos que pueden ser agudos o crónicos en el hombre y animales. Entre ellas encontramos a las denominadas hepatotoxinas que son producidas en los siguientes cuatro ordenes de cianobacterias: *Oscillatoriales*, *Chroococcales*, *Stigonematales* y *Nostocales*. Mediante la técnica de PCR, se implementó un método rápido para detectar cianobacterias que potencialmente pudieran ser productoras de hepatotoxinas, en muestras ambientales. Para lo cual se amplificó el dominio aminotransferasa (AMT) que esta localizado en el módulo *mcyE* del complejo enzimático microcistin sintetasa. Esta secuencia se eligió debido a que tiene una función esencial en la síntesis de todas las microcistinas. Usando la PCR se obtuvo un amplificado de 472 pares de bases que corresponde al domino AMT, que estuvo presente en las muestras procedentes de Zumpango y Valle de Bravo, que fueron potencialmente hepatotóxicas. Con la ayuda de esta herramienta se podrán determinar la presencia de florecimientos potencialmente tóxicos, y desplegar medidas para evitar el acceso de personas y animales a los cuerpos de agua, así como limitar los usos del agua.

Palabras clave: Cianobacterias, hepatotoxinas, florecimientos, eutrofización.

ABSTRACT

The high eutrophization in aquatic environments in Mexico provoke a high growing of algae and cyanobacteria (blooms), this situation bring as a consequence the deterioration of water quality from some point of view, from aesthetic aspect to high quantity of secondary metabolites that this kind of microorganisms produce. More than 50% of the proliferations of cyanobacteria are toxic, with serious repercussions in public health and in animal sanitation. When high levels of toxins are present in waterbodies has both, acute and chronic effects in human and animals, frequently are present the denominated hepatotoxins that some researchers reports that the next four orders of cyanobacteria produces: *Oscillatoriales*, *Chroococcales*, *Stigonematales* y *Nostocales*. By PCR, we prepare for Mexico a fast method to detect cyanobacteria potentially toxic that produce hepatotoxins in environmental samples. To get this goal, we amplify the domain aminotransferase (AMT) located in *mcyE* module of the enzymatic microcystin sintetase complex. We choose this sequence for his essentials function in synthesis of all microcystin. Using PCR we obtain an amplification of 472 BP from the AMT domain in samples from Zumpango and Valle de Bravo that were potentially hepatotoxic With the aid of this tool will be able to determine the presence of potentially toxic blooms, and to unfold measured to avoid the access of persons and animals to water bodies, as well as to limit the uses of the water.

Key words: Cyanobacteria, Hepatotoxins, Blooms, Eutrophization

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos fotosintéticos que habitan todas las aguas del planeta y que son el inicio de la cadena alimentaria se conocen como fitoplancton. Entre los más antiguos e identificados en estos ambientes se encuentran las cianobacterias que al agruparse llegan a formar grandes colonias, principalmente en cuerpos de agua con altos niveles tróficos (Schopf and Walter, 1882). Las cianobacterias son consideradas una liga entre procariontes y eucariontes fotosintéticos ya que poseen la capacidad de sintetizar clorofila y particularmente tienen la habilidad de sintetizar los pigmentos ficobilina y ficocianina, que en altas concentraciones les confiere el color característico que ha dado lugar a la denominación de algas azul-verdes, cianobacterias o cianoprocariontes, a su vez producen una gran variedad de compuestos, considerados metabolitos secundarios, por no realizar funciones primordiales en la cianobacteria que los produce. Entre estos metabolitos secundarios se encuentran las toxinas (Roset *et al*, 2001; Lanzarot, 2008). Estos organismos tienen una larga historia evolutiva, por lo que la mayoría de geólogos y geoquímicos están de acuerdo en que su origen se extiende 3,500 millones de años atrás en la Era Proterozoica (2500 a 570 mA) conocida también como era de las cianobacterias (Schopf and Walter, 1882)).

Su diversidad morfológica favorece su presencia tanto en el suelo como en el medio acuático, preferentemente en los ambientes dulceacuícolas de aguas alcalinas o neutras con pH entre 6 y 9, y temperaturas entre 15 y 30°C. Prefieren una alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo (Ramírez *et al.*, 2004).

La creciente eutrofización de los ambientes acuáticos favorece el crecimiento masivo (blooms) de algas y poblaciones de cianobacterias, entre las que se encuentran especies capaces de producir potentes toxinas con graves repercusiones en la salud pública y en la sanidad animal. Se ha observado que más del 50% de las proliferaciones masivas de cianobacterias son tóxicas, sin embargo aun dentro de una misma especie de cianobacteria, existen cepas que pueden o no producir toxinas, éstas son metabolitos secundarios, que se acumulan en el citoplasma en determinadas situaciones. La producción de estas toxinas es máxima cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, por este motivo, se observa una producción directamente proporcional al

aumento de la biomasa. Pero cuando las condiciones ambientales son desfavorables, las cianobacterias mueren, produciendo la lisis celular y la liberación de las toxinas al medio (Aguayo, 2001 y Jiang , 2008).

Por otra parte la producción masiva de este tipo de organismos trae como consecuencia alteraciones en la calidad del agua, particularmente en el pH y oxígeno disuelto; así como otras alteraciones indirectas cuando se presentan niveles de toxinas que ocasionan respuestas agudas o letales y crónicas o subletales en el hombre y en animales (Anexo 1 y 2; Chorus y Bartram, 1999; Chorus *et al.* 1998). Las toxinas de las cianobacterias se suelen agrupar principalmente en neurotoxinas y hepatotoxinas.

Existe un amplio rango de cianobacterias productoras de hepatotoxinas. La producción de Microcistina (hepatotoxina) ha sido reportada en los cuatro ordenes de cianobacterias: *Oscillatoriales*, *Chroococcales*, *Stigonematales* y *Nostocales*.

Las hepatotoxinas ocasionan el tipo más común de intoxicación relacionada con las cianobacterias. De acción más lenta, pueden causar la muerte en horas o en pocos días. Estas hepatotoxinas son péptidos, y fueron caracterizadas como heptapéptidos cíclicos (microcistinas), y como pentapéptidos (nodularinas). Entre las especies identificadas como productoras se incluyen los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* y *Cylindrospermopsis*. Las hepatotoxinas ocasionan que el hígado pierda su arquitectura y desarrolle graves lesiones internas. Esto ocasiona un edema y crecimiento hepático (hepatomegalia), fácilmente observable en la necropsia, acompañado de la anastomosis de los vasos sanguíneos, observable a trasluz en los hígados afectados.

Las microcistinas (figura 2) y nodularinas son metabolitos secundarios hepatotóxicos, cuya síntesis no se lleva a cabo mediante ribosomas, sino por enzimas denominadas en general péptido sintetasa, que llevan a cabo los enlaces peptídicos, junto con otras enzimas.

Los péptidos no ribosomales se sintetizan en grandes complejos multienzimáticos llamados comúnmente péptido sintetasa, que permite incorporar y modificar de forma muy variable los aminoácidos, dando lugar a una gran variabilidad. Los genes que codifican las proteínas que forma estos grandes complejos multienzimáticos suelen estar agrupados en grandes operones o clusters, donde cada módulo responsable de la adición de un

aminoácido concreto esta constituido por dominios muy similares a otros del mismo operon. (Martin *et al.*, 2002)



Figura 1. Estructura del gen cluster (*mcy*), el cual codifica para: Rayado: Poliketido sintasa; Negro: Péptidos no ribosomales; Blanca: Enzimas involucradas en la biosíntesis de microcistina (Moffit y Neilan, 2004)

El dominio aminotransferasa (AMT), esta localizado en el modulo *mcyE* del complejo enzimático microcistin sintetasa –*mcy*- (figura 1). Este dominio esta compuesto por alrededor de 430 aminoácidos. El dominio AMT tiene un rol importante en la biosíntesis de las microcistinas ya que transfiere un grupo amino (NH_2) a la molécula ADDA o de glutamato semialdehído a glutamina (Hisberger *et al.*, 2003).

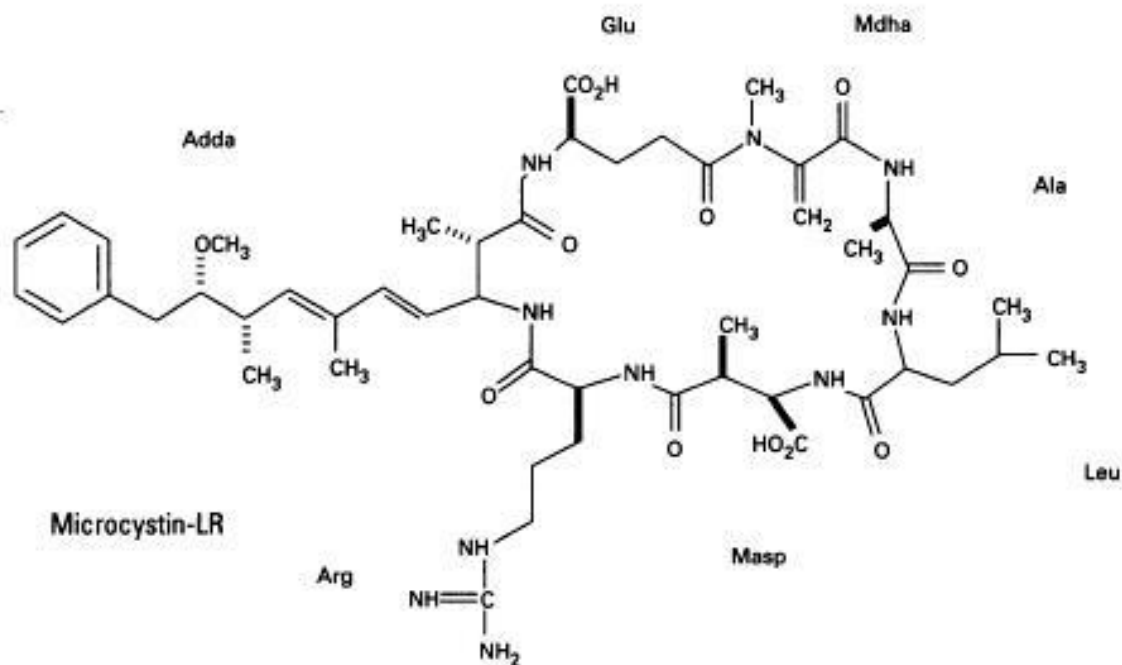


Figura 2. Estructura general de las microcistinas. Es una ciclo (-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-), en la que X y Z pueden ser varios L aminoácidos, D-MeAsp es D-eritro-b-ácido metilaspártico, Adda es un aminoácido atípico: 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico, y Mdha es N-etildehidroalanina. En la figura se representa concretamente la Microcistina-LR (Roset *et al.*, 2001)

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para la detección de cianobacterias tóxicas, dentro de los cuales se tienen: orientados a la identificación de las especies por microscopía, apoyados con la valoración de la toxicidad mediante bioensayos que pueden ser en ratón, en organismos acuáticos del género *Daphnia* o *Artemia*, así como ensayos alternativos en cultivos celulares; Asimismo se cuenta con análisis físico-químicos como el HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para detectar la toxina; Técnicas inmunológicas como kits de ELISA para microcistina; Además de técnicas genéticas, en donde determinadas secuencias de material genético (rARN y ADN), permiten diferenciar géneros e incluso cepas tóxicas dentro de una misma especie (Hisberger *et al.*, 2003; Roset *et al.*, 2001).

En años recientes otra alternativa ha sido la utilización de pruebas moleculares como el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), este término se aplica al proceso bioquímico realizado *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales del ADN blanco son duplicadas por una enzima (ADN polimerasa) en cada uno de los ciclos que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de copias del gen o segmento del ADN sometido al proceso (Erlich, 1992; Voet y Voet, 1995; Lo, 1998). Actualmente por su versatilidad, esta técnica se ha convertido en uno de los métodos más ampliamente usados en diagnóstico molecular, y por ende, su uso nos ayuda a realizar una pronta detección de cepas potencialmente tóxicas y así dar control y seguimiento de los desarrollos masivos de cianobacterias y con esto contribuir a garantizar la calidad del agua en las fuentes de abastecimiento para consumo humano.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con relación a la presencia de florecimientos de cianobacterias en fuentes de abastecimiento de agua para consumo humano en México, se ha reportado su presencia en el lago de Chapala en el estado de Jalisco y en Valle de Bravo en el Estado de México, de esta última se tienen registros de florecimientos de 1998 a la fecha y de la presencia de microcistina-LR. La presa Valle de Bravo y los diferentes cuerpos de agua que conforman el sistema Cutzamala, proveen cerca del 30% del agua potable a los habitantes (aproximadamente 6,000,000) de la ciudad de México. En estos sitios durante casi 6 meses al año se aprecia la presencia de cianobacterias con florecimientos durante los meses cálidos (Ramírez *et al.*, 2004). Así como en cuerpos de agua del distrito Federal entre los que están el lago de Chapultepec, la Pista de remo y canotaje de Cuemanco, Xochimilco y el Lago del parque Tezozomoc, los cuales se encuentran eutrofizados antropogénicamente, tal condición estimula los florecimientos de cianobacterias trayendo como consecuencia una disminución de la calidad del agua de uso recreativo y del uso del potencial del recurso (Alva, 2007).

Ante la evidencia de la presencia de cianobacterias en cuerpos de agua para diferentes usos surge la necesidad de establecer un programa de vigilancia y monitoreo ya que debido a los procesos de eutrofización acelerada es factible la presencia de florecimientos que puedan presentar niveles de microcistina-LR por arriba del valor guía recomendado por la OMS, que es de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ en agua potable (Chorus *et al.*, 1998).

Sin embargo, la detección de cianobacterias tóxicas es complicada porque las características morfológicas y fisiológicas no correlacionan con la toxicidad (Pearson y Neilan, 2008). Los estudios en campo regularmente, se han orientado a la identificación de las especies por microscopía, apoyados con la valoración de la toxicidad mediante bioensayos, métodos fisicoquímicos, bioquímicos o inmunológicos. Dependiendo del método usado, pueden ser bastante intensivos, lentos, requerir laboriosos protocolos, equipo costoso y están enfocados a detectar la presencia de la toxina en las muestras.

Por lo anterior es que los métodos moleculares como la PCR, están usándose cada vez mas dado que son, rápidos, sensibles y específicos (Hisberger *et al.*, 2003; Jungblut, 2006; Rantala, 2006; Gobler, 2007; Pearson and Neilan, 2008) y su estandarización e implementación en México nos permitirá desarrollar sistemas de

monitoreo y detección de proliferaciones de cianobacterias potencialmente tóxicas en cuerpos de agua que sean fuentes de agua potable o de uso recreativo.

HIPÓTESIS.

Si se detecta la secuencia del dominio aminotransferasa (AMT), que está localizado en el módulo *mcyE* del complejo enzimático microcistis sintetasa mediante métodos moleculares, se podrán identificar géneros de cianobacterias que potencialmente puedan producir hepatotoxinas.

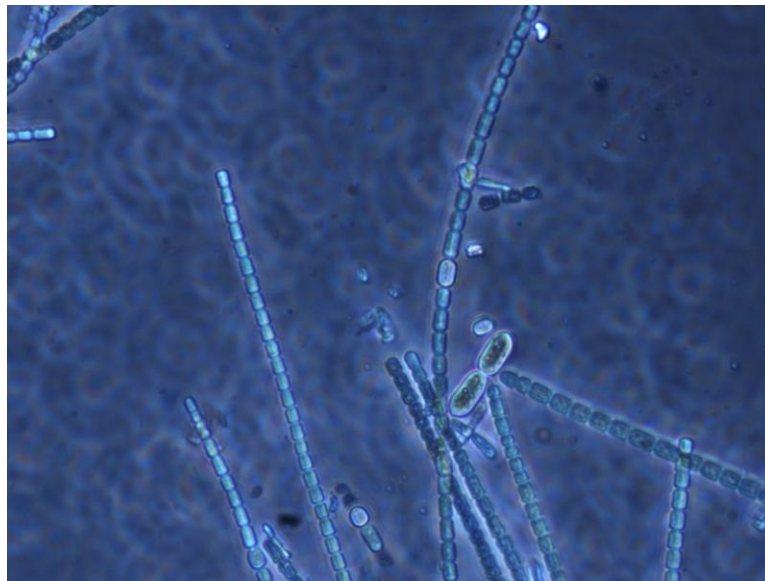
OBJETIVOS

- Estandarizar y evaluar técnicas basadas en la amplificación del ADN por medio de la prueba de PCR para la detección de la secuencia del dominio aminotransferasa (AMT) del módulo *mcyE* en cianobacterias potencialmente tóxicas provenientes de florecimientos en diferentes cuerpos de agua en México.
- Confirmar mediante la prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) la presencia de la microcistina en las muestras ambientales que presentaron la secuencia del dominio AMT.

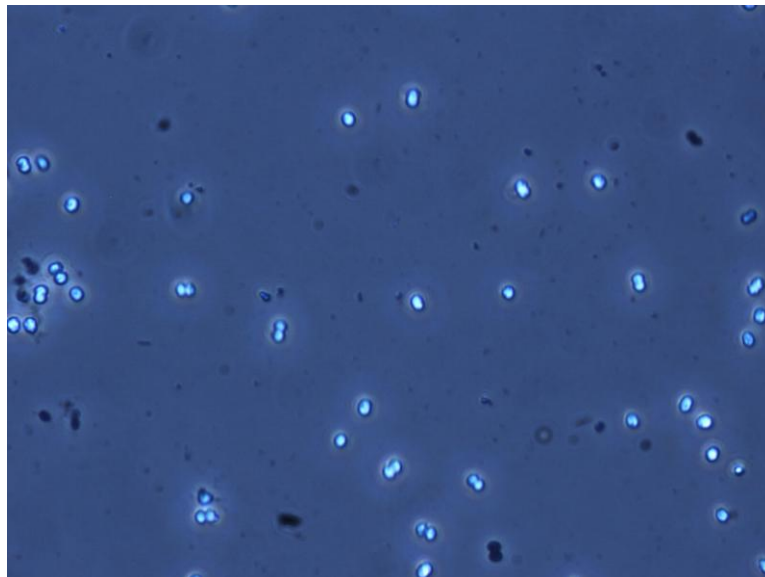
MATERIAL Y MÉTODOS

I. Muestras (tabla 1):

1. Cepas de referencia del Instituto Pasteur: *Anabaena cilíndrica* PCC 7172 y *Anabaena* sp. PCC 7108 (no capaces de sintetizar microcistina); *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 y *Microcystis aeruginosa* PCC 7941 (potencialmente productoras de microcistina), las cuales fueron usadas para estandarizar la prueba y usarlas posteriormente como controles (positivo-negativo).



Anabaena cilíndrica PCC 7172



Microcystis aeruginosa PCC 7806

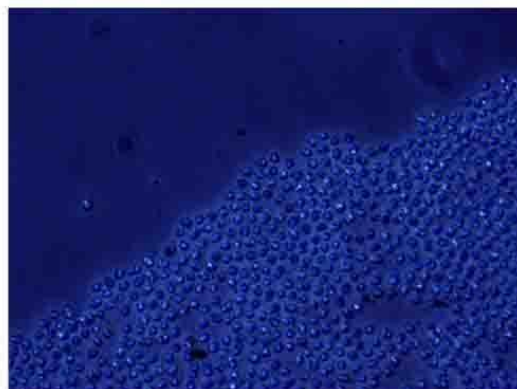
2. Florecimientos de Zumpango, Valle de Bravo, Xochimilco (muestras colectadas por miembros del laboratorio de bacteriología-UIICSE a cargo del Doctor Pedro Ramírez García) y Monocultivo de *Anabaena* (aislada y cultivada en el Laboratorio de Bacteriología/Cyma UIICSE).

a) Lago de Xochimilco: El lago es de forma irregular, alargado, de 9600m Oriente a Poniente y 3800m de Norte a Sur. La longitud aproximadamente de los canales es de 189km con un ancho de 1 a 65m y una profundidad que va de 50cm mínima a 2m máxima en promedio. El aporte de agua que tiene este sistema está regido por las épocas de lluvia, el aporte de agua tratada proveniente de las plantas de tratamiento, agua residual sin tratamiento proveniente de los asentamientos humanos irregulares de la zona, escurrimientos de la sierra Chichinautzin, manantiales internos (recarga natural) y aporte de los ríos Santiago, San Buenaventura, San Lucas, San Gregorio y Milpa Alta (Contreras, 2007; Guerrero y Tapia., 2007).

Xochimilco

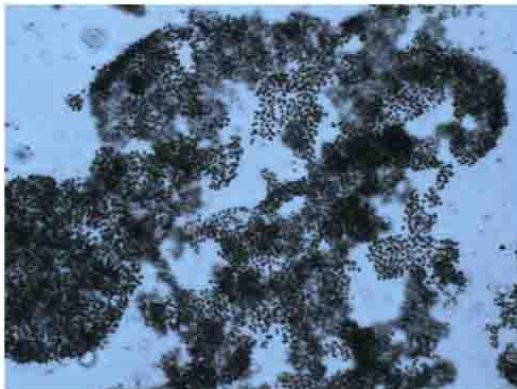


Microcystis sp



b) Embalse Valle de Bravo. Tiene una superficie de 18.55km², largo máximo de 7.3km, ancho máximo de 6.3km, profundidad media de 21m y profundidad máxima de 38.6m. La precipitación media anual es de 1320mm en la temporada de lluvias de junio a septiembre. El embalse cuenta con el aporte del Rio Amanalco, Rio Molino, Rio González, Rio Carrizal, el drenaje local del pueblo de Valle de Bravo y a partir de 1987, la aportación de agua en la zona de la cortina de la represa Colorines. Actualmente es el embalse mas grande y relevante del sistema Cutzamala, suministra cerca del 38% del sistema y aproximadamente el 30% del consumo de agua de la zona metropolitana de la ciudad de México (Carnero, 2008)

Valle de Bravo



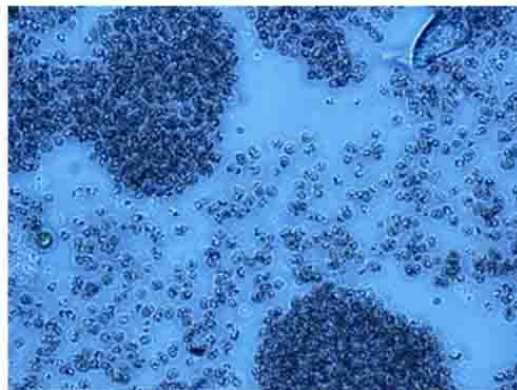
Microcystis sp

- c) Laguna de Zumpango. Constituye uno de los últimos vestigios prehistóricos del gran cuerpo de agua del Valle de México, su tamaño se ha ido reduciendo a lo largo del tiempo, cuenta con una extensión de 2000 hectáreas, con 18.5km de perímetro de bordo, una captación de agua proveniente del Rio Cuautitlán, Presa de Guadalupe y escurrimientos naturales de agua pluvial (Valadez, 1998). Es un almacenamiento de agua para su uso en la agricultura, así como la práctica de la pesca y actualmente se ha adaptado para funcionar como un parque ecoturístico.

Zumpango

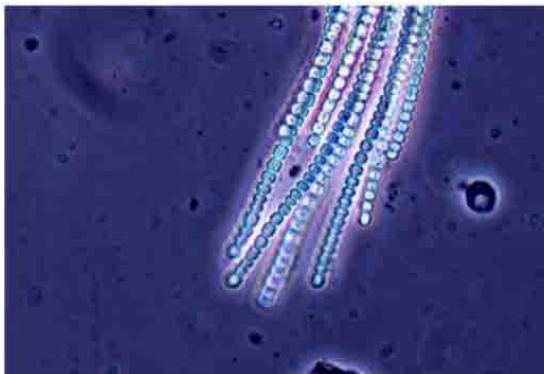
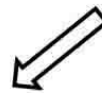


Microcystis sp



d) Muestra de monocultivo de *Anabaena* sp. proporcionado por el laboratorio de bacteriología y proyecto Conservación y Mejoramiento del Ambiente (Cyma) de la UIICSE a cargo del Dr. Pedro Ramírez García.

Monocultivo
Lab. Bact./Cyma-UIICSE



Anabaena sp.

Tabla 1. Muestras utilizadas para realizar las pruebas moleculares

Tipo de muestra	Muestra
Cepa de Referencia	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7172
Cepa de Referencia	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7168
Cepa de Referencia	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806
Cepas de Referencia	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7941
Monocultivo Lab. Bacteriología/Cyma UIICSE	<i>Anabaena</i> sp.
FloreCIMIENTO	Colecta de Zumpango 2004 (<i>Microcystis</i> sp. sonicadas)
FloreCIMIENTO	Colecta de Valle Bravo 2006 (<i>Microcystis</i> sp. sonicadas)
FloreCIMIENTO	Colecta de Valle Bravo 2007 (<i>Microcystis</i> sp. sonicadas)
FloreCIMIENTO	Colecta de Valle Bravo 2005 (<i>Microcystis</i> sp. sonicadas)
FloreCIMIENTO	Colecta de Pista de canotaje (<i>Microcystis</i> sp. Xochimilco)
FloreCIMIENTO	Colecta de CIBAC (<i>Microcystis</i> sp. Xochimilco)
FloreCIMIENTO	Colecta Zumpango (<i>Microcystis</i> sp.) 2008

II. Preparación de muestras

Las muestras de campo frescas y liofilizadas rehidratadas (± 100 mg), se centrifugan a 12 000 rpm en tubos eppendorf y después se retira el sobrenadante, posteriormente se resuspenden en agua destilada y se vuelven a centrifugar.

III. Lisis celular

Se agregan 500 μ l del buffer XS (Tillet y Neilan, 2000) y se incuban las muestras por dos horas a 65 °C. y se agitan en vórtex cada media hora.

Se ponen en hielo por 10 minutos y se centrifugan a 12 000 rpm.

Se colecta el sobrenadante en un tubo nuevo.

IV. Extracción del ADN

Se añade un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) se invierte el tubo algunas veces y se centrifuga a 12 000 rpm por 5 minutos. Se remueve el sobrenadante y se pasa a un tubo nuevo.

Se repiten los pasos anteriores hasta obtener un sobrenadante transparente.

Se añade 1 volumen de isopropanol y 1/10 de acetato de amonio 4M y se deja por 30 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifuga a 12 000 rpm por 10 minutos para obtener el ADN y después se lava con etanol al 70 %. Nuevamente se centrifuga a 12 000 rpm y se deja secar.

Finalmente el ADN se resuspende en 100 µl de agua estéril y se cuantifica en un espectrofotómetro para determinar la cantidad que se usará para la PCR.

V. Amplificación de la región del gen *mcvE* que codifica para la sección del dominio aminotransferasa (AMT).

Para la PCR se utilizaron dos pares de oligonucleótidos (tabla 2) que limitan una secuencia específica del gen *mcvE*-AMT de 472 pares de bases (figura 3), de cianobacterias productoras de microcistina (Jungblut AD y Neilan BA. 2006), dichos oligonucleótidos fueron sintetizados por una compañía comercial (Invitrogen). Los productos de PCR son analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y finalmente visualizados con luz ultravioleta. La detección de las cianobacterias que sintetizan la hepatotoxina se basa en la obtención de un amplificado que debe de corresponder con el número de pares de bases esperado.

Oligonucleótido	Secuencia
HEPF	5'-TTTGGGGTAACTTTTTGGGCATAGTC-3'
HEPR	5'-AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT-3'

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la PCR. Estos nucleótidos limitan una secuencia específica del gen *mcvE*-AMT de 472 pares de bases, de cianobacterias potencialmente productoras de microcistina (Jungblut y Neilan, 2006).

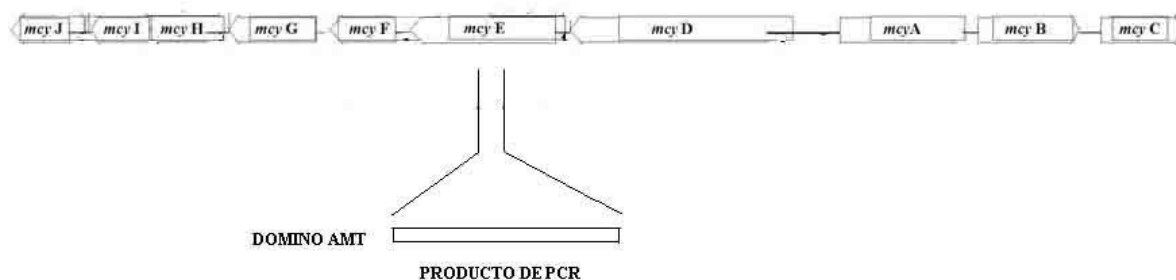


Figura 3. Localización del amplificado dentro de la secuencia del dominio aminotransferasa (AMT) del módulo *mcyE* del gen cluster *mcy*.

Condiciones y concentraciones empleadas en la prueba de PCR para la amplificación de la secuencia específica del gen *mcyE*-AMT

Condiciones		
Etapas	No. de ciclos	Condiciones
Desnaturalización inicial	1	92°C por 2 minutos
Desnaturalización	35	92°C por 20 segundos
Alineamiento	35	52°C por 30 segundos
Amplificación	35	72°C por 1 minuto
Amplificación final	1	72°C por 5 minutos

Concentraciones			
Reactivos	Solución Stock	Concentración final	Volumen
Amortiguador	10x	1x	2 µl
Cloruro de Magnesio	50 mM	2.5 mM	1 µl
Deoxinucleótidos	5 mM c/u	0.2 mM c/u	0.8 µl
Iniciador 1	50 pM	2.5 pM	1 µl
Iniciador 2	50 pM	2.5 pM	1 µl
Taq polimerasa	5 U/µl	2.5 U	0.5 µl
AND		20- 100 ng	1 µl
Agua (cbp)	--	--	20µl

Con efectos de corroborar que la secuencia amplificada pertenece a cianobacterias y no a otros microorganismos previamente a la amplificación de la secuencia del gen *mcyE*-AMT, se amplifica una secuencia del gen PC-IGS que es específico para cianobacterias (Neilan *et al* 1995)

RESULTADOS

En todas las muestras se determinó por PCR, inicialmente la presencia de la secuencia del gen PC-IGS, en donde en todas las muestras trabajadas que no tenían el ADN degradado se logro obtener el amplificado y, posteriormente a estas muestras, se analizó la presencia de la secuencia del gen *mcyE*-AMT (fotos 1-4), en las que en 5 muestras dieron positivas a esta secuencia y a éstas adicionalmente se realizó la prueba de ELISA para determinar si las muestras estaban expresando la microcistina como se representa en la siguiente tabla.

Resultados obtenidos con las muestras procesadas.

Tipo de muestra	Amplificación Secuencia PC-IGS	Amplificación Secuencia <i>mcyE</i> - AMT	ELISA
a) <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7172	+	-	-
b) <i>Anabaena</i> sp PCC 7168	+	-	-
c) <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	+	+	+
d) <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7941	+	+	+
e) Monocultivo de <i>Anabaena</i> (Lab Bacteriología/Cyma UIICSE)	+	+	+
f) Colecta de Valle Bravo 2006 (<i>Microcystis</i> sp sonicadas)	+	+	+
g) Colecta de Valle Bravo 2007 (<i>Microcystis</i> sp sonicadas)	+	+	+
h) Colecta de Pista de canotaje (<i>Microcystis</i> sp Xochimilco)	+	-	-
i) Colecta de CIBAC (<i>Microcystis</i> sp Xochimilco)	+	-	-
j) Colecta Zumpango 2008(<i>Microcystis</i> sp)	+	+	+

(+) positivo; (-) negativo

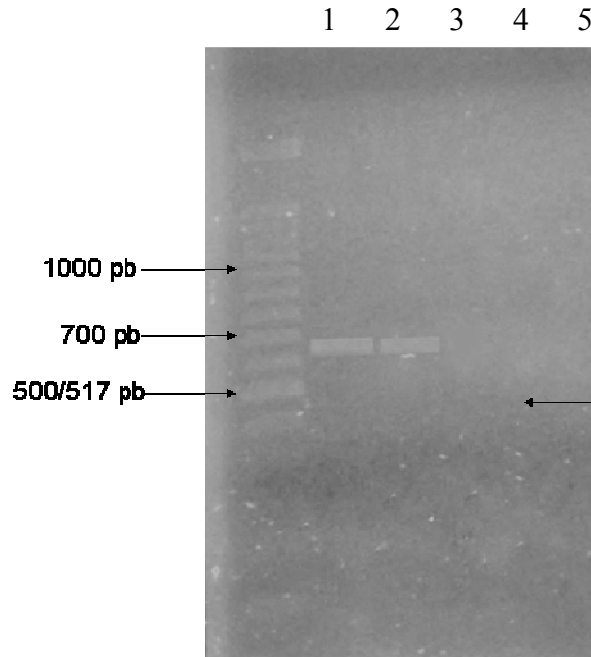


Foto 1: Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio donde se presenta la amplificación de los productos para la secuencia PC-IGS y no para la secuencia *mcyE*-AMT de las cepas de referencia no capaces de producir microcistina. Carril 1. Marcador biolabs (N3231S); carril 2-3: muestra a y b, PCR PC-IGS; carril 4-5 muestra a y b, PCR *mcyE*-AMT

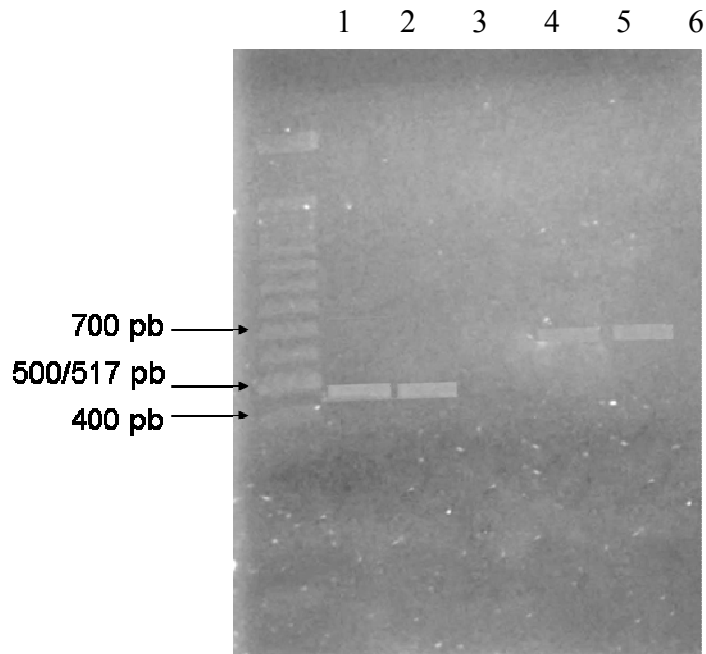


Foto 2: Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio donde se presenta la amplificación de los productos para la secuencia *mcyE*-AMT y no para la secuencia PC-IGS de las cepas de referencia capaces de producir microcistina. Carril 1. Marcador biolabs (N3231S); carril 2-3: muestra c-d, PCR PC-IGS; carril 5-6 muestra c-d, PCR *mcyE*-AMT

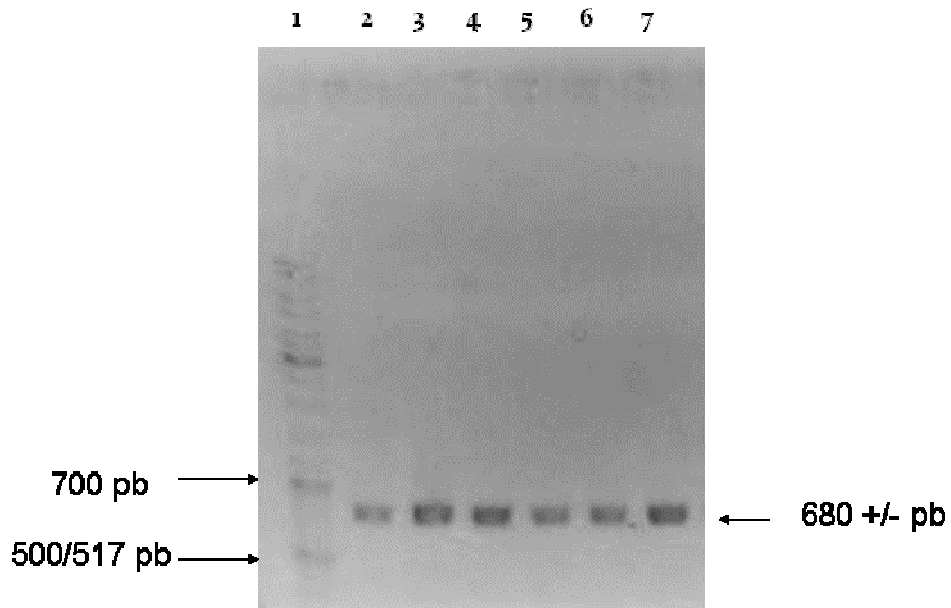


Foto 3: Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio donde se presenta la amplificación de los productos para la secuencia PC-IGS de muestras de florecimientos. Carril 1. Marcador biolabs (N3231S); carril 2-6: muestras e-j, PCR PC-IGS

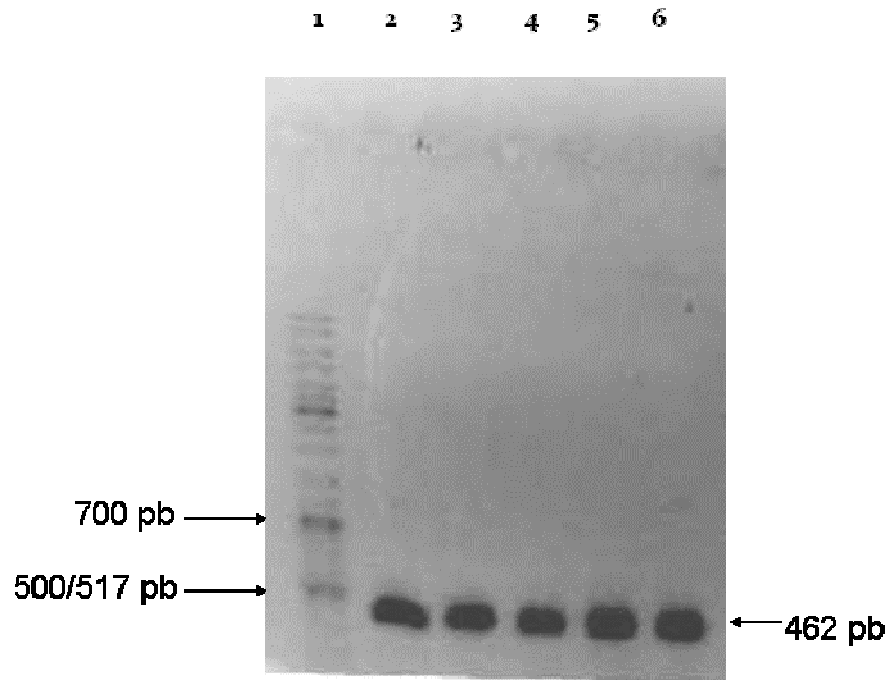


Foto 4: Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio donde se presenta la amplificación de los productos para la secuencia *mcyE*-AMT de muestras de florecimientos. Carril 1. Marcador biolabs (N3231S); carril 2-6: muestras c, e, f, g y j; PCR *mcyE*-AMT

DISCUSIÓN

En México, se han venido presentando con mayor frecuencia florecimientos cianobacterianos (Ramírez, 2004) los que representan un serio problema medioambiental, no solo por los graves efectos que ocasionan sobre el recurso hídrico y el ecosistema, sino fundamentalmente, porque estas producen de forma habitual toxinas que pueden tener efectos nocivos sobre la salud de personas y animales expuestos. Los métodos de detección de las toxinas varían desde el bioensayo hasta los más sofisticados equipos de HPLC que advierten sobre la presencia de la toxina.

En el presente trabajo se consideró de primera importancia la estandarización e implementación de un método de detección de cianobacterias de aguas continentales potencialmente tóxicas, el cual se basa en la amplificación de una secuencia del módulo *mcyE* del complejo enzimático microcistin sintetasa que es característico de las cianobacterias hepatotóxicas. Se evaluaron diferentes técnicas descritas en trabajos anteriores para cuerpos de agua en otros países (Pearson y Neilan 2008), donde al final se adoptó el método descrito por Tillett y Neilan en el 2000. Después de varios ensayos, se le realizaron algunos ajustes a esta técnica para su mejor desempeño, como fue aumentar los tiempos contemplados dentro incubación, así como realizar agitación rigurosa por medio de vórtex cada media hora durante ésta para obtener una mejor lisis en la cianobacterias, así como añadir el paso de la purificación de ADN con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) con el fin de lograr una mejor calidad y cantidad de ADN. Con esto, se consiguió amplificar la secuencia del gen PC-IGS, con lo que se demuestra que efectivamente se esta trabajando con cianobacterias, ya que este gen es específico para ellas (Neilan *et al.* 1995), no se logro obtener este amplificado en las muestras de Zumpango 2004 y de Valle de Bravo 2005, donde a pesar de que se trabajo con muestras de cianobacterias, no se logro obtener la amplificación para la secuencia del gen PC-IGS, esto debido a que en estas muestras el ADN se encontraba degradado como se encontró al visualizar el ADN por luz ultravioleta. A aquellas muestras que sí amplificaron la secuencia PC-IGS se les realizó la PCR para detectar si efectivamente eran potencialmente tóxicas, en éstas se pudo observar que las muestras tanto de Valle de Bravo como de Zumpango dieron positivas para la amplificación de la secuencia del módulo *mcyE* del complejo enzimático microcistin sintetasa, y por lo tanto son potencialmente tóxicas. Después se confirmó su toxicidad mediante la prueba de ELISA, donde se observó que la toxina estaba presente. Por otro lado, en las

muestras de Xochimilco no se observó que fueran potencialmente tóxicas, ya que no se logró ningún amplificado y esto coincidió con los resultados de ELISA, donde tampoco se detectó la toxina.

Con los resultados obtenidos, y considerando que en Zumpango y Valle de Bravo se obtuvieron resultados positivos para la secuencia del dominio *AMT-mcyE* en las muestra colectadas en distintos tiempos; lo que no sucedió en Xochimilco al obtenerse resultados negativos, es de de interés hacer un estudio actualizado de los factores ambientales y humanos, así como estudios fisicoquímicos del agua para identificar cual es la característica o factor que tienen estos cuerpos de agua y determinar porqué en Valle de Bravo y Zumpango existen cianobacterias potencialmente tóxicas y en Xochimilco no. Con los datos generados se afirma que las muestras colectadas de Valle de Bravo y Zumpango, a pesar de que fueron colectadas en diferentes años, muestran la constante de que en todos se ha expresado el gen que codifica para la toxina, por lo que se sugiere hacer monitoreos exhaustivos en florecimientos que se produzcan en estos cuerpos de agua, para prevenir posibles intoxicaciones de los usuarios o de personas o animales que tengan contacto directo con este tipo de aguas. Aunque también cabe la posibilidad de que en el momento de la colecta en Xochimilco, en ese periodo no haya habido cianobacterias con la secuencia del dominio *AMT-mcyE*, esto coincide con lo reportado acerca de que los florecimientos pueden variar en cuanto a su población (potencialmente tóxicos y no tóxicos) tal como lo encontraron Neilan y colaboradores en el 2001.

También cabe resaltar que aunque se encuentre un resultado positivo en la prueba de PCR e indique la potencialidad para producir la toxina, no necesariamente encontraremos resultados positivos en la prueba de ELISA, ya que puede tener el gen para sintetizar la toxina pero no estarlo expresando. Existen varios estudios para determinar que factores detonan la expresión de la toxina (Jiang Y *et al*, 2008; Hotto *et al*, 2008, Gouvea, 2008), pero aun no se identifica categóricamente cuales son los factores que provocan esto.

En cuanto a la muestra de *Anabaena* sp. cultivada en el Lab. de Bacteriología del Proyecto Cyma se detectó que es potencialmente tóxica, y esto es coincidente con los datos obtenidos en la prueba de ELISA, así como con lo reportó Caviedes en el 2007.

Asimismo de las muestras que se hallaron que estaban expresando la microcistina, dado que dieron positivo a la prueba de ELISA, encontramos que los

niveles de esta en el agua estaban por debajo de los niveles que la OMS recomienda que no deben ser superiores a un microgramo por litro (Chorus *et al.*, 1998), ya que se encontraron cantidades de nanogramos por litro. Aunque a pesar de ser niveles que están dentro de los permitidos, se tienen que estar monitoreando con énfasis estos cuerpos de agua (Valle de Bravo y Zumpango), ya que en cualquier momento se puede elevar la concentración de microcistina y ocasionar efectos dañinos a humanos y animales que tengan contacto con el agua de estos sitios.

Con base en todo lo anterior, esta tecnología basada en la amplificación de ADN para la detección de cianobacterias tóxicas, representa una herramienta significativamente útil para el monitoreo de la calidad del agua. Lo que nos permitirá identificar componentes microbianos dentro de poblaciones naturales complejas, basada en secuencias específicas de ácidos nucleicos e identificar tajantemente a las especies cianobacterianas potencialmente tóxicas, asimismo se podrán implementar sistemas de monitoreo y detección a largo plazo, y por lo tanto la posibilidad de alertar de una futura proliferación.

Por ejemplo, ante la sospecha de un florecimiento de cianobacterias, debe aplicarse el principio de precaución, asumiéndose que es toxigénico mientras que no se demuestre lo contrario. Un procedimiento de trabajo actual con el fin de prevenir y monitorear comprendería: muestreo periódico, análisis microscópico con identificación morfológica y recuento de colonias de cianobacterias. Identificación de las colonias potencialmente tóxicas por métodos moleculares, determinar si están produciendo la toxina mediante pruebas de citotoxicidad, ELISA, HPLC, etc. En el caso de determinarse la presencia de un florecimiento tóxico, deben desplegarse un conjunto de medidas para evitar el acceso de personas y animales a los cuerpos de agua, así como limitar los usos del agua.

Finalmente cabe mencionar que aunque los métodos moleculares como la PCR tienen ciertas desventajas, ya que se debe de contar con el equipo y el personal calificado para realizar la prueba; al realizar los ensayos, se tiene que ser cuidadoso para evitar contaminación de las muestras e inhiba la reacción; y principalmente tener las secuencias específicas que se quieren amplificar. Pero contando con lo anteriormente mencionado, estos métodos, al ser económicos, rápidos y sensibles, los hace no solo útiles en la identificación de florecimientos potencialmente tóxicos, sino también los hace ideales para estudios de fisiología y ecología en cianobacterias como en años

recientes grupos de investigadores en el mundo lo han comenzado a hacer (Gobler, 2006; Kim, 2006; Kardinaal *et al*, 2007; Hotto A, *et al*, 2008).

CONCLUSIONES

- Con los resultados obtenidos se logró estandarizar e implementar las técnicas moleculares para identificar las cianobacterias potencialmente tóxicas de muestras ambientales en los cuerpos de agua de Valle de Bravo, Zumpango y Xochimilco.
- Se determinó que en el embalse Valle de Bravo y Laguna de Zumpango, existen florecimientos de cianobacterias potencialmente tóxicas, dado que contaban con la secuencia del dominio AMT-mcyE de 462 pb como se observó en los resultados y que las muestras del lago de Xochimilco no poseían la secuencia.
- Además de utilizar estas herramientas moleculares para detectar cianobacterias potencialmente productoras de microcistina, se podrán realizar estudios ecológicos y fisiológicos para determinar el factor o los factores que favorecen que las cianobacterias lleven a cabo la síntesis de la toxina; asimismo esta información será de gran utilidad para realizar estudios filogenéticos en lo que corresponde a cuerpos de agua en México.

BIBLIOGRAFÍA

- Alva, A. (2007). Selección y Cultivo de rotíferos y Cladóceros Capaces de Utilizar *Microcystis aeruginosa* como alimento: estudio de laboratorio y mesocosmos. Tesis de Doctorado. UAM. México.
- Caviedes, S. M. (2007). Dinámica Poblacional de Tres Especies de Cladóceros (*Daphnia pulex*, *Moania macrocopa* y *Simocephalus vetulus*) utilizando una cianobacteria (*Anabaena* sp.) y una alga verde (*Scenedesmus acutus*) como Alimento. Tesis de Licenciatura. FESI-UNAM. México.
- Chorus, I., Falconer, I.; Salas, H., Bartram, J. (1998). Riesgos a la salud causados por cianobacterias y algas de agua dulce en aguas recreacionales. Asociación Peruana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; AIDIS. Gestión ambiental en el siglo XXI. Lima, APIS, p.1-30.
- Chorus, I. and J. Bartram. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO. E&FN Spon. London and New York. 416 pg.
- Erlich, H. (1992) PCR Technology. Oxford University Press. USA. 1-5.
- Falconer I, (ed.; 1993) *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, Londres, San Diego, Nueva York, Boston, Sidney, Tokio, Toronto. ISBN 0-12-247990-4. 224pp.
- Gobler, C.J., Davis T., Coyne K., Boyer G. (2007). Interactive Influences of Nutrient Loading, Zooplankton grazing, and Microcystin Synthetase gene expression on Cyanobacterial Bloom Dynamics in a Eutrophic Ney York Lake. *Harm. Alg.* 6:119-133
- Gouvea, S. P., Boyer G. L. and Twiss M. R. (2008). Influence of Ultraviolet radiation, Copper and zinc on Microcystin Content in *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae.* 7: 194-205
- Hisberger, M. and Christiansen G. (2003). PCR-based Identification of Microcystin-producing Genotypes of Different Cyanobacterial Genera. *Arch Microb.* 180:402-410
- Hotto, A. M., Satchwell, M. F., Berry, D. L., Gobler, J. C. and Boyer, F. L. (2008). Spatial and temporal diversity of Microcystin and Microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae.* 397:1-11.

- Jiang, Y., Ji, B. and Wong, M. H. (2008). Statistical Study on the Effects of Environmental Factors on the Growth and Microcystin Productions of Bloom-forming Cyanobacterium-*Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*. 7:127-136.
- Jungblut, A. D. and Neilan, B. A. (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 185: 107-114.
- Kardinaal, W., Tonk, L., Janse, I., Hol, S., Slot, P., Huisman, J., y Vissier P. (2007). Competition for Light Between Toxic and Nontoxic Strains of Harmful Cyanobacterium *Microcystis*. *Appl Env Microb.* 73:9: 2939-2946.
- Kaebnick, M. and Neilan, B. (2001). Ecological and Molecular Investigations of Cyanotoxin Production. *FEMS Microb. Ecol.* 35:1-9
- Kim, S. G., Rhee, S. K., Ahn, C. Y., Ko, S. R., Choi, G. G., Bae, J. W., Park, Y. H. and Oh, H. M. (2006). Determination of Cyanobacterial Diversity during Algal Blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the Basis of *cpcBA* Intergenic Spacer Region Analysis. *Appl Env Microb.* 72:5:3252-3258.
- Lanzarot M. (2008). Cianobacterias Toxicas y Mortandades en Masa de Fauna Salvaje en las Marismas de Doñaña. Tesis de doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid
- Lo, D. (1998). *Clinical Application of PCR*. Humana Press. USA. 3-9, 101-102.
- Moffitt, M. C. and Neilan, B. A. (2004). Characterization of the Nodularin Synthetase Gene Cluster and Proposed Theory of the Evolution of Cyanobacterial Hepatotoxins. *Applied and Env. Microbiol.* Vol. 70, 11: 6353-6862
- Martin B., Hernandez, J., Lopez, S., Inda, L., Bes, T., Fillat, M., Peleato, M. (2002). Estudios de Homología entre Regiones del Operon *mcy* de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 y muestras de la estancia Alcañiz (Teurel). *Rev. Real Acad. Cien. Zarag.* 57: 231-239
- Neilan, B. A., Jacobs, D. and Goodman E. (1995). Genetic diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria –determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus. *Applied and Env. Microbiol.* Vol. 61, 11: 3875-3873.
- Pearson, L. and Neilan, B. (2008). The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:1-8.
- Ramírez, P., Martínez, E., Martínez, M. D., Eslava, C. (2004). Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana en Rosas I y

cols., Microbiología Ambiental (84-106), México: INE-SEMARNAT ISBN 968-817-707-5

- Schopf, J. and Walter, M. (1982). Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. En: *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications. Chapter 21. Pp. 543-564
- Rantala, A., Rajaniemi, P., Lyra, C., Lepisto, L., Rintala, J., Mankiewicz, J. y Sivonen, K. (2006). Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Finnish Lakes with Genus-Specific Microcystin Synthetase Gene E (*mcyE*) PCR and Associations with Environmental Factors. *Appl. Env. Microbiol.* 72:9: 6101-6110.
- Roset, J., Aguayo, S., Muñoz, M. J. (2001). Detección de Cianobacterias y sus Toxinas. Revisión. *Rev. Toxicol.* 18:65-71.
- Tillet, D. and Neilan, B. (2000). Xanthogenate Nucleic Acid Isolation from Cultured and Environmental Cyanobacteria. *J Phycol*, 36. 251-258
- Voet D, Voet J. (1995). *Biochemistry*. John Wiley and Sons. 2nd edition. USA. 896, 904-906.

ANEXOS

ANEXO 1. EJEMPLO DE ALGUNOS REGISTROS DE INTOXICACIONES ANIMALES A NIVEL MUNDIAL

País	Animal	Patología	Cianobacteria	Referencia
Argentina	Vacunos	Hepatotoxina	<i>M. aeruginosa</i>	Odriozola <i>et al.</i> 1984
Australia	Ovinos	Hepatotoxina	<i>M. aeruginosa</i>	Jackson <i>et al.</i> , 1984
Australia	Ovinos	Neurotoxina	<i>A. circinalis</i>	Negri <i>et al.</i> , 1995
Canadá	Vacunos	Neurotoxina	<i>A. flos-aquae</i>	Carmichael & Gorham, 1978
Canadá	Aves	Neurotoxina	<i>A. flos-aquae</i>	Pybus & Hobson, 1986
Finlandia	Perros	Hepatotoxina	<i>N. spumigena</i>	Perrson <i>et al.</i> , 1984
Finlandia	Aves	Hepatotoxina	<i>P. agardhii</i>	Erikson <i>et al.</i> , 1986
Noruega	Vacunos	Hepatotoxina	<i>M. aeruginosa</i>	Skulberg, 1979
Inglaterra	Perros	Hepatotoxina	<i>M. aeruginosa</i>	Pearson <i>et al.</i> , 1990
Escocia	Perros	Neurotoxina	<i>Oscillatoria</i> sp.	Jun <i>et al.</i> , 1992
Escocia	Peces	Branquias-obstr.	<i>M. aeruginosa</i>	Bury <i>et al.</i> , 1995
USA	Perros	Neurotoxina	<i>A. flos-aquae</i>	Mahmood <i>et al.</i> , 1988

ANEXO 2. INTOXICACIONES AGUDAS DE SERES HUMANOS CON CIANOBACTERIAS

Casos atribuidos a cianotoxinas en agua de bebida

- ✓ 1931: EEUU: Un florecimiento masivo de *Microcystis* en los ríos de Ohio y Potomac afectó entre 5,000 y 8,000 personas que consumieron agua potable procedente de estos ríos. El tratamiento del agua potable mediante precipitación, filtración y cloración no fue suficiente para remover las toxinas (Tisdale, 1931).
- ✓ 1968: Schwimmer y Schwimmer (1968) recopilaron numerosos casos de enfermedad gastrointestinal luego de la exposición a la presencia masiva de cianobacterias.
- ✓ 1975: En Washington D. C., el florecimiento de cianobacterias en un reservorio de agua potable produjo un ataque endotóxico a 23 pacientes de diálisis (Hindman y otros, 1975).
- ✓ 1979: Australia: En Palm Island, el tratamiento con sulfato de cobre de un reservorio de agua potable que presentaba un florecimiento de *Cylindrospermopsis raciborskii* produjo la liberación de toxinas de células en el agua, lo cual enfermó gravemente (incluida hospitalización) a 141 personas que se abastecieron de este reservorio (Falconer, 1993,1994).
- ✓ 1981: Australia: En la ciudad de Armidale, los niveles de enzimas hepáticas fueron elevados en la sangre de la población abastecida de agua superficial contaminada con *Microcystis* spp. (Falconer y otros, 1983).
- ✓ 1985: EEUU: Carmichael (1994) reunió estudios de casos sobre: náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, infecciones al ojo, oído y garganta luego de la exposición a la presencia masiva de cianobacterias.
- ✓ 1993: China: La incidencia de cáncer al hígado está claramente relacionada con fuentes de agua y es considerablemente mayor en poblaciones que usan aguas superficiales infestadas con cianobacterias que en las que beben aguas subterráneas (Yu, 1995).

- ✓ 1993: Australia: Falconer (1994) estimó que, debido al florecimiento de cianobacterias tóxicas, anualmente se pierden 600,000 jornales en la obtención del agua.
- ✓ 1994: Suecia cerca de Malmö: el uso ilegal de aguas no tratadas de un río en una fábrica azucarera conllevó a una conexión cruzada accidental con el suministro de agua potable durante un número indeterminado de horas. El agua del río estaba densamente poblada con *Planktothrix agardhii* y las muestras tomadas poco antes y después del incidente mostraron que estas cianobacterias contenían microcistinas. De los 304 habitantes del pueblo, 121 personas (así como algunos perros y gatos) experimentaron vómitos, diarrea, calambres musculares y náuseas (Cronberg y otros, 1997).

Casos atribuidos a cianotoxinas en aguas recreativas

- 1959: Saskatchewan: A pesar de la muerte de ganado y las advertencias sobre su uso recreativo varias personas se bañaron en un lago infestado de cianobacterias. Trece personas presentaron síntomas como dolores de cabeza, náuseas, dolores musculares y diarreas con dolor). En el excremento de un paciente –un médico que ingirió accidentalmente 300 ml de agua– se identificaron claramente varias células de *Microcystis* spp. y algunas tricomas de *Anabaena circinalis* (Dillenberg y Dehnel, 1960).
- 1989: Inglaterra: Diez de veinte soldados se enfermaron luego de nadar y practicar canotaje en aguas con un fuerte florecimiento de *Microcystis* spp.; dos de ellos desarrollaron una neumonía severa atribuida a la inhalación de la toxina de *Microcystis* y tuvieron que ser hospitalizados e ingresar en la unidad de cuidados intensivos (Turner *et al.*, 1990). Las habilidades de natación y la cantidad de agua ingerida parecen estar relacionadas con la gravedad de la enfermedad.
- 1995: Australia: La evidencia epidemiológica acerca de los efectos adversos sobre la salud luego del contacto con aguas recreativas obtenida de un estudio prospectivo con 852 personas, mostró una elevada incidencia de diarrea, vómito, síntomas de gripe, erupciones en la piel, úlceras en la boca, fiebre,

irritación del ojo u oído después de 2 a 7 días de la exposición (Pilotto *et al.*, 1997). Los síntomas aumentaron significativamente según la duración del contacto con el agua y densidad de células cianobacterianas, pero no estuvieron relacionados con el contenido de cianobacterias conocidas.

Casos relacionados con otras vías de exposición

- ✓ 1996: Caruaru en Brasil: De un total de 130 pacientes expuestos a microcistinas a través del agua usada para diálisis, murieron 56. Al menos 44 de estas víctimas mostraban los típicos síntomas relacionados con microcistinas, actualmente denominados ‘Síndrome de Caruaru’ y el contenido de microcistinas en el hígado correspondía al de animales de laboratorio que habían recibido una dosis letal de microcistina (Carmichael, 1996).