



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Estandarización de una técnica molecular de PCR para identificar la presencia del gen *mcyE* en monocultivos y su seguimiento en muestras ambientales de cianobacterias potencialmente tóxicas.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

JORGE EDUARDO REA ESTEFANIA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA

MÉXICO, 2015

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México



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.

ÍNDICE

Introducción	3
Objetivos	8
Material y método	8
Resultados	13
Discusión.....	39
Conclusiones	44
Literatura citada.....	45

Introducción

Características generales

Hace aproximadamente 2,700 millones de años, en el periodo Pre-cámbrico, uno de los organismos con capacidad fotosintética más antiguos del planeta, las cianobacterias, fueron las responsables de crear una atmósfera oxidante como la que hoy conocemos, gracias a la liberación de oxígeno. Las cianobacterias pertenecen al dominio Bacteria y comparten características estructurales con bacterias heterótrofas y características funcionales con algunas algas (Vidal y Pérez, 2009). Las cianobacterias son organismos procariontes, fotoautótrofos oxigénicos, que presentan clorofila como su principal pigmento fotosintético y otros como la ficocianina y/o ficoeritrina, los cuales les confieren el color característico verde-azul a estos microorganismos (Lanzarot, 2008). Se pueden encontrar en formas unicelulares, coloniales o filamentosas, con una variabilidad de tamaño que va desde los 2 hasta los 20 μm de diámetro y de 0.5 a 2 μm en el caso de las picocianobacterias. Otra característica importante de estos organismos es que algunas especies planctónicas cuentan con aerotopos en sus células, mediante los cuales controlan su posición en la columna de agua (Pineda, 2009). Las cianobacterias se clasifican en 3 órdenes, de acuerdo a su morfología: Chroococcales, Oscillatoriales y Nostocales (Vidal y Pérez, 2009).

Estos organismos han tenido gran éxito para colonizar diversos ecosistemas gracias a su diversidad morfológica y pueden encontrarse en ambientes extremos como en los polos, en los desiertos o los cráteres volcánicos y en otros ambientes terrestres. Sin embargo la mayor parte de las especies de cianobacterias se encuentran en los sistemas de aguas continentales ya sea en la columna de agua o el bentos de lagos, lagunas, ríos y arroyos (Whitton y Potts, 2000), en donde desempeñan una función clave en la producción primaria acuática (Reynolds, 1984). Algunas especies pueden llegar a dominar ambientes acuáticos marinos; por ejemplo el grupo de las picocianobacterias cumple un papel muy importante en la producción primaria y en el ciclo de carbono de los océanos (Reynolds, 2006). Gracias a la capacidad de fijar nitrógeno de algunas cianobacterias, en ocasiones son los únicos organismos que habitan en aguas con una extrema deficiencia de nitrógeno. También juegan una importante labor como colonizadoras primarias, ya que son las que incorporan materia orgánica al suelo y de esta forma previenen la erosión. Ecológicamente también son importantes, ya que aunque la mayoría son de vida libre, algunas especies establecen relaciones simbióticas con diferentes organismos, como hongos, algas y protozoos, entre otros (Carrasco, 2007).

“Blooms”

El crecimiento de estos organismos depende de su habilidad para la optimización y obtención de recursos. Particularmente este grupo se ve favorecido con el aumento de los niveles de nutrientes, principalmente de nitrógeno y fósforo en los ambientes acuáticos. Los nutrientes provienen especialmente de aguas residuales no tratadas o parcialmente tratadas, residuos agrícolas, abonos y otros desechos de las industrias de la ganadería (Briand *et al.*, 2003). Otra de las causas ha sido el aumento del desarrollo urbano y por consecuencia el incremento de residuos sólidos y líquidos. Cuando los niveles de dichos nutrientes se encuentran por arriba de límites establecidos por varias organizaciones u observaciones de investigadores y se presentan en “exceso”, al cuerpo de agua se le denomina eutrófico y esta alza de nutrientes da origen a lo que se conoce como “blooms”, que son floraciones o florecimientos de cianobacterias que incrementan de forma masiva su biomasa. Su presencia en los cuerpos de agua es el principal factor del deterioro de su calidad por el aspecto, sabor y olor que le confieren al agua. Principalmente provocan cambios en el pH y oxígeno disuelto, así como otras alteraciones cuando las poblaciones que se presentan son productoras de toxinas. Algunas especies de cianobacterias se acumulan en la superficie de la columna de agua cuando ésta se encuentra en calma, formando una capa de algunos centímetros de espesor y de un color azul-verde que es característico del grupo (De León, 2002).

Las cianobacterias presentan algunas características que las hacen dominar sobre otros grupos de fitoplancton, algunas de estas son: en condiciones de poca luz, las cianobacterias pueden mantener una tasa de crecimiento relativamente mayor que el resto de los organismos fitoplanctónicos presentes (Chorus y Bartram, 1999); pueden regular su flotabilidad mediante vesículas de gas para colocarse en la columna de agua a aquellas profundidades donde la disponibilidad de nutrientes y luz sea la adecuada; tienen bajos requerimientos de nitrógeno y además poseen gránulos de reserva de fosfatos en su citoplasma (Vela *et al.*, 2007).

Toxinas

Muchos de los géneros de cianobacterias producen una gran variedad de compuestos conocidos como metabolitos secundarios y que se denominan toxinas y compuestos bioactivos (Hisbergues *et al.*, 2003). Aunque varias especies de cianobacterias en ambientes acuáticos pueden producir toxinas potentes, dentro de la misma especie pueden existir cepas productoras y no productoras (Roset *et al.*, 2001). La mayor producción de estas toxinas o cianotoxinas se da bajo condiciones óptimas para el crecimiento de estos organismos; cuando esto sucede se observa una producción directamente proporcional al aumento de la biomasa. Sin embargo en condiciones ambientales desfavorables para su

crecimiento se observa un colapso de los “blooms” y una lisis celular de las cianobacterias provocando la liberación de toxinas al medio y causando daños a los organismos acuáticos expuestos (Jiang *et al.*, 2008). El incremento de estas toxinas en el ambiente representa un riesgo para la salud humana, ocasionando respuestas letales o subletales a otros organismos que estén en contacto con ellas. Las cianotoxinas que con mayor frecuencia se reportan son las hepatotoxinas que incluyen las microcistinas, nodularinas y cilindrospermopsinas, seguidas de las neurotoxinas, dentro de las cuales están la anatoxina-a, anatoxina-a(S) y saxitoxinas (O’Neil *et al.*, 2012).

La mayoría de las neurotoxinas han sido identificadas como alcaloides o compuestos organofosforados neurotóxicos. Son consideradas como toxinas de acción rápida, ya que pueden causar la muerte por paro respiratorio a los pocos minutos de la exposición o por dosis orales en concentraciones elevadas. Los animales pueden ingerir una dosis letal al beber unos pocos mililitros de agua conteniendo altas concentraciones de cianobacterias procedentes de las acumulaciones superficiales conocidas como “scum” (Roset *et al.*, 2001).

Las hepatotoxinas son las que se han reportado con mayor frecuencia y son las que ocasionan el tipo más común de intoxicación relacionada con cianobacterias. Estas toxinas son de acción más lenta que las neurotoxinas, aunque también pueden causar la muerte en horas o a los pocos días. Estas toxinas han sido caracterizadas como heptapéptidos cíclicos (microcistinas) y como pentapéptidos (nodularinas). La estructura general de las microcistinas fue definida por Carmichael *et al.* en 1988. Actualmente se conocen más de 8 tipos de nodularinas, clasificadas de acuerdo con las variaciones en su grado de metilación, composición e isomerización de sus aminoácidos. Se ha demostrado que varias de las microcistinas y nodularinas son potentes inhibidores de las fosfatasa tipo 1 y 2A, las cuales están implicadas en muchos procesos celulares como la división celular, la síntesis de proteínas, la señalización celular, la contracción muscular y el transporte de calcio, entre otros (Wera y Hemming, 1995), además de que estas toxinas han resultado ser potentes promotores de tumores hepáticos (Roset *et al.*, 2001).

La producción de microcistina se ha reportado en los 3 órdenes de cianobacterias y de éstos se han identificado diferentes géneros como *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* y *Anabaenopsis* como productoras de esta toxina. Las microcistinas (Fig. 1) son heptapéptidos que comparten una estructura cíclica (-Adda-D-Glu-Mdha-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z), en donde X y Z representan variables de L-aminoácidos, Adda representa 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-ácido decadienoico, D-MeAsp representa 3-ácido metilaspártico y Mdha representa N-metilhidehidroalanina. Se han reportado más de 71 isoformas, esta variación puede darse entre cepas del mismo o diferente género (Pineda, 2009; Christiansen *et al.*, 2003).

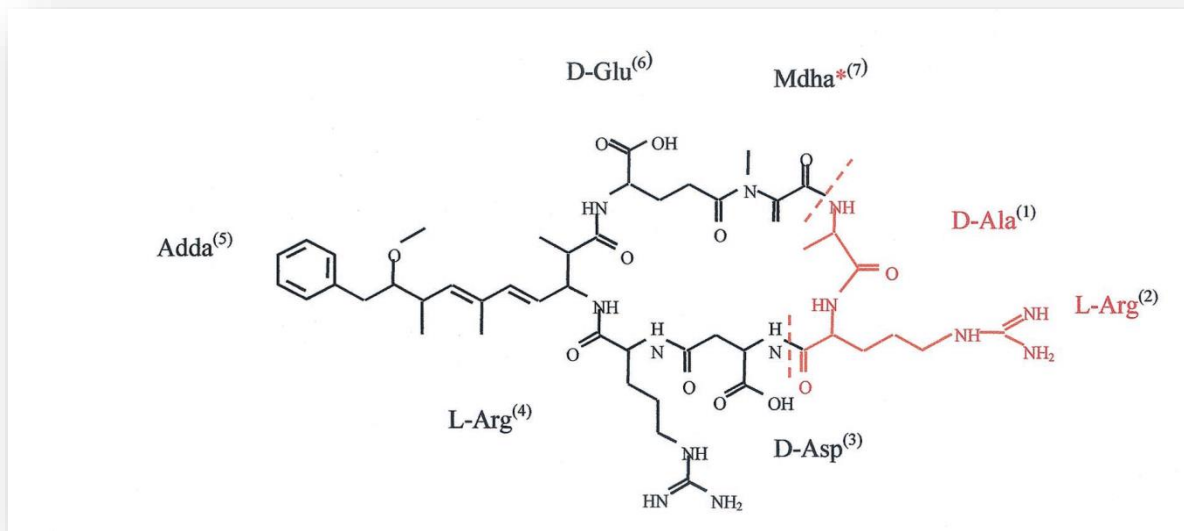


Fig. 1. Estructura química de la Microcistina-LR. (Christiansen *et al.*, 2003).

El grupo de genes microcistina sintetasa (*mcy*) de la cianobacteria tóxica contiene la información para la síntesis de las péptido sintetetas, poliketidos sintetetas y enzimas de adaptación que son codificadas por diez genes en *Microcystis* y *Anabaena*, o por nueve en *Planktothrix* y *Nodularia* (Kurmayer y Christensen, 2009).

En estudios como el realizado por Hisbergues *et al.* en 2003, basándose en la información codificada por esos genes diseñaron un par de oligonucleótidos que amplificara por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una región del gen *mcyA*, y con ello pudieron identificar géneros productores de microcistinas como *Anabaena*, *Microcystis* y *Planktothrix* de diferentes cuerpos de agua y de monocultivos.

En cultivos de diferentes especies de *Microcystis* aisladas de cuerpos de agua europeos Via-Ordorika *et al.*, en 2004, estudiaron la relación de la presencia del gen *mcy* con la presencia de microcistina, amplificando una región de los genes *mcyA* y *mcyB* por medio de la PCR en cultivos individuales, resultando que casi el 100 % de los cultivos fue positivo para la presencia del gen, en los cuales más de un 75% de las colonias de *M. aeruginosa* y *M. botrys* contenían genes *mcy* y menos del 20% de *M. ichthyoblabe* y *M. viridis* obtuvieron productos de los genes *mcy*; ninguna de las colonias de *M. wesenbergii* presentó productos de los genes *mcy*.

Arzate en el 2008 obtuvo aislados clonales de *Microcystis* sp., con los cuales realizó bioensayos de toxicidad aguda en cladóceros para confirmar que la mortalidad observada fue debida a microcistinas, la caracterización de los aislados se realizó mediante la amplificación de tres regiones genéticas diferentes: un fragmento del operón de la ficocianina; una región del gen 16S rRNA específica para *Microcystis* y un fragmento del gen *mcyA*, con la finalidad de comprobar si los genes se expresan o no en condiciones de cultivo.

Lozano en el 2009 utilizó una técnica de amplificación por la PCR para la determinación de cianobacterias potencialmente productoras de hepatotoxinas, en muestras obtenidas de la laguna de Zumpango, lago de Xochimilco, embalse de Valle de Bravo y un monocultivo de *Anabaena* sp., amplificando el dominio aminotransferasa (AMT) localizado en el módulo *mcyE* del complejo enzimático microcistina sintetasa. Mediante ésta técnica molecular aplicada a muestras ambientales obtuvo un amplificado de 472 pares de bases (pb) correspondientes al dominio AMT en las muestras de la laguna de Zumpango y del embalse de Valle de Bravo.

Pineda en el 2009 logró aislar y caracterizar mediante bioensayos, técnicas moleculares y bioquímicas, 18 cepas de cianobacterias filamentosas productoras de microcistinas de muestras provenientes de la primera sección del lago de Chapultepec, la Alameda Oriente y la pista olímpica de remo y canotaje “Virgilio Uribe”, tres de los lagos urbanos ubicados en la Ciudad de México. De las cepas aisladas mediante la amplificación de la región *mcyA*-Cd, determinó que 16 tienen la capacidad de sintetizar microcistinas, de las cuales comprobó su producción en 7 cepas por LC/ESI/MS (Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry) y en 8 por la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Debido a los cada vez más frecuentes florecimientos de cianobacterias en los cuerpos de agua, es importante establecer un monitoreo permanente de los diferentes organismos que conforman los florecimientos, ya que muchas de las especies que participan pueden ser tóxicas, y como resultado, aumentar el nivel de microcistinas en el agua, por lo que tanto el consumo de ésta como el contacto puede ser dañino para la salud humana y de otros organismos. La mayoría de los trabajos sobre identificación de cianobacterias se han realizado con base en su caracterización morfológica, con ayuda de técnicas de microscopía, pero esto no asegura la confiabilidad de la identificación de organismos tóxicos, además de que estas técnicas suelen ser lentas y laboriosas. Con relación a lo anterior, se vienen utilizando con mayor frecuencia las técnicas moleculares para la identificación de organismos potencialmente tóxicos, ya que esto asegura la presencia del material genético en las cepas productoras, además de tener ventajas con respecto a la identificación por microscopía ya que son rápidas y específicas.

Objetivos

Objetivo general

Estandarizar una técnica molecular por medio de la amplificación del ADN por la PCR para identificar la presencia del gen *mcyE* del dominio AMT, que codifica la producción de microcistina, en monocultivos de cepas aisladas de diferentes cuerpos de agua y en muestras ambientales de cianobacterias potencialmente tóxicas del embalse Valle de Bravo.

Objetivos particulares

1. Obtener monocultivos de cianobacterias potencialmente tóxicas aisladas de diferentes cuerpos de agua.
2. Aplicar la prueba de amplificación del ADN por la PCR a cianobacterias en monocultivos, y a las que están presentes en muestras ambientales provenientes del embalse de Valle de Bravo.
3. Comprobar por medio de la prueba de ELISA la presencia de microcistina en monocultivos y en muestras ambientales de los diferentes cuerpos de agua.
4. Integrar la información medioambiental de los años 2010 al 2012 para un análisis de correlación con los resultados de la prueba de PCR.

Material y métodos

Obtención de muestras de diferentes cuerpos de agua

Se utilizaron muestras ambientales de cuatro estaciones del embalse Valle de Bravo (19°21'30"N, 100°11'00"W), localizado en el Estado de México, las cuales fueron denominadas como Tizates, Amanalco, Cortina y Centro (Fig. 2). Las muestras corresponden a tres periodos: el primero abarcó desde el mes de febrero hasta noviembre del año 2010, el segundo de abril a noviembre de 2011 y el tercero de agosto a noviembre de 2012. Estas muestras fueron proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA), todas las muestras se conservaron en congelación hasta el momento de su análisis. Se trabajó también con un monocultivo de *Microcystis aeruginosa* que se logró aislar del mismo embalse y el cual sirvió como un control positivo para la caracterización molecular por PCR.



Fig. 2. Mapa del área de estudio, embalse de Valle de Bravo y las estaciones de muestreo (Google maps, 2012). Imagen modificada por el autor.

Además se analizaron monocultivos de *Planktothrix agardhii* y *Anabaenopsis* sp., especies aisladas de muestreos en el lago de Texcoco (material proporcionado por César Zamora, Laboratorio de Zoología Acuática, UNAM-FES Iztacala-Unidad de Morfología y Función).

Aislamiento de cianobacterias

Se inoculó una alícuota de 3 mL de muestra fresca, tanto del embalse Valle de Bravo como del lago de Texcoco, en tubos de ensayo con 10 mL de medio mineral Z8 adicionados con un antibiótico (cicloheximida, $50 \mu\text{g L}^{-1}$), y fueron incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Posteriormente se llevó a cabo el aislamiento con la técnica de micro-manipulación con ayuda de una micropipeta capilar bajo microscopio estereoscópico

(Arzate, 2008) obteniendo así sólo el organismo de interés para transferirlo a otro tubo con el mismo medio de cultivo.

Los tubos con crecimiento fueron revisados periódicamente bajo microscopia para asegurarse que únicamente creciera el organismo inoculado.

Crecimiento de monocultivos

Una vez asegurado el monocultivo se inoculó una alícuota de 1 mL de los tubos con crecimiento en un matraz con 25 mL de medio mineral Z8; los matraces se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y se mantuvieron en agitación constante sobre un agitador (marca Labnet Orbit 1900) a 70 rpm.

El monocultivo de la cepa de *M. aeruginosa* fue el más exitoso, por lo tanto fue con el que se trabajó para la estandarización de la técnica de PCR.

Lisis celular

Las muestras almacenadas se descongelaron a temperatura ambiente y posteriormente, tanto de estas muestras como de los monocultivos frescos, se tomó una alícuota de 1.5 mL para ser transferidas a tubos Eppendorf. Se realizó un centrifugado a 13,000 rpm durante 45 min y se desechó el sobrenadante, la pastilla obtenida (entre 30 y 40 mg) fue resuspendida en 50 μL de buffer TE (Tris 10mM-EDTA 1mM; pH 8) y 750 μL de buffer XS (potasio etil xantogenato) (Tillet y Neilan, 2000); posteriormente se incubaron las muestras por 2 horas a $70 \pm 5^\circ\text{C}$. Durante el periodo de incubación se realizó una agitación con vórtex durante 10 s cada 30 min; pasado este tiempo las muestras fueron colocadas en hielo triturado durante 30 min; después de éste tiempo se realizó un centrifugado a 13,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo.

Extracción de ADN

Al sobrenadante recuperado se le adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) para su posterior centrifugado a 13,000 rpm durante 3 min; el sobrenadante fue recuperado en un tubo nuevo y se le agregó nuevamente fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), este paso se repitió de 2 a 4 veces hasta obtener un sobrenadante transparente; una vez obtenido, se le adicionó un volumen igual al recuperado (800 μL aproximadamente) de isopropanol y una décima parte de acetato de amonio 4M (80 μL aproximadamente). Las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C ; transcurrido ese tiempo, fueron centrifugadas nuevamente a 13,000 rpm durante 12 min; el sobrenadante fue eliminado y la pastilla obtenida fue lavada con etanol al 70%, posteriormente se centrifugó una vez más a 13,000 rpm durante 12 min y se dejó evaporar

el etanol a temperatura ambiente, finalmente se resuspendió la pastilla en 50 μ L de buffer TE pH 8.5. El ADN se conservó en congelación en tubos Eppendorf hasta el momento del análisis (modificado de Lozano, 2009).

Caracterización molecular

Amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN obtenido fue sometido a un análisis molecular por medio de PCR múltiple con ayuda de 3 diferentes pares de oligonucleótidos (Tabla 1); HEPF/HEPR que limitan una secuencia específica del gen *mcyE*-AMT, cuya presencia en las muestras indica que son cepas potencialmente tóxicas; PCBF/PCAR que amplifica un fragmento del operón de la ficocianina, pues sólo las cianobacterias son capaces de sintetizar éste pigmento; y Micr184f/Micr431r que amplifica para una región del rRNA 16S específica para el género *Microcystis*, para corroborar que ese género está presente en las muestras ambientales (Arzate, 2008).

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)
HEPF	tttgggggttaacttttttgggcatagtc	470
HEPR	aattcttgaggctgtaaatacgggttt	
PCBF	ggctgcttgtttacgcgaca	663
PCAR	ccagtaccaccagcaactaa	
Micr184f	gccgcaggtgaaamctaa	230
Micr431r	aatccaaaaccttcctccc	

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para PCR múltiple.

Para las condiciones finales de la reacción de la PCR se agregaron los pares de oligonucleótidos HEPF/HEPR (0.3 μ M), PCBF/PCAR (0.3 μ M) y Micr184f/Micr431r (0.6 μ M); regulador (2X); dNTPs (0.2 mM c/u); y 0.3 μ L de enzima Herculase II fusion DNA polymesase, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (www.aligent.com) adecuando la cantidad de enzima al volumen total de la reacción y; 1.0 μ L del molde de DNA, toda la mezcla en un volumen final de 25 μ L aforado con dH₂O.

Condiciones de reacción de PCR

Etapas	Condiciones	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C por 2 minutos	1
Desnaturalización	95°C por 30 segundos	35
Hibridación	60°C por 30 segundos	35
Extensión	72°C por 40 segundos	35
Extensión final	72°C por 5 minutos	1

Tabla 2. Condiciones empleadas para la reacción de PCR.

Electroforesis

Después de la amplificación por la PCR los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, a 80 V durante 45 minutos aproximadamente; posteriormente las bandas fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio y se obtuvo una imagen en un fotodocumentador.

ELISA (Enzyme Link Immunosorbent Assay)

Para comprobar que las cepas potencialmente tóxicas expresan las proteínas que codifica el gen *mcyE*, se realizó una prueba de ELISA tanto en las muestras ambientales como en los monocultivos, utilizando un kit comercial para cuantificación en placa de microcistina (EnviroLogix™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Análisis de correlación canónica

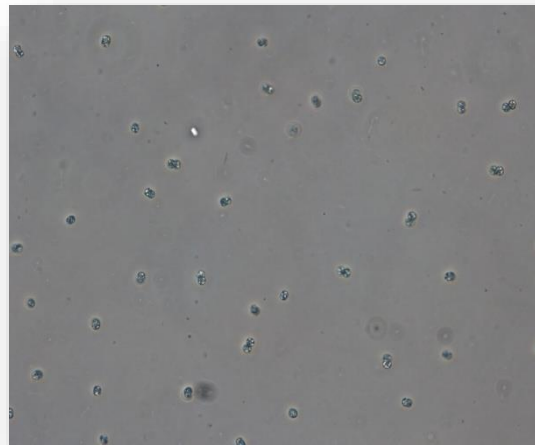
Para este análisis se tomaron en cuenta principalmente los datos de abundancia de las especies con potencialidad tóxica (transformada a biovolumen), así como de algunos parámetros ambientales tales como profundidad de la estación, transparencia del disco de Secchi, temperatura del agua, conductividad a 25°C, pH, oxígeno disuelto, y datos de

parámetros fisicoquímicos como niveles de nutrientes, fósforo reactivo soluble (FRS), nitrógeno inorgánico disuelto (suma de nitrógeno amoniacal, nitritos y nitratos, abreviado como NID), nitrógeno orgánico soluble, y los niveles de clorofila-a, contra los resultados obtenidos de la caracterización molecular, representada por la presencia del gen característico del género *Microcystis* (MIC), la presencia del gen *mcyE* (ambos resultados obtenidos por la PCR) y los datos de concentración de microcistina por la prueba de ELISA. Con esta información se realizó un análisis de correlación canónica de las diferentes muestras ambientales del embalse Valle de Bravo, introduciendo los datos obtenidos al software Canoco for Windows 4.5

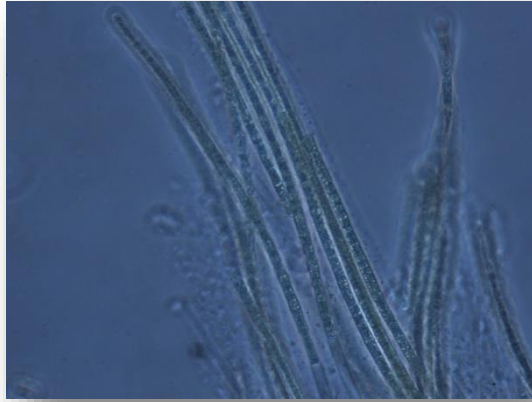
Resultados

Obtención de monocultivos

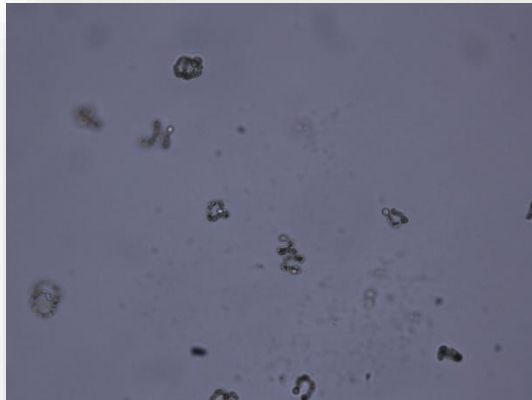
Se lograron aislar satisfactoriamente 3 organismos y se mantuvieron en monocultivos: *M. aeruginosa* (Imagen 1) proveniente del embalse Valle de Bravo, y *Planktothrix agardhii* (Imagen 2) y *Anabaenopsis* sp. (Imagen 3) provenientes del Lago de Texcoco.



**Imagen 1. Monocultivo de *Microcystis aeruginosa* aislado del embalse Valle de Bravo.
Fotografía tomada por el autor.**



**Imagen 2. Monocultivo de *Planktothrix agardhii* aislado del lago de Texcoco.
Fotografía tomada por el autor.**



**Imagen 3. Monocultivo de *Anabaenopsis* sp. aislado del lago de Texcoco.
Fotografía tomada por el autor.**

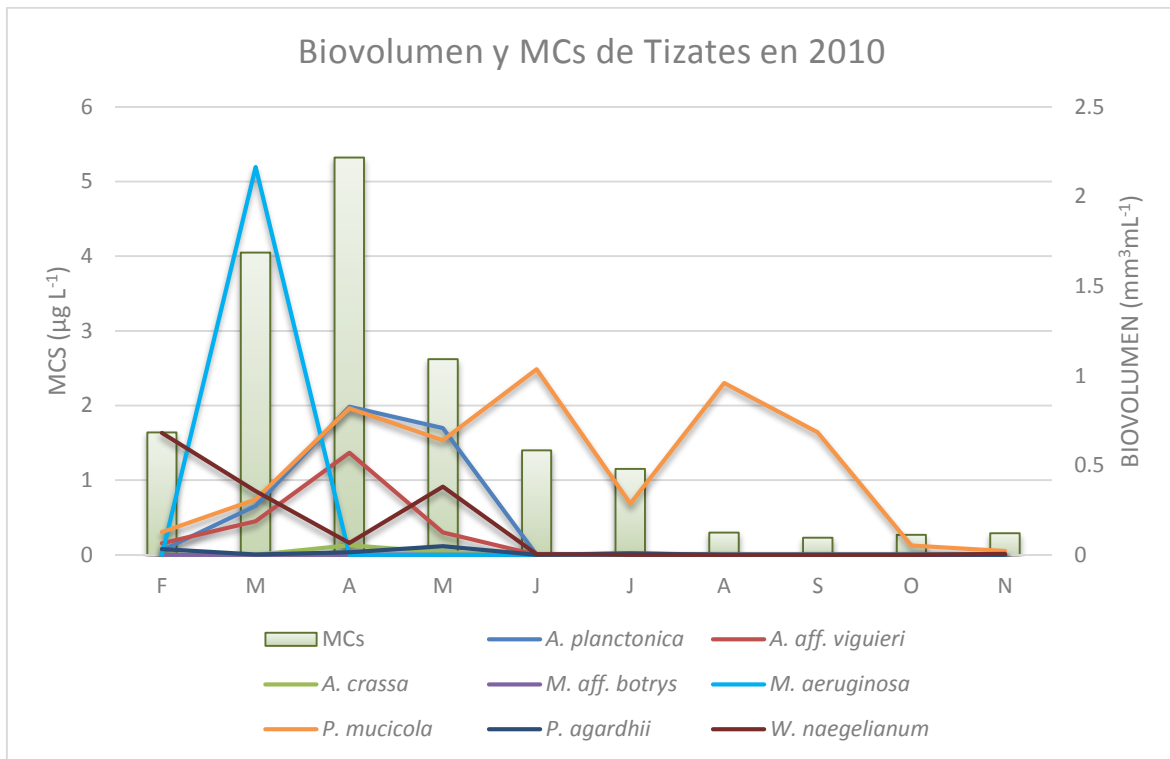
De acuerdo a la identificación por la técnica de microscopía y utilizando claves taxonómicas, la diversidad de cianobacterias encontrada en el embalse Valle de Bravo para los tres años de estudio (sólo se mencionan las cianobacterias potencialmente tóxicas) se muestra en la tabla 3:

2010	2011	2012
<i>Anabaena aff. viguieri</i>	<i>Anabaena aff. spiroides</i>	<i>Anabaena planctonica</i>
<i>Anabaena crassa</i>	<i>Anabaena crassa</i>	<i>Planktothrix agardhii</i>
<i>Anabaena planctonica</i>	<i>Anabaena planctonica</i>	<i>Pseudanabaena mucicola</i>
<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Anabaena aff. viguieri</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<i>Microcystis aff. Botrys</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Woronichinia naegelianum</i>
<i>Planktothryx agardhii</i>	<i>Microcystis aff. botrys</i>	
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	<i>Planktothryx agardhii</i>	
<i>Woronichinia naegelianum</i>	<i>Pseudoanabaena mucicola</i>	
	<i>Woronichinia naegelianum</i>	
* <i>Anabaena</i> - Microcistina y Cilindrospermopsina (Hepatotóxicas), Anatoxina-a, Anatoxina-a(s) y Saxitoxinas (Neurotóxicas). <i>Microcystis</i> - Microcistina. <i>Planktothryx</i> - Microcistina y Saxitoxina. <i>Pseudanabaena</i> - Microcistina. <i>Woronichinia</i> - Microcistina.		

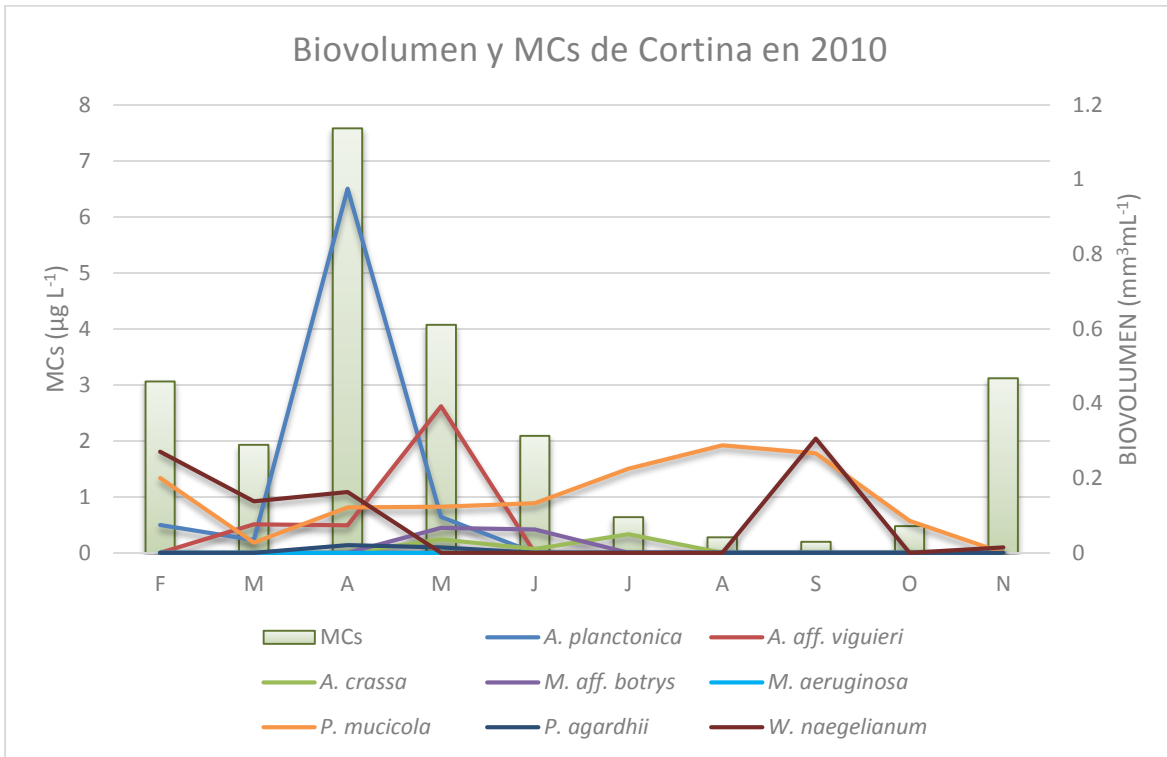
Tabla 3. Diversidad de cianobacterias potencialmente tóxicas identificadas en el embalse Valle de Bravo, en los años 2010, 2011 y 2012.

Debido a la diferencia de tallas de los organismos identificados, lo cual no corresponde entre ellos a su biomasa, se consideró transformar la abundancia de especies a biovolumen ($\text{mm}^3 \text{mL}^{-1}$).

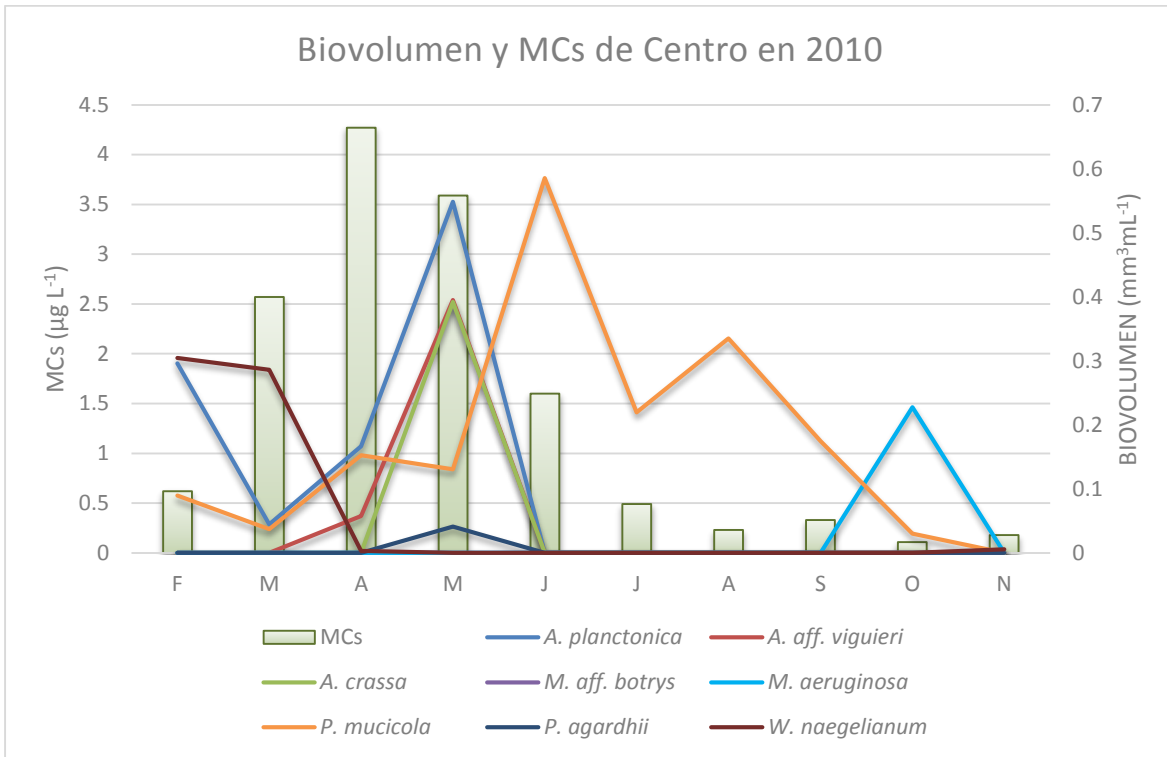
En el año 2010 particularmente en la estación de Tizates, *P. mucicola* fue la especie que aportó el mayor porcentaje en cuanto a biovolumen total, seguida por *M. aeruginosa*, aunque esta última sólo se presentó en el mes de marzo; en la estación Cortina, *P. mucicola* continuó aportando la mayor parte del biovolumen, seguida de *A. planctónica*, cabe mencionar que en esta estación *M. aeruginosa* no se presentó en ninguno de los meses. En la estación Centro, *P. mucicola* y *A. planctonica* continúan como las especies que aportan el mayor biovolumen en la estación, *M. aeruginosa* sólo se presentó en el mes de octubre, como se muestran en las gráficas 1, 2 y 3.



Gráfica 1. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina de Tizates, 2010.

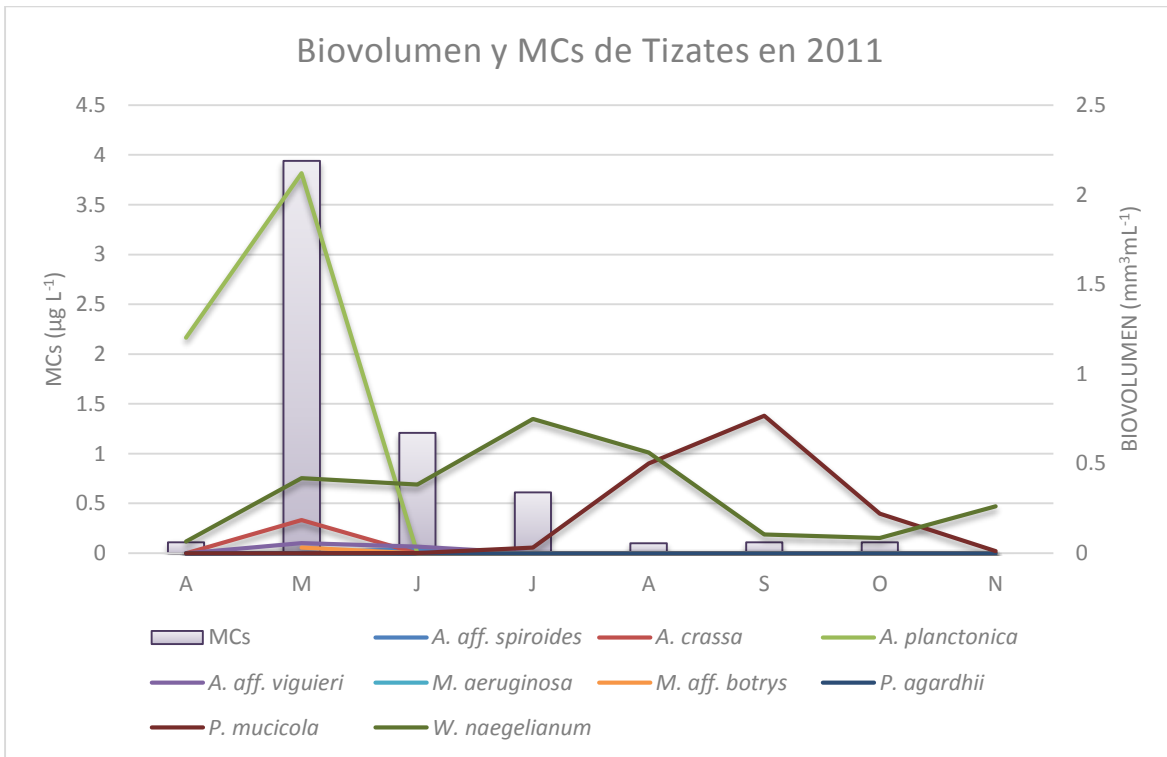


Gráfica 2. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Cortina, 2010.

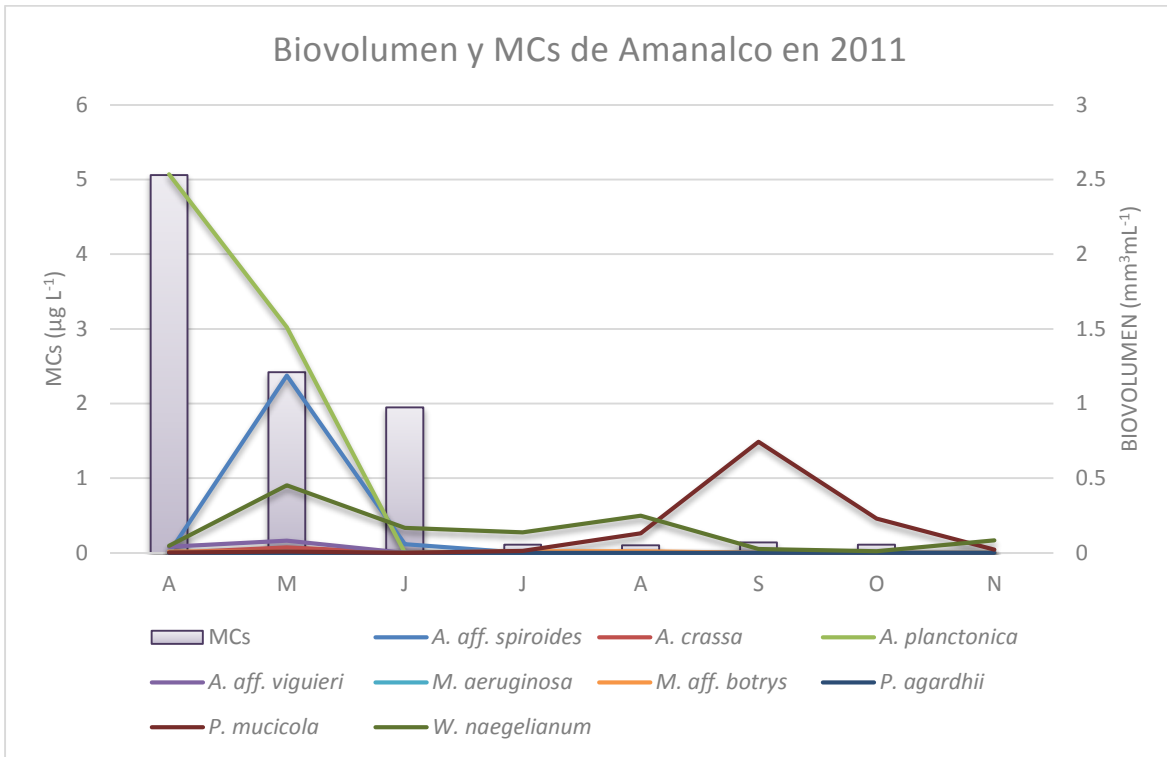


Gráfica 3. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Centro, 2010.

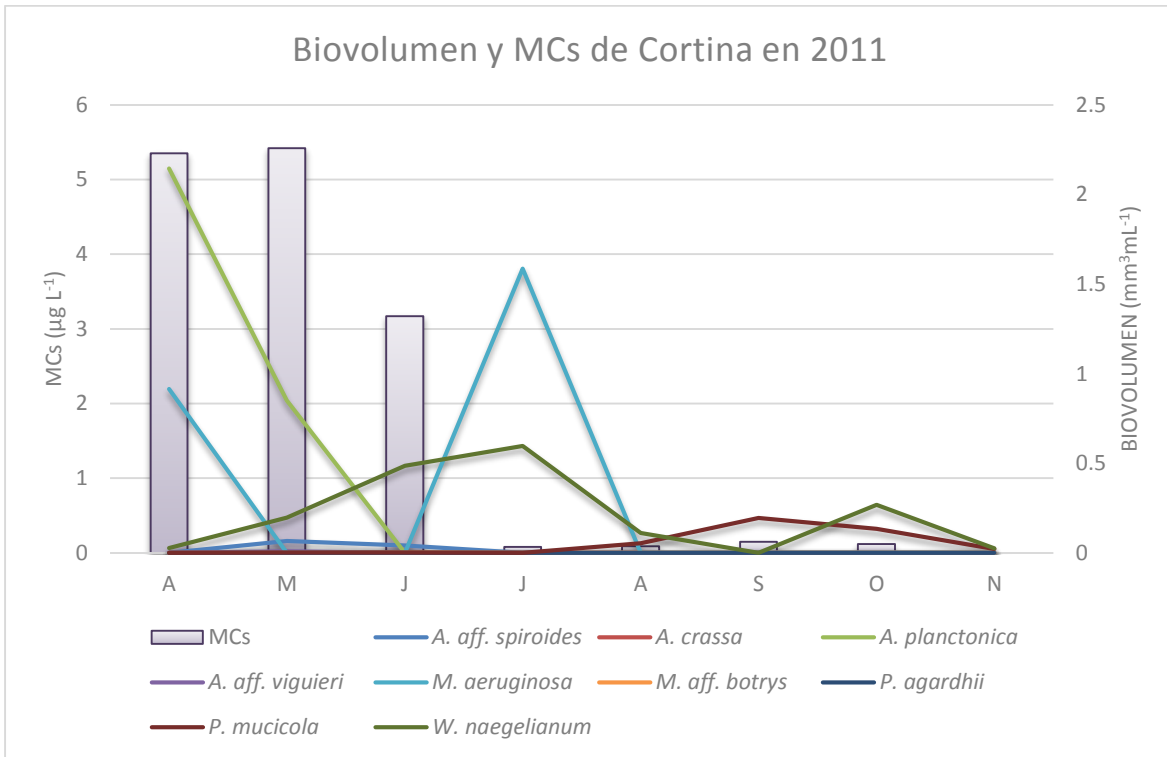
De la gráfica 4 a la 7 se observa que para el año 2011, *A. planctonica* toma el primer lugar como la especie con mayor aporte de biovolumen en todas las estaciones de muestreo; en ése año *M. aeruginosa* se presentó en Cortina y Centro, aunque sólo apareció en los meses de abril y julio, esta es la especie que cuando está presente, aporta más biovolumen después de *A. planctonica*.



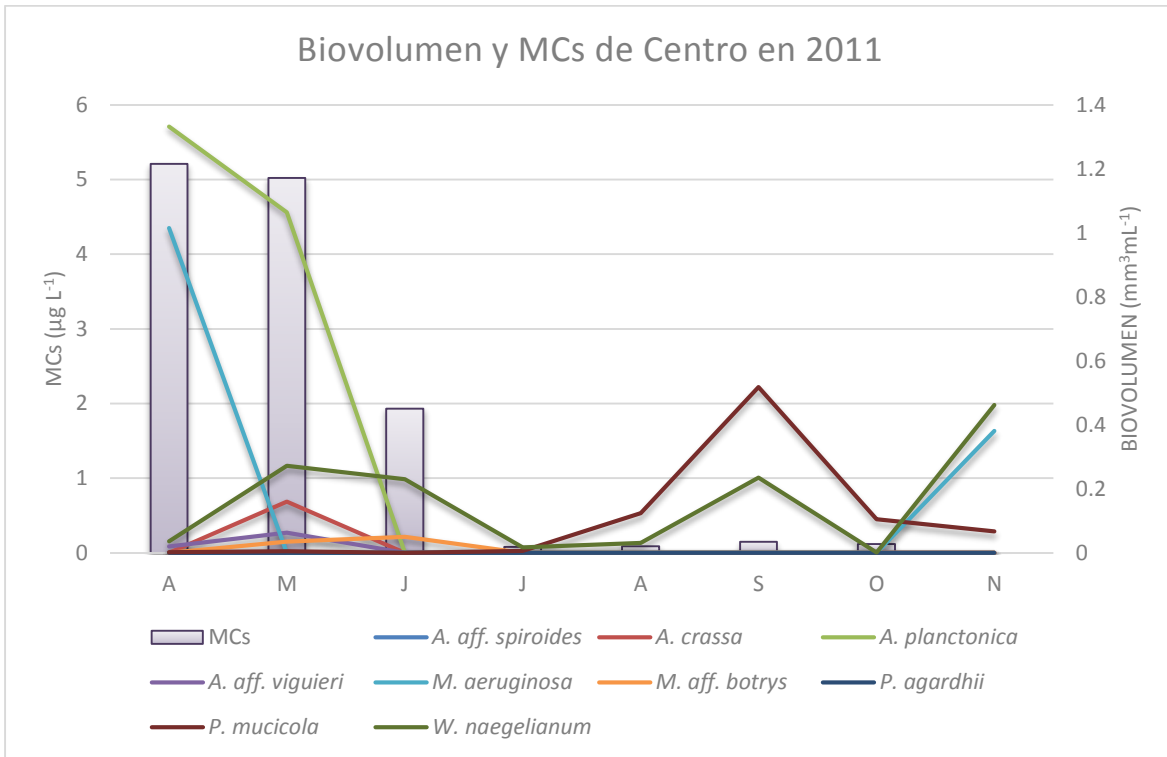
Gráfica 4. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Tizates, 2011.



Gráfica 5. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Amanalco, 2011.

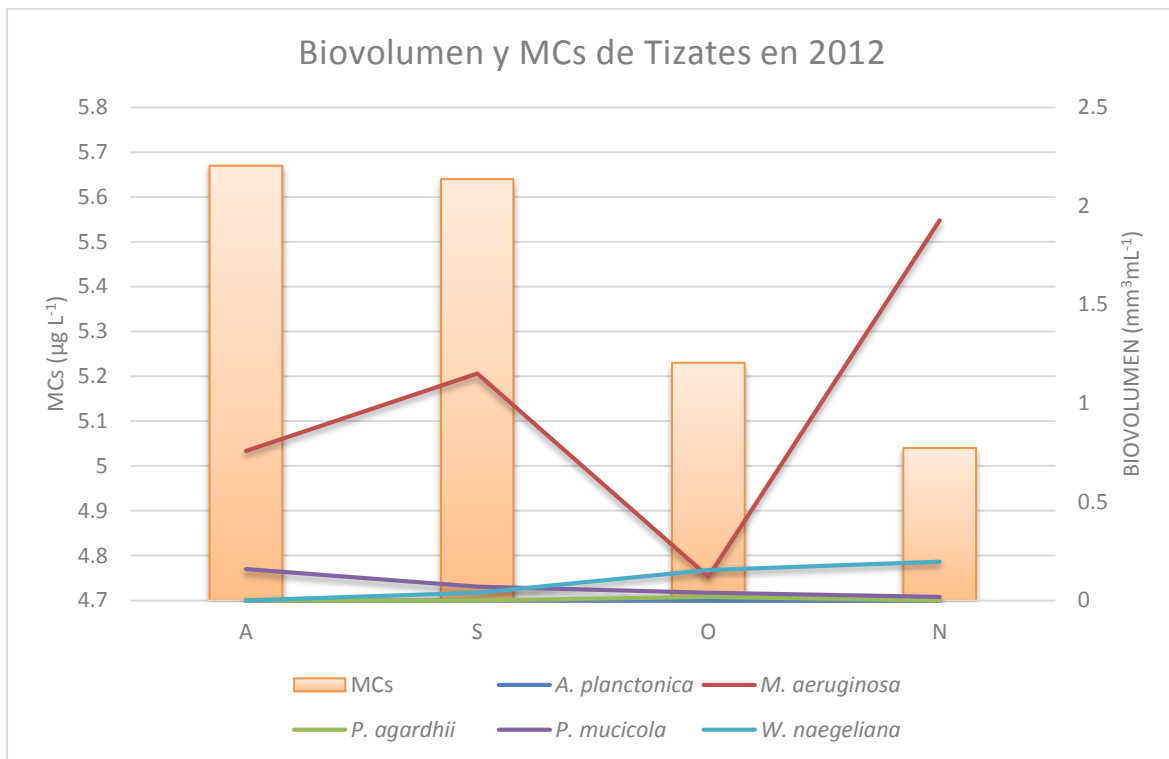


Gráfica 6. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Cortina, 2011.

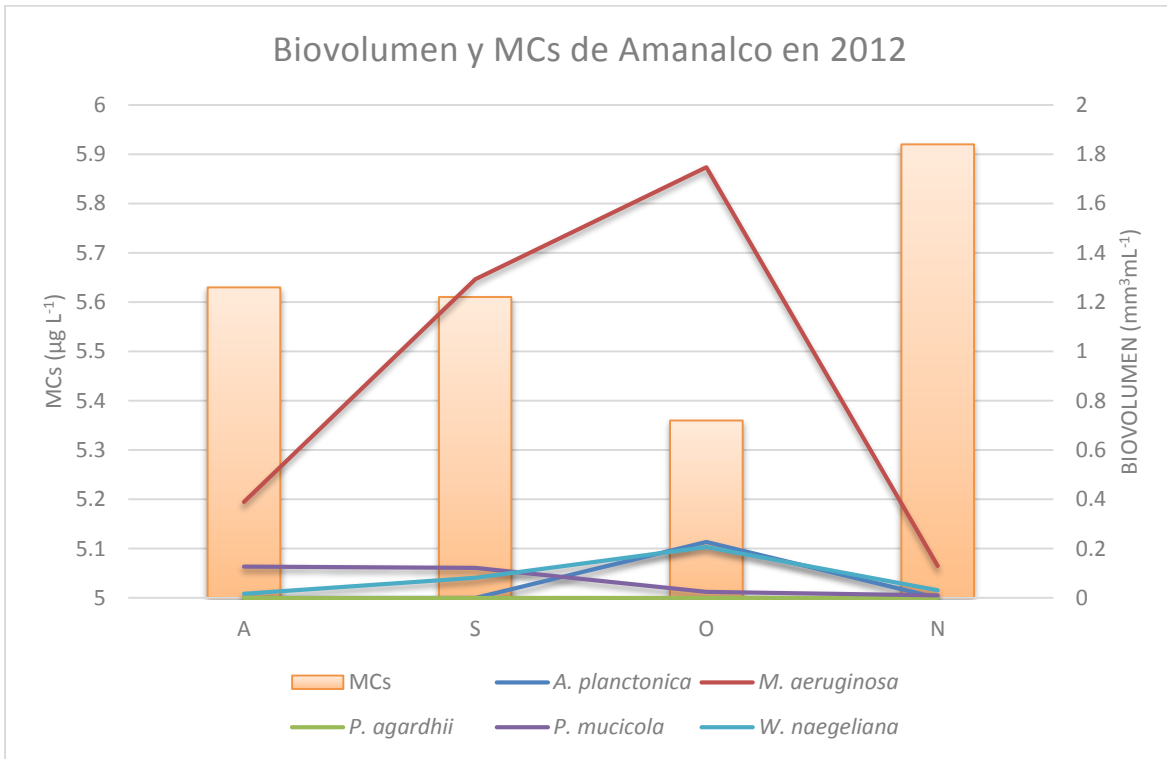


Gráfica 7. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Centro, 2011.

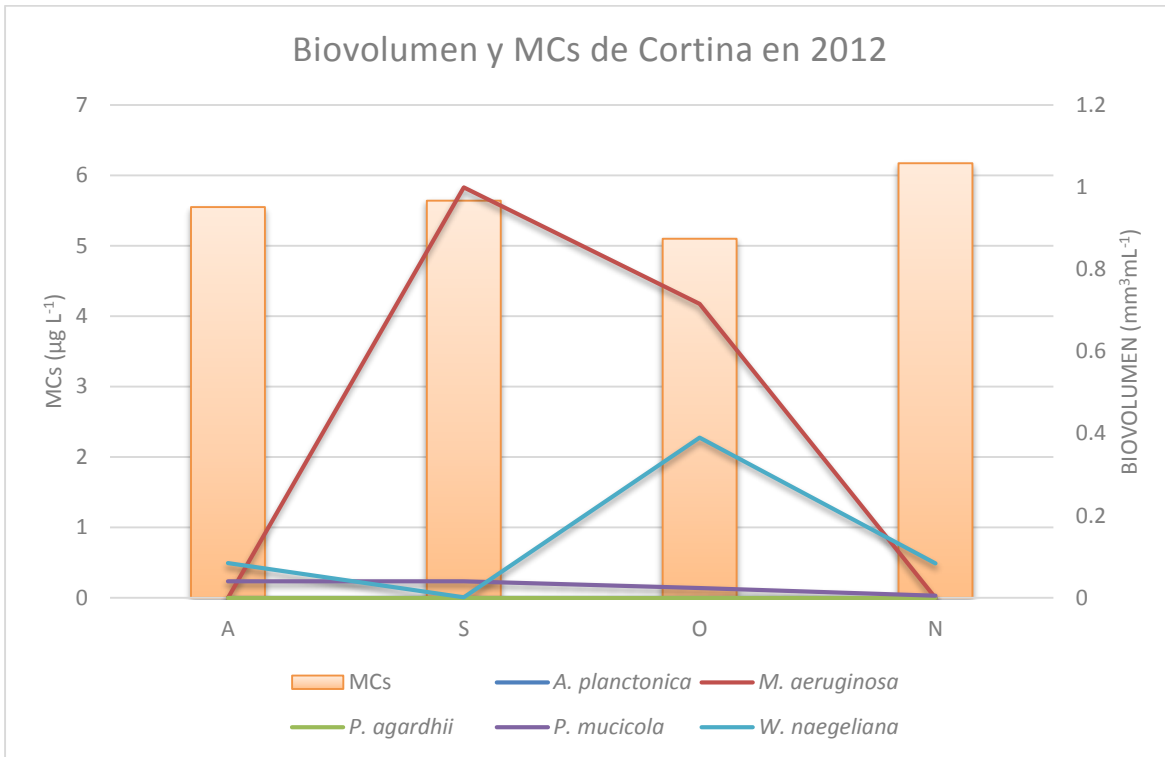
Para el año 2012 *M. aeruginosa* fue la especie que aportó más biovolumen en las estaciones Tizates, Amanalco y Cortina, como se observa en las gráficas 8, 9 y 10.



Gráfica 8. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Tizates, 2012.



Gráfica 9. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Amanalco, 2012.



Gráfica 10. Biovolumen de los diferentes organismos y niveles de microcistina en Cortina 2012.

Aunque *Microcystis wesenbergii* fue una especie que estuvo presente en todas las estaciones de muestreo durante los tres años de estudio, no se le consideró para este trabajo ya que ésta no ha sido reportada como potencialmente tóxica (Vasconcelos *et al.*, 2010)

Caracterización molecular

Para la caracterización molecular por la PCR se utilizó como control positivo una cepa de *M. aeruginosa* aislada del embalse Valle de Bravo, en donde se pudo amplificar exitosamente una región rRNA 16S específica para el género *Microcystis* de 230 pb y una secuencia específica del gen *mcyE*-AMT de 470 pb, así como un fragmento del operón de la ficocianina de 663 pb (Imagen 4). Los monocultivos de *Anabaenopsis* sp. y *P. agardhii* dieron resultados positivos, aunque con una banda muy tenue para el amplificado del gen *mcyE*-AMT de 470 pb, mientras que la cepa de *Anabaenopsis* sp amplificó para el fragmento del operón de la ficocianina de 663 pb.

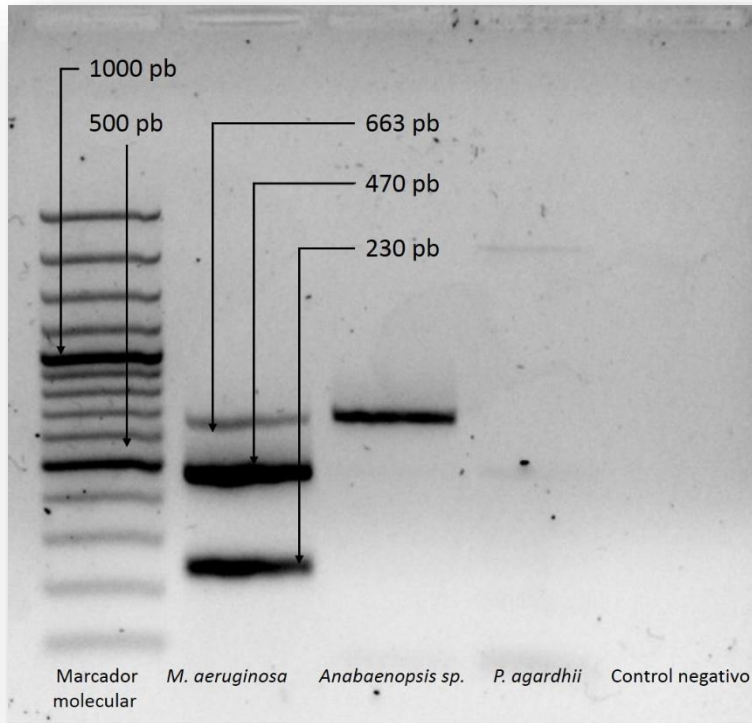


Imagen 4. Gel de agarosa al 1.2% teñida con bromuro de etidio en donde se presenta la amplificación de los productos de la secuencia de la región rRNA 16S específica para el género *Microcystis* (230 pb), del gen *mcyE*-AMT (470 pb) y de un fragmento del operón de la ficocianina (663 pb) de los monocultivos de *M. aeruginosa*, *Anabaenopsis sp.* y *P. agardhii*.

Los resultados de la prueba de ELISA para determinar equivalentes de microcistina en los monocultivos fueron de $4.46 \mu\text{g L}^{-1}$ para *M. aeruginosa*, $0.24 \mu\text{g L}^{-1}$ para *Anabaenopsis sp.* y para *P. agardhii* de $0.07 \mu\text{g L}^{-1}$. Cabe mencionar que *M. aeruginosa* fue el primer monocultivo exitoso, seguido de *Anabaenopsis sp.* y de *P. agardhii*. La prueba de ELISA se realizó en cultivos de aproximadamente 3 semanas de crecimiento.

En la tabla 4 se observan los resultados de las pruebas de ELISA y de las PCR de las muestras ambientales del año 2010. Durante todo el periodo de muestreo el embalse Valle de Bravo tuvo presencia de microcistinas, con concentraciones que van de $0.11 \mu\text{g L}^{-1}$ hasta $7.58 \mu\text{g L}^{-1}$. Se observa que durante el periodo de marzo, abril y mayo los valores de microcistinas son los más altos. En cuanto a la amplificación por la PCR, tanto de la región específica para el género *Microcystis* como de la región del gen *mcyE* se obtuvieron resultados positivos en todas las estaciones del área de estudio, aunque con mayor presencia en las estaciones de Tizates y Centro.

Para el año 2011 la microcistina también estuvo presente en todas las estaciones y en los meses de abril a octubre. Como se muestra en la tabla 5, los valores de microcistina alcanzaron un mínimo de 0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$ y un máximo de 5.42 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como en el año 2010 abril y mayo fueron los meses con mayor concentración de toxina. En cuanto a la amplificación por la PCR, la estación Tizates fue la única en donde se obtuvieron resultados positivos para la amplificación tanto de la región específica para el género *Microcystis* como de la región de gen *mcyE* en todo el periodo de muestreo; en las demás estaciones hubo variaciones mensuales de estos resultados.

En el año 2012 se obtuvieron los valores más altos de microcistina, con un promedio de 5.39 $\mu\text{g L}^{-1}$ en Tizates, 5.63 $\mu\text{g L}^{-1}$ en Amanalco y 5.61 $\mu\text{g L}^{-1}$ en Cortina, además de que estuvo presente en todas las estaciones; la amplificación de la región específica para el género *Microcystis* dio resultados positivos para todas las estaciones durante todo el periodo de muestreo y la amplificación para la región del gen *mcyE* sólo dio positivo en los meses de agosto y noviembre en la estación Amanalco, como se observa en la tabla 6.

		FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV
TIZATES	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.64	4.05	5.32	2.62	1.40	1.15	0.30	0.23	0.27	0.29
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>mcyE</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CORTINA	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3.06	1.93	7.58	4.07	2.09	0.64	0.28	0.20	0.48	3.12
	<i>Microcystis</i> sp	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	<i>mcyE</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
CENTRO	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.62	2.57	4.27	3.59	1.60	0.49	0.23	0.33	0.11	0.18
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>mcyE</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Tabla 4. Caracterización molecular de muestras ambientales del embalse Valle de Bravo del año 2010

		ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV
TIZATES	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.11	3.94	1.21	0.61	0.10	0.11	0.11	0
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>mcyE</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
AMANALCO	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.06	2.42	1.95	0.11	0.10	0.14	0.11	0
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>mcyE</i>	+	+	+	-	-	-	+	-
CORTINA	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.35	5.42	3.17	0.08	0.09	0.15	0.12	0
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>mcyE</i>	+	-	+	-	+	+	+	-
CENTRO	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.21	5.02	1.93	0.08	0.09	0.15	0.12	0
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+	-	+	+	-
	<i>mcyE</i>	+	+	+	+	-	+	+	-

Tabla 5. Caracterización molecular de muestras ambientales del embalse Valle de Bravo del año 2011.

		AGO	SEP	OCT	NOV
TIZATES	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.67	5.64	5.23	5.04
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+
	<i>mcyE</i>	-	-	-	-
AMANALCO	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.63	5.61	5.36	5.92
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+
	<i>mcyE</i>	+	-	+	+
CORTINA	MCs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.55	5.64	5.10	6.17
	<i>Microcystis</i> sp	+	+	+	+
	<i>mcyE</i>	-	-	-	-

Tabla 6. Caracterización molecular de muestras ambientales del embalse Valle de Bravo del año 2012.

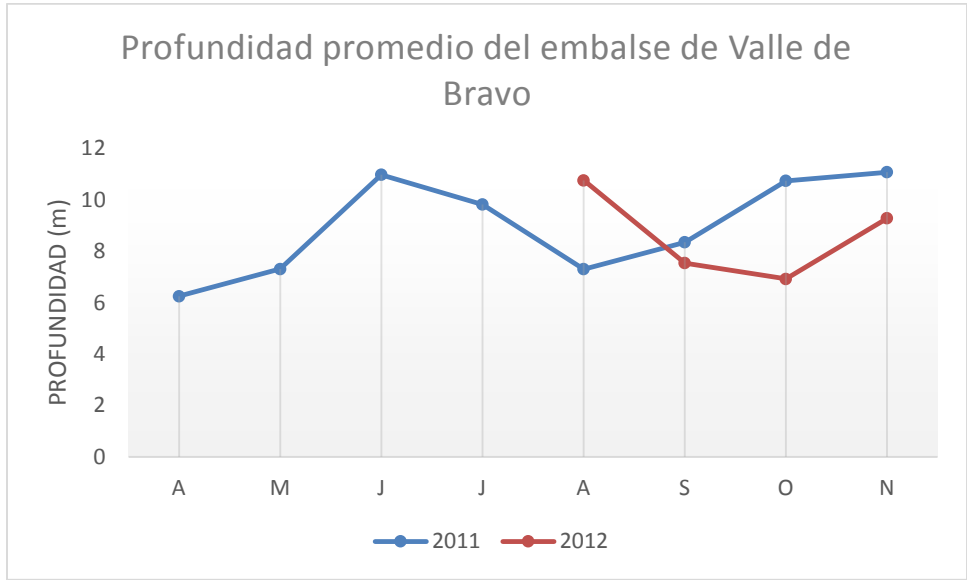
Se tomaron en cuenta promedios de los parámetros ambientales, fisicoquímicos y biológicos de los distintos puntos de muestreo, los cuales fueron correlacionados con la caracterización molecular y la diversidad específica de cada año en particular. Las variables fisicoquímicas que fueron consideradas se muestran en la tabla 7.

2010	2011	2012
ND	Profundidad de la estación (Z)	Profundidad de la estación (Z)
Transparencia Disco Secchi (Z_{DS})	Transparencia Disco Secchi (Z _{DS})	Transparencia Disco Secchi (Z _{DS})
Temperatura Agua(°C)	Temperatura Agua (°C)	Temperatura Agua (°C)
Conductividad a 25°C (K₂₅)	Conductividad a 25°C (K ₂₅)	Conductividad a 25°C (K ₂₅)
pH	pH	pH
Oxígeno Disuelto (OD)	Oxígeno Disuelto (OD)	Oxígeno Disuelto (OD)
Fósforo reactivo soluble (FRS)	Fósforo reactivo soluble (FRS)	Fósforo reactivo soluble (FRS)
Nitrógeno inorgánico disuelto (NID)	Nitrógeno inorgánico disuelto (NID)	Nitrógeno inorgánico disuelto (NID)
Nitrógeno orgánico soluble (NOS)	ND	ND
Clorofila Fracción > 20 µm (Chl-a)	Clorofila Fracción > 20 µm (Chl-a)	Clorofila Fracción > 20 µm (Chl-a)
ELISA (MCs)	ELISA (MCs)	ELISA (MCs)
<i>Microcystis</i> (MIC)	<i>Microcystis</i> (MIC)	<i>Microcystis</i> (MIC)
<i>mcyE</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyE</i>
*ND - No Determinado		

Tabla 7. Distintos factores tomados en cuenta para en análisis de correspondencia canónica.

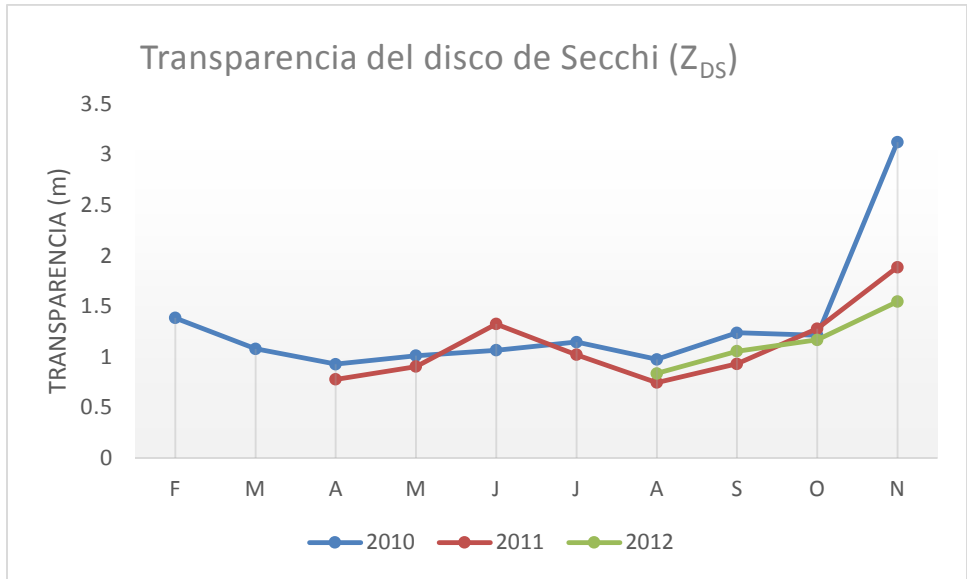
Comportamiento de los factores fisicoquímicos

En la gráfica 11 se muestra que la profundidad promedio obtenida para el embalse fue baja, pues se promedió la parte más profunda que se localiza en la cortina y centro (con un máximo de 25.7 m) con las estaciones de Tizates y Amanalco que son someras (con un promedio de 1.5 m). No obstante se pudo observar que la máxima profundidad se registró en la época lluviosa, y el nivel del agua descendió aproximadamente 4 metros en el mes de agosto del año 2011 y en octubre del 2012 y después el nivel se recupera, probablemente por inyección de agua de las presas aledañas.



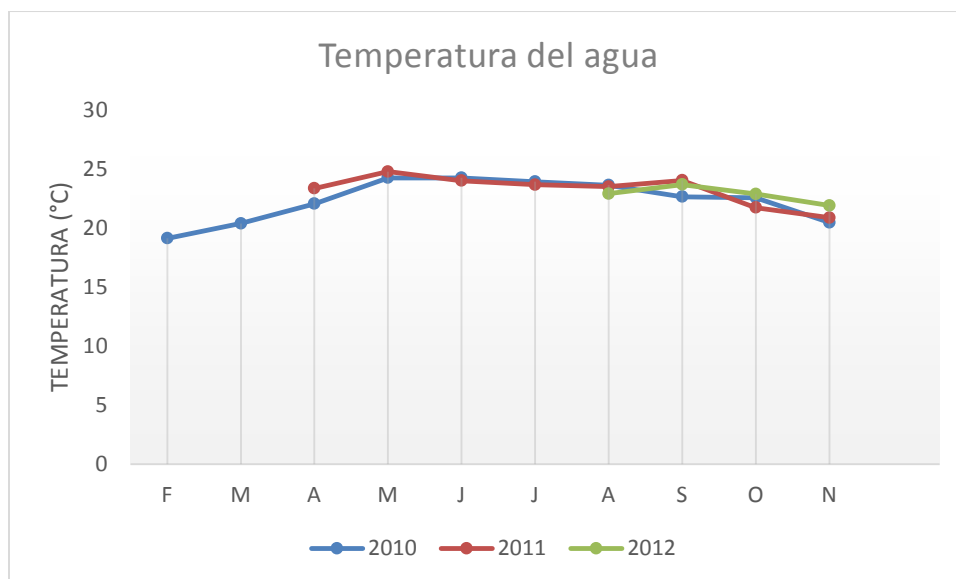
Gráfica 11. Promedio de la profundidad mensual de dos de los tres años de estudio.

La transparencia del disco de Secchi (Z_{DS}) se comportó de una manera similar a lo largo de la temporada de muestreo, con valores menores a 1.5 m, con excepción del mes de noviembre, en donde la transparencia fue de hasta 3 m de profundidad en el año 2010 (gráfica 12).



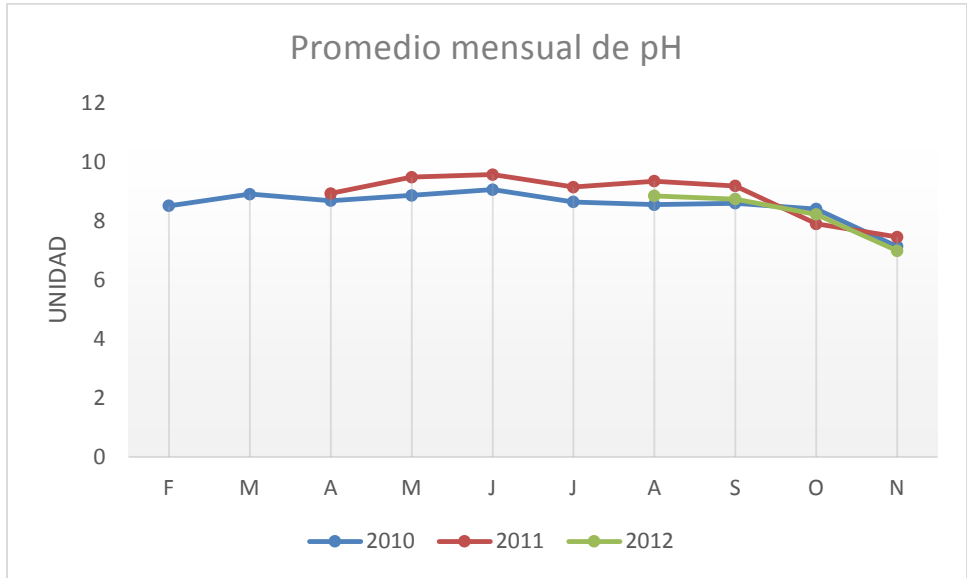
Gráfica 12. Promedio mensual de la transparencia del disco de Secchi (Z_{DS}) durante los tres años de muestreo.

El comportamiento de la temperatura del agua durante los tres años fue muy homogéneo con un promedio de 22.7 °C (gráfica 13), la temperatura más baja (19.1 °C) se registró en el mes de febrero y la más alta (24.7°C) en el mes de mayo.



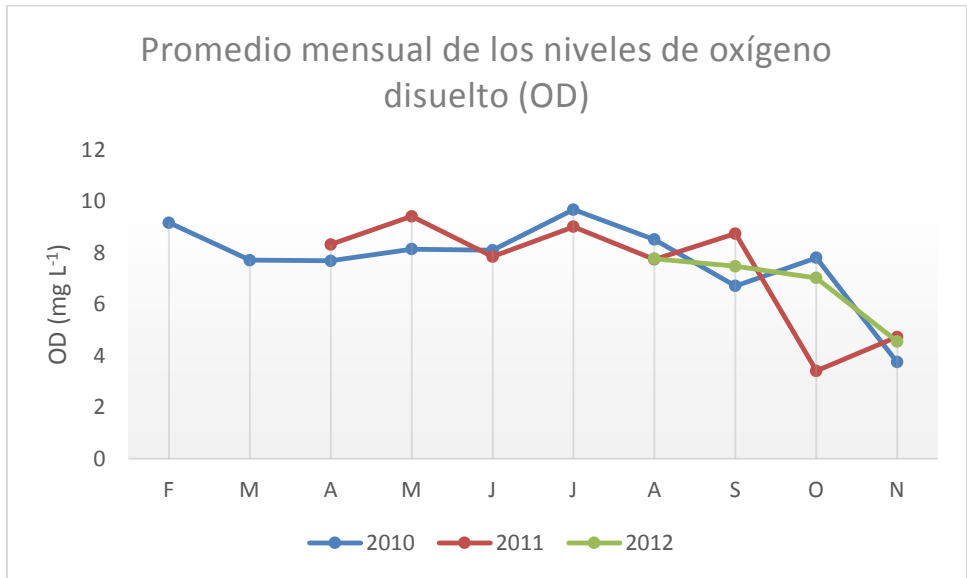
Gráfica 13. Promedio mensual de la temperatura durante la temporada de muestreo.

En general el pH de los tres años fue alcalino, con un promedio de 8.6, en los meses de octubre y noviembre se registraron los niveles más bajos de pH llegando hasta un mínimo de 6.9 (gráfica 14).



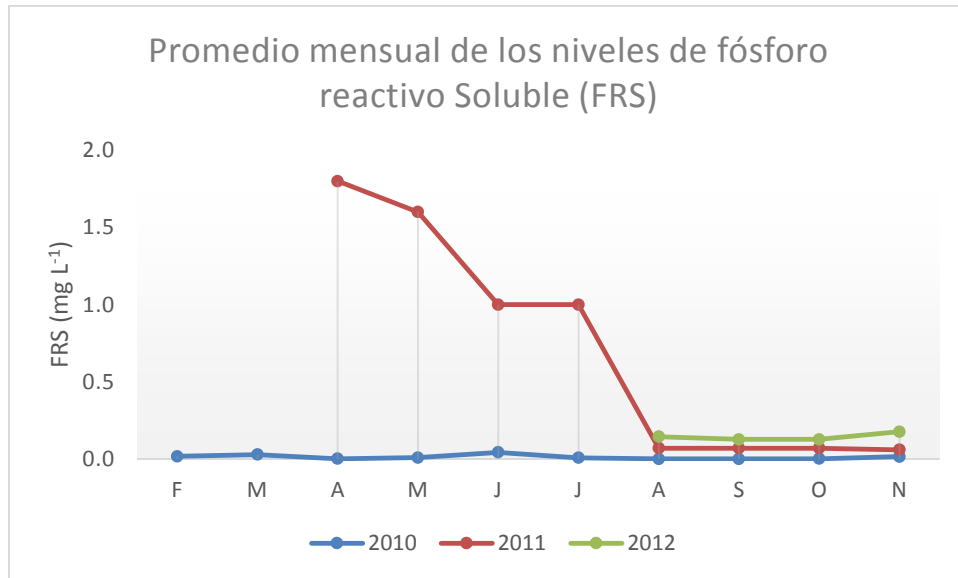
Gráfica 14. Promedio mensual de pH durante la temporada de muestreo de los tres años de estudio.

Los niveles de oxígeno disuelto (OD) en el agua durante los tres años de estudio que se muestran en la gráfica 15, se comportaron de una forma similar con valores de 7.43 mg L^{-1} en promedio, con excepción del mes de octubre de 2011 en donde el nivel de OD baja hasta 3.4 mg L^{-1} y en noviembre de 2010 con 3.75 mg L^{-1} .



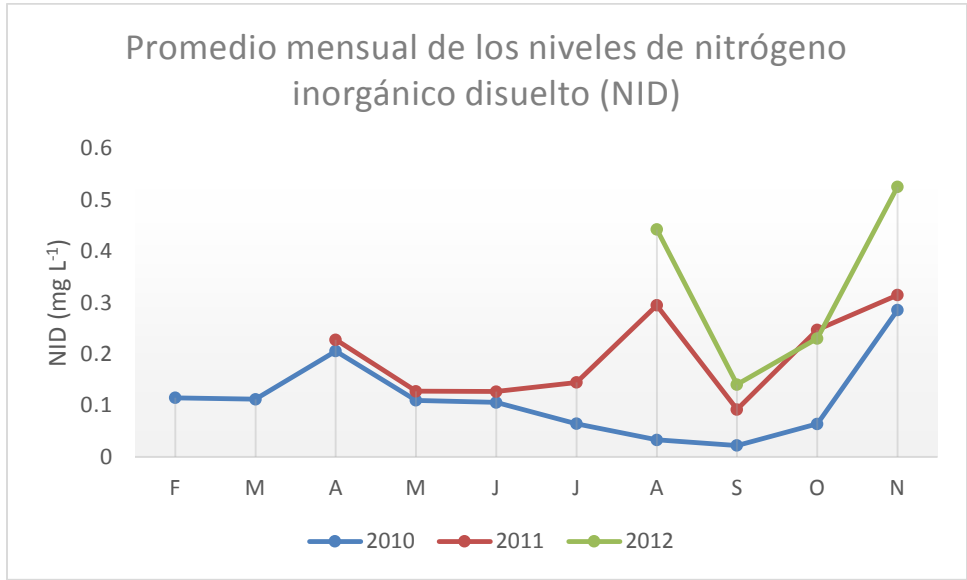
Gráfica 15. Promedio mensual de los niveles de oxígeno disuelto (OD) durante la temporada de muestreo de los tres años de estudio.

De los tres años de estudio, en 2011 se presentaron los niveles más altos de fósforo reactivo soluble (FRS), en el mes de abril se registró el nivel más alto con 1.8 mg L^{-1} , en este mismo año los valores bajaron mensualmente y de una forma gradual, hasta el nivel más bajo en el mes de agosto (gráfica 16).



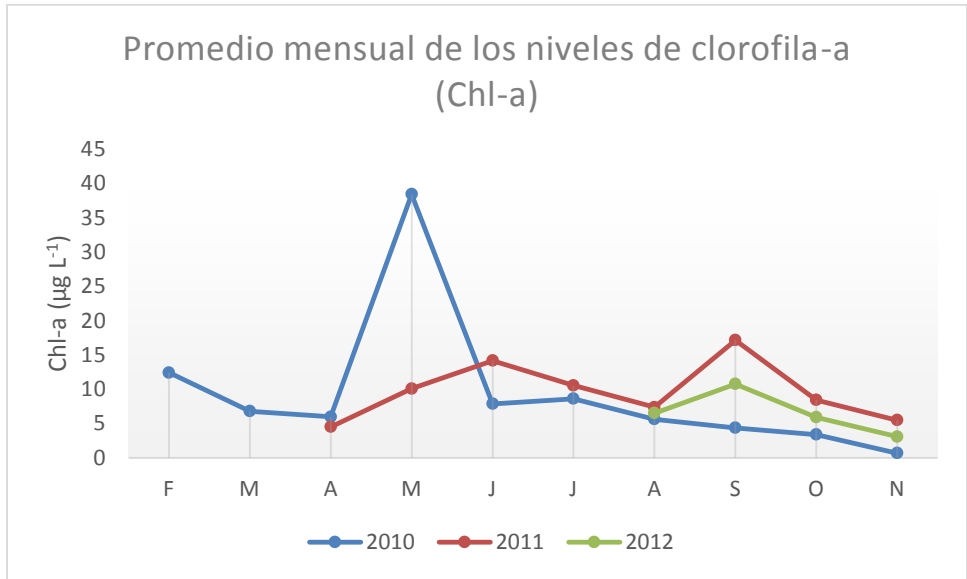
Gráfica 16. Promedio mensual de los niveles de fósforo reactivo soluble (FRS) durante la temporada de muestreo en los tres años de estudio.

Los niveles de nitrógeno inorgánico disuelto exhiben tres pulsos, uno en abril, otro en agosto y el último en octubre-noviembre (gráfica17), los pulsos de abril y noviembre son ocasionados mayoritariamente por una mineralización de amonio que se produce en el fondo del embalse, el cual es transportado a la superficie en la temporada de mezcla, y el nitrógeno de agosto es causado por nitratos arrastrados por las lluvias.



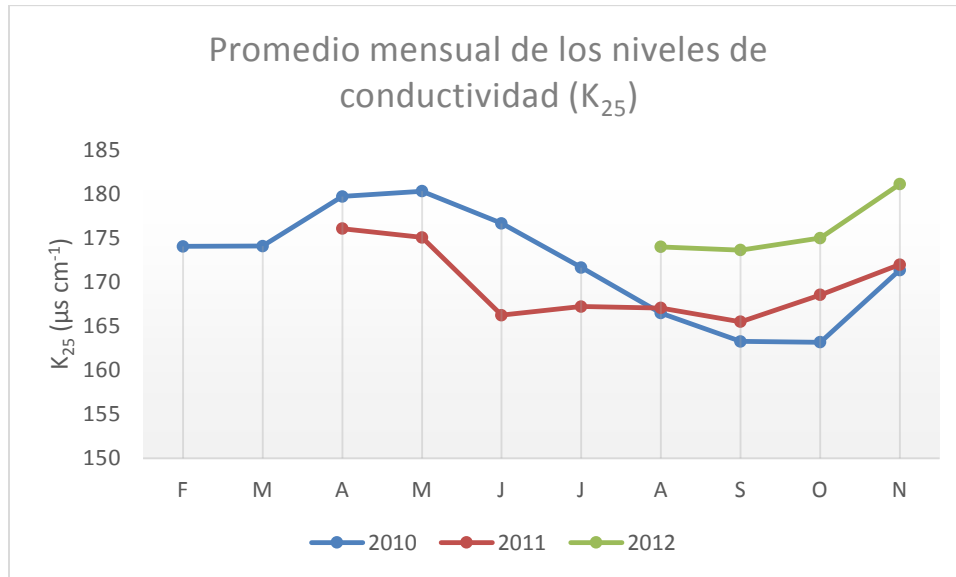
Gráfica 17. Promedio mensual de los niveles de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) disuelto durante la temporada de muestreo de los tres años.

La clorofila-a, se encuentran en un promedio de $9.003 \mu\text{g L}^{-1}$ (gráfica 18), disminuyendo sus niveles en el mes de noviembre, con valores de $0.68 \mu\text{g L}^{-1}$, $5.49 \mu\text{g L}^{-1}$ y $3.08 \mu\text{g L}^{-1}$ para ese mes en los años 2010, 2011 y 2012 respectivamente.



Gráfica 18. Promedio mensual de los niveles de clorofila-a (Chl-a) durante el periodo de muestreo en los tres años de estudio.

En el caso de la conductividad, como se muestra en la gráfica 19, el promedio fue de 171.02 μS , su nivel disminuyó en la temporada de lluvias y a partir del mes de octubre los niveles aumentan. En el caso del mes de noviembre de 2012, alcanza el nivel máximo registrado para este trabajo que fue de 181.1 $\mu\text{S cm}^{-1}$.



Gráfica 19. Promedio mensual de los niveles de conductividad (K_{25}) durante el periodo de muestreo en los tres años de estudio.

Posteriormente se realizó un análisis de correlación canónica (CCA) por año, tomando en cuenta los valores de los factores fisicoquímicos, valores de nutrientes, caracterización molecular y diversidad de especies de cada estación.

La correlación del año 2010 (Fig. 3) arroja en un mismo cuadrante de la gráfica la presencia de microcistinas (MCs), el gen *mcyE* y la presencia del gen que caracteriza al género *Microcystis* (MIC), y dentro de ese mismo cuadrante están presentes *A. planctonica*, *P. agardhii* y *A. aff. viguieri*; en éste caso *M. aeruginosa* se encuentra en un cuadrante diferente, probablemente debido a su escasa presencia en el periodo de muestreo.

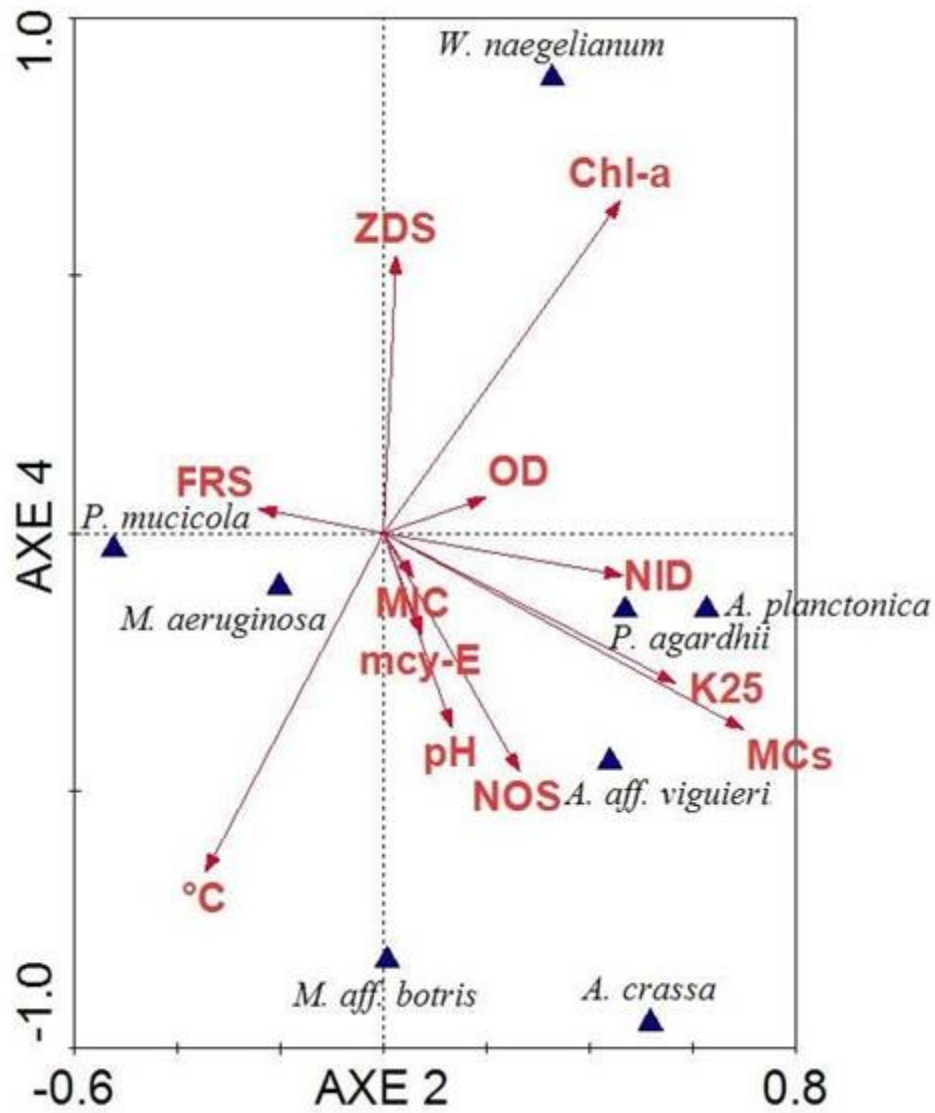


Fig. 3. Eje 2 y eje 4 de un biplot basado en el software Canoco 4.5, considerando separadamente las variables ambientales, moleculares y las especies involucradas en el año 2010.

En el caso del año 2011 (Fig. 4) el análisis arroja dentro del mismo cuadrante la presencia de microcistinas y del gen *mcyE*, las especies más relacionadas a estas variables fueron *A. planctónica*, *P. agardhii* y *A. aff. viguieri*; en un cuadrante diferente se encuentra la presencia del gen específico para el género *Microcystis* y la presencia de *M. aeruginosa*.

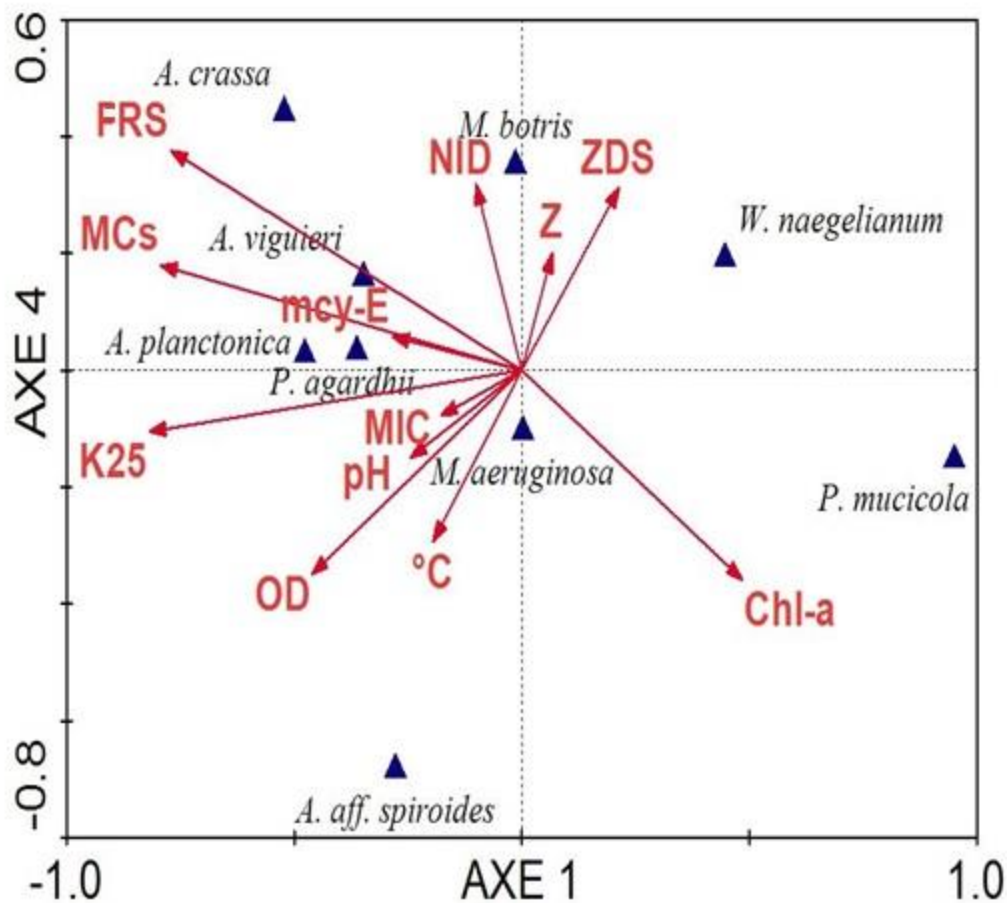


Fig. 4. Eje 1 y eje 4 de un biplot basado en el software Canoco 4.5, considerando separadamente las variables ambientales, moleculares y las especies involucradas en el año 2011.

En el último año de estudio (Fig. 5) *M. aeruginosa* fue la que aportó más biovolumen, y esto se refleja en el análisis ya que está relacionada con la presencia de microcistinas y con la presencia del gen *mcyE* dentro de un mismo cuadrante de la gráfica, además de que *A. planctonica* sigue estando presente en la relación con estas dos variables.

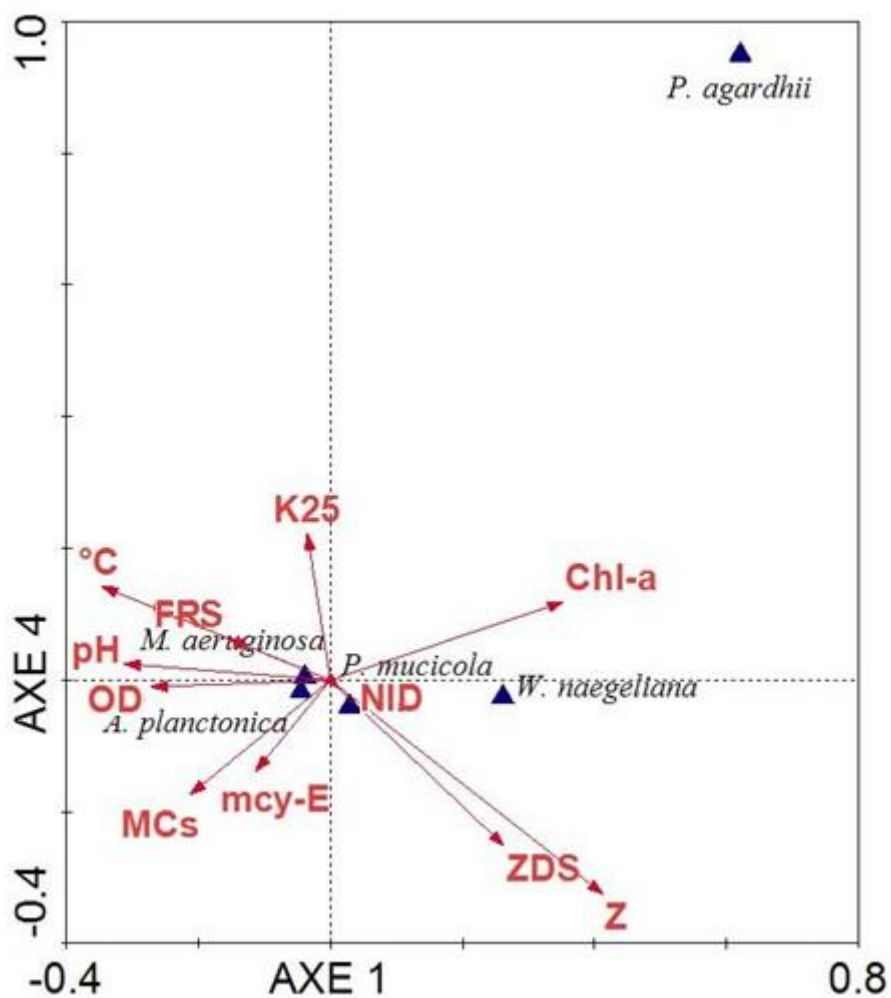


Fig. 5. Eje 1 y eje 4 de un biplot basado en el software Canoco 4.5, considerando separadamente las variables ambientales, moleculares y las especies involucradas en el año 2012.

Discusión

La presencia de “blooms” de cianobacterias representa un grave problema para el ambiente. Además de afectar directamente al recurso hídrico, también se ven afectados nocivamente los organismos expuestos al cuerpo de agua a consecuencia de la alta producción de toxinas en donde se desarrollan estos florecimientos. Para la detección de las toxinas presentes en los diferentes cuerpos de agua se han utilizado varias técnicas, que van desde las identificaciones morfológicas, bioensayos, técnicas moleculares, hasta las cromatográficas, entre otras. En este estudio se correlacionaron los resultados obtenidos de una técnica molecular que consiste en una prueba de amplificación múltiple del ADN por la PCR, basada principalmente en la identificación del gen *mcyE* del dominio AMT, uno de los genes involucrados en la producción de microcistina. Previamente se determinó la concentración de microcistina de las muestras mediante la prueba de ELISA para confirmar la presencia de esta toxina en el agua, además de tomar en cuenta el biovolumen y la identificación morfológica de los organismos potencialmente tóxicos en muestras ambientales del embalse Valle de Bravo, así como los diferentes factores fisicoquímicos de la zona de estudio.

Los valores de los parámetros fisicoquímicos durante los tres años de estudio se comportaron en general de una forma similar, con una temperatura promedio del agua de 22.7 °C, con el periodo más cálido desde mayo hasta el mes de septiembre. Los valores de conductividad indican bajo contenido de sales (Wetzel, 2001), cuya concentración se diluye en el periodo de lluvias.

La concentración de clorofila-a durante casi todos los meses de estudio muestra una actividad fotosintética importante, la cual genera condiciones alcalinas y de buena oxigenación en el agua, mayor a 8 mgL⁻¹ (gráfica 15) al ser el oxígeno un producto de este proceso. En el mes de noviembre se presenta el fenómeno de mezcla, y bajo estas condiciones disminuye la concentración de clorofila-a con valores de 0.68 µg L⁻¹ en 2010, 5.49 µg L⁻¹ en 2011, y 3.08 µg L⁻¹ en 2012 (gráfica 18), ya que por el movimiento constante de la columna de agua el desarrollo de las algas no se ve favorecida, por lo cual el pH alcanza la neutralidad con valores de 7.1 en el 2010, 7.4 en el 2011 y 6.9 en el 2012 (gráfica 14). Los valores de oxígeno también descienden en este mes al no existir un excedente de fitoplancton y la transparencia aumenta hasta 3 m en el 2010 (gráfica 12), esto indica que el fitoplancton es responsable en parte de la baja transparencia en los meses cálidos. Los valores de clorofila-a (promedio de 9.003 µg L⁻¹) y turbiedad llevan a clasificar el embalse como un cuerpo de agua eutrófico, al estar dentro del rango de los valores límite para un sistema concreto de clasificación trófica en lagos y embalses según Drovandi y colaboradores (2005), en donde asignan esta categoría a cuerpos de agua cuando los

valores de clorofila-a están entre los 8 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Este estado trófico del cuerpo de agua coincide con reportes previos de Gaytán *et al.* en 2011 y Olvera-Viascán *et al.* en 1998.

En el caso de los nutrientes encontramos un promedio de 0.28 mg L^{-1} para fósforo reactivo soluble (FRS) y de 0.18 mg L^{-1} para nitrógeno inorgánico disuelto (NID), la relación molecular promediando los 3 años de NID:FRS es baja (1.4:1), Merino-Ibarra *et al.* (2007) mencionan que cuando esta relación es baja, el nutriente limitante es el nitrógeno. Ramírez y Gonzáles (2012) mencionan que las cianobacterias son beneficiadas por los altos niveles de nutrientes; sin embargo cuando el nutriente limitante es el nitrógeno las cianobacterias son beneficiadas ante otros organismos del fitoplancton pues tienen bajos requerimientos de nitrógeno y además poseen gránulos de reserva de fosfatos en su citoplasma y algunas de ellas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Vela *et al.*, 2007). Cabe mencionar que al ser el nitrógeno el nutriente limitante se favorece el desarrollo de Nostocales (Oliver y Ganf, 2000; Jöhnk *et al.*, 2011), uno de los principales grupos registrados para este estudio.

Dentro del grupo de cianobacterias que fueron identificadas morfológicamente en las muestras del embalse Valle de Bravo, se encontraron presentes organismos potencialmente tóxicos (9 especies); esto explica la presencia y los valores registrados de microcistinas en las muestras analizadas en los tres años que van desde un mínimo de 0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$ hasta 6.19 $\mu\text{g L}^{-1}$. De acuerdo a los conteos e identificación de fitoplancton, se tomaron en cuenta sólo los organismos capaces de sintetizar microcistinas.

Se ha reportado en diferentes géneros la presencia de microcistinas como es el caso de *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc* y *Anabaenopsis*. De ellos se logró aislar satisfactoriamente *M. aeruginosa*, proveniente del embalse Valle de Bravo y asimismo *P. agardhii* y *Anabaenopsis* sp del Lago de Texcoco. Las cianobacterias mencionadas son formadoras de "Blooms", generalmente en aguas ricas en nitrógeno y fósforo, (Davis *et al.*, 2009) aunque no son los únicos elementos indispensables para el óptimo desarrollo de estos organismos, pues también son importantes otros factores ambientales como la luz (Kim *et al.*, 2005), la salinidad (Tonk *et al.*, 2007) y la temperatura (Robarts y Zohary, 1987) por este motivo para el aislamiento y mantenimiento de las cepas se ha utilizado un medio de cultivo que beneficie el crecimiento de cianobacterias, en éste caso se utilizó el medio mineral Z-8. Aunque en un principio el aislamiento de cepas se realizó en medio mineral BG-11, estos dos medios son similares en su composición pero con la diferencia que el medio BG-11 contiene más de 3 veces la concentración de NaNO_3 , con respecto a la concentración que tiene el Z-8 y aun cuando se ha demostrado que un incremento en la concentración de ese compuesto puede dar mejores resultados, la presencia de citratos en el medio BG-11 llevan a la formación de H_2O_2 a niveles tóxicos para las células individuales. Por otro lado el medio Z-8 cuenta con la presencia de los oligoelementos de Gaffron, que

resultan importantes para el crecimiento de cianobacterias. Por estos motivos es que en el medio Z-8 se obtuvieron mejores resultados tanto en el aislamiento como en el mantenimiento de los diferentes monocultivos. Además este medio fue adicionado con Ciclohexamida, que es un inhibidor de la síntesis proteica, con la finalidad de eliminar todos los organismos eucariontes y así lograr un monocultivo (Packer y Glazer, 1988).

En cuanto a la caracterización molecular de las muestras ambientales del embalse Valle de Bravo, la prueba de PCR arrojó resultados positivos al amplificar en todas las estaciones de muestreo la región rRNA 16S específica para el género *Microcystis*. Aunque *M. aeruginosa* y *M. aff. botrys* estuvieron presentes, fue baja su abundancia con respecto a los conteos realizados en este trabajo. Por el contrario *M. wesenbergii* fue una especie que estuvo presente en todas las estaciones de muestreo durante los tres años de estudio, y su abundancia aporta gran parte al total de biovolumen registrado, por esa razón, se asume que es el organismo que produce los resultados positivos de presencia del gen de la región rRNA 16S específica para el género *Microcystis*, sin embargo no se consideró para los análisis de este estudio, ya que como lo mencionan Vasconcelos *et al.*, (2010) y Liu *et al.*, (2010), ésta especie ha sido reportada como no tóxica. Llama la atención que existen más resultados positivos de este gen en la estación Tizates y Amanalco en los tres años de estudio, indicando que las descargas de ortofosfato y amonio favorecen a las cianobacterias portadoras de este gen y por lo tanto el género *Microcystis*.

Al utilizar una técnica tan sensible como la PCR, podemos encontrar cepas aparentemente no tóxicas pero con presencia del gen, esto las define como cepas potencialmente tóxicas, ya que pueden no expresar su toxicidad en determinadas circunstancias (Kardinaal *et al.*, 2007). Hisbergues *et al.* en 2003 mencionan que la toxicidad puede no expresarse ya que se necesita de todos los genes del *cluster* relacionados con la síntesis de microcistina, la ausencia de uno de estos puede interrumpir el proceso bioquímico de la síntesis, por esta razón es conveniente el uso de la prueba de ELISA para asegurar la presencia de la toxina en la muestra de agua.

Los resultados de la prueba de ELISA muestran niveles de equivalentes de microcistinas en todas las muestras analizadas, y sin embargo no en todas las muestras se encontró el gen *mcyE*. Esta aparente incongruencia podría justificarse por el hecho de que para que existan resultados positivos de la presencia de un gen se requiere que en la muestra existan cantidades mínimas de material genético por cada especie o género a analizar y es posible que no se cumpliera con este requisito en las muestras con resultados negativos.

Kaebnick y Neilan en 2001 encontraron que puede haber una variación en las poblaciones formadoras de “blooms”, al encontrar cambios de cepas tóxicas y no tóxicas; esto puede explicar la variación de la presencia del gen a través de los diferentes meses de muestreo,

lo cual se refuerza con estudios como el de Gobler *et al.* que en 2007 demuestran que algunas cepas tóxicas de *Microcystis*, presentan cambios estacionales en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de microcistina, esto puede atribuirse a las diferentes interacciones entre factores ambientales tales como los cambios de temperatura y la carga de nutrientes.

Para éste trabajo, de todas las estaciones de estudio se obtuvieron muestras que presentaron un amplificado utilizando el par de oligonucleótidos HEPF/HEPR, el cual amplifica para una secuencia específica del gen *mcyE* del dominio AMT, Vasconcelos *et al.* (2010) reportan que ese par de oligonucleótidos también amplifica para el gen *ndaF*, involucrado en la producción de nodularinas, aunque se descarta la presencia de esta cianotoxina por la ausencia del género *Nodularia*.

Con base en los análisis de correlación canónica, se puede ver que están estrechamente relacionadas *A. planctonica*, *P. agardhii* y *A. aff. virguieri*, con los niveles de microcistinas y la presencia del gen *mcyE*, estas tres especies pertenecen a géneros reportados como productores de microcistinas (Cood *et al.*, 2005). El pH también está relacionado con la presencia de estas tres especies y sobre todo con la presencia del gen específico para *Microcystis*. Shapiro (1997) afirma que con valores alcalinos de pH como los que encontramos en el embalse Valle de Bravo, durante la estratificación, los niveles de CO₂ son casi inexistentes y los bicarbonatos son la forma predominante de fuente de carbón inorgánico. No todas las algas tienen enzimas para integrar el carbón en forma de bicarbonato pero las cianobacterias sí, por lo tanto el pH elevado les da ventaja competitiva (Msagati *et al.*, 2006).

En el año 2012 *M. aeruginosa* aparece como la especie más abundante, contrastando con los dos años anteriores en los que *M. wesenbergii* dominó. Un cambio en el nivel del agua, como se puede observar en la gráfica de profundidad, pudo haber causado el cambio de dominancia de especie o bien pudo haber sido introducida en el trasvase de agua de otra presa.

M. aeruginosa también estuvo relacionada con los niveles de pH; Jiang *et al.* (2008) reportan que una concentración alta de fósforo promueve mayor abundancia de células totales de *Microcystis*, y sobre todo de células tóxicas, y dado que el nitrógeno resultó ser el nutriente limitante, las condiciones favorecen el dominio de las cianobacterias.

En general durante los tres años de estudio se puede observar la presencia de cepas potencialmente tóxicas, aunque con una notable variación a través del tiempo, como se ha mencionado anteriormente. Esta variación de presencia/ausencia del gen tóxico probablemente sea determinada por diversos factores ambientales y a la dominancia de

alguno de los nutrientes esenciales para el desarrollo del fitoplancton en el embalse, además se debe tener en cuenta la dinámica de estratificación del cuerpo de agua.

En este caso la producción de microcistinas se le atribuye a las principales cepas registradas en los diferentes muestreos, en los años 2010 y 2011 a *A. planctonica*, *A. aff. Virguieri* y *P. agardhii*. Sin embargo, en el 2012 por un cambio de dominancia de especie, la producción de esta toxina se le atribuye a *M. aeruginosa*.

Es recomendable seguir con un monitoreo permanente del embalse Valle de Bravo, ya que es uno de los principales aportadores de agua potable a la ciudad de México. Con técnicas moleculares como la PCR se podrán identificar de manera más rápida las especies con potencialidad tóxica que afecten la salud humana, y de esta forma conocer la dinámica de toxicidad del embalse, pudiendo así encontrar una posible explicación de los niveles de nutrientes que favorecen la eutrofización del cuerpo de agua en temporadas específicas del año.

Conclusiones

- Se obtuvieron tres monocultivos de muestras ambientales, *M. aeruginosa* del embalse Valle de Bravo; *P. agardhii* y *Anabaenopsis* sp. del lago de Texcoco; logrando mantenerlas con un crecimiento constante bajo condiciones óptimas de luz, temperatura y nutrientes, utilizando el medio mineral Z8.
- Se logró amplificar regiones diferentes del ADN mediante una PCR múltiple de los monocultivos obtenidos y de diferentes muestras ambientales del embalse Valle de Bravo, determinando así que el embalse cuenta con la presencia de organismos potencialmente tóxicos al obtener un amplificado de 470 pb, que corresponden a una secuencia específica del gen *mcyE*-AMT, gen involucrado en la síntesis de microcistina, además de una secuencia de 230 pb correspondiente a una región del rRNA 16S específica para el género *Microcystis*, uno de los principales géneros productores de dicha toxina.
- Se confirmó la expresión del gen involucrado en la producción de microcistina mediante una prueba de ELISA, obteniendo resultados positivos en los monocultivos y en las muestras tomadas del embalse.
- Se logró integrar la información obtenida por medio del software Canoco versión 4.5 para Windows, correlacionando las variables ambientales, moleculares y biológicas; estableciendo que para el año 2010 existe una relación entre la presencia del gen *mcyE*, la región del rRNA 16S específica para el género *Microcystis* y el biovolumen aportado por *A. planctonica*, *P. agardhii* y *A. aff. viguieri* atribuyéndole a estos organismos la principal contribución para la toxicidad en las muestras analizadas. Caso que se repite en el 2011, con excepción de la presencia de la región del rRNA 16S específica para el género *Microcystis*. En 2012 la relación más estrecha fue la presencia del gen *mcyE*, la región del rRNA 16S específica para el género *Microcystis* y el biovolumen aportado por *M. aeruginosa*, confirmando de esta manera la toxicidad de éste organismo, cabe mencionar que en éste año se obtuvieron los valores más elevados de equivalentes de microcistinas obtenidos por la prueba de ELISA, análisis que se realizó a todas las muestras, confirmando así la presencia de equivalentes de la toxina y la expresión del gen *mcyE* en condiciones de laboratorio y ambientales.

Literatura citada

1. Arzate M.A. 2008. Detección de cianobacterias toxigénicas pertenecientes al género *Microcystis* mediante marcadores moleculares y ensayos biológicos. Tesis de maestría en ciencias químico-biológicas. Escuela Nacional, de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 69 pp.
2. Briand, J., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J. 2003 Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vertebrate Research* 34:361- 377.
3. Carrasco G. D. 2007. Cianobacterias planctónicas y cianotoxinas en embalses españoles. Tesis de doctorado en ciencias biológicas Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. 300 pp.
4. Carmichael WW, Min-Juan Y, Zheng-Rong H, Jia-Wan H, Jia-Lu Y. 1988. Occurrence of the toxic cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* in central China. *Arch Hydrobiol* 114:21–30
5. Christiansen G., Fastner J., Erhard M., Börner T., Dittmann E. 2003. Microcystin Biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology* 185(2):564-572.
6. Chorus I. y Bartram J. 1999 Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization.
7. Codd G. A, Morrison L. F, Metcalf J. S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 203: 264–272.
8. Davis T. W., Berry D. L., Boyer G. L., Gobler C. J. 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8: 715–725.
9. De León, L. 2002. Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. En: Domínguez, A. y R. G. Prieto (eds.) *Perfil Ambiental del Uruguay*. Nordan-Comunidad, Montevideo. pp: 28-37.
10. Drovandi A., Zuluaga J., Filippini M., Bermejillo A., Peralta P., Bustamante M., Ruiz M., Granero M., MOrsucci A., Velgas M., Valdez A., Nacif N. 2005. Diagnóstico preliminar del estado trófico del embalse El Carrizal, Provincia de Mendoza. Instituto Nacional del agua. Argentina.
11. Gaytán H. M., Martínez A. V., Oliva M. M., Durán D. A., Ramírez G.P. 2011. Temporal variation of phytoplankton from the tropical reservoir Valle de Bravo, Mexico. *J Environ Biol.* 32:117–126.
12. Gobler, C.J., Davis, T.W., Coyne, K.J., Boyer, G.L., 2007. The interactive influences of nutrient loading and zooplankton grazing on the growth and toxicity of cyanobacteria blooms in a eutrophic lake. *Harmful Algae* 6: 119–133.

13. Hisbergues M., Christiansen G., Rouhiainen L., Sivonen K., Börnen T. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol.* 180: 402-403.
14. Jiang, Y., Ji, B., Wong, R.N.S., Wong, M.H., 2008. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloomforming cyanobacterium-*Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae* 7, 127–136.
15. Jöhnk K, Brüggemann R, Rucker J, Luther B, Simon U, Nixdorf B, Wiedner C. 2011. Modelling life cycle and population dynamics of Nostocales (cyanobacteria). *Environ Modell Softw.* 26:669–677.
16. Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 1–9.
17. Kardinaal, E.W., Tonk, L., Janse, I., Hol, S., Slot, P., Huisman, J., Visser, P.M., 2007. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2939–2946.
18. Kim, H.R., Kim, C.K., Ahn, T.S., Yoo, S.A., Lee, D.H., 2005. Effects of temperature and light on microcystin synthetase gene transcription in *Microcystis aeruginosa*. *Key Eng. Mater.* 277–279, 606–611.
19. Kurmayer R. & Christensen G. 2009. The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria. Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology. Freshwater Biological Association, *Freshwater reviews* 2: 31-50.
20. Lanzarot M. 2008. Cianobacterias tóxicas y mortandades en masa de fauna salvaje en las Marismas de Doñana. Tesis de doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid. 156 pp.
21. Liu AR, Chen SC, Lin XM, Wu SY, Xu T, Cai FM, Raesh J (2010). Endophytic Pestalotiopsis species associated with plants of Palmae, Rhizophoraceae, Planchonellae and Podocarpaceae in Hainan, China. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:2661-2669.
22. Lozano Orozco J. G. 2009. Herramientas moleculares para la detección de cianobacterias nocivas presentes en un cuerpo de agua. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. 38 pp.
23. Merino-Ibarra M., Monroy-Ríos E., Vilaclara G., Castillo F., Gallegos M., Ramírez-Zierold J. 2007. Physical and chemical limnology of a wind-swept tropical highland reservoir.
24. Msagati TAM, Siame BA, Shushu DD. 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat Toxicol.* 78:382–397.

25. Oliver R. L., Ganf G. G. 2000. Freshwater blooms. In: Whiton B. A., Potts M, editors. The ecology of Cyanobacteria. Dordrecht (Netherlands): *Kluwer Academic Press*. p. 149–194.
26. Olvera-Viascán V, Bravo-Inclán L, Sánchez-Chávez J. 1998. Aquatic ecology and management assessment in Valle de Bravo reservoir and watershed. *Aquat Ecosyst Health Manage*. 1:277–290.
27. O’Neil J. M., Davis T. W., Burford M. A., Golber C. J. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14:313-334.
28. Packer L., Glazer A. N. 1998. Methods in enzymology, Cyanobacteria. San Diego California, Advisory Board.
29. Pineda M. R. 2009. Determinación de cianobacterias toxigénicas productoras de microcistina por métodos moleculares y bioensayos. Tesis para obtener grado de maestría en Ciencias Químico-biológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, 101 pp.
30. Ramírez-R. J., González-B. R., 2012. Establecimiento del nutriente limitante con base en los cambios de la estructura del ensamblaje fitoplanctónico en un embalse tropical colombiano. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia. *Caldasia* 34(2):421-441.
31. Reynolds, C. S. (1984). The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge, Cambridge University Press. 390pp.
32. Reynolds, C. S. 2006. Ecology of phytoplankton. Cambridge, Cambridge University Press. 550 pp.
33. Robarts, R.D., Zohary, T., 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 21, 391–399.
34. Roset J., Aguayo S., Muños M. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Madrid. *Toxicon*. 18: 65-71.
35. Shapiro J. 1997. The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. *Freshwater Biol.* 37:307–323.
36. Tillet D., Neilan B., 2000. Xanthogenate Nucleic Acid Isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *J Phycol.* 36:251-258.
37. Tonk, L., Boch, K., Visser, P., Huisman, J., 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat. Microb. Ecol.* 46, 117–123.
38. Vasconcelos V., Martins A., Vale M., Antunes A., Azevedo J., Welker M., Lopez O., Montejano G. 2010. First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon* 56:425–431.

39. Vela L., Sevilla E., Martín B., Pellicer S., Bes M., Fillat M., Peleato M. 2007 Las microcistinas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza. *Real Academia de Ciencias. Zaragoza*. 62: 135–146.
40. Via-Ordorika L., Fastner J., Kurmayer R., Hisbergues M., Dittmann E., Komárek J., Erhard M., Chorus I. 2004. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: Detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and applied microbiology*. 27: 592-602.
41. Vidal L. y Pérez M. 2009. Claves taxonómicas en: Bonilla S. *Cianobacterias planctónicas del Uruguay, manual para la identificación y medidas de gestión*. Documento técnico nº 16. Programa Hidrológico Internacional. UNESCO.
42. Wera, S., Hemming, B. A. 1995. Serine/threonine protein phosphatases. Review Article. *Biochemical Journal* 311:17-29.
43. Wetzel, R. G. 2001. *Limnology. Lake and river ecosystem*. Tercera edición, Academic press. San Diego 1006 pp.
44. Whitton, B. y M. Potts. 2000. *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 669 pp.