

CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS RIBOSOMALES (ADNr) EN AISLAMIENTOS DE CIANOBACTERIAS ASOCIADAS A EVENTOS DE TOXICIDAD

Jesús Pérez-Linares, Roberto Cortés, Gopal Murugan, Arturo P. Sierra-Beltrán y Norma Y. Hernández-Saavedra*
CIBNOR. Unidad de Patología Marina. Laboratorio de Genética Molecular.
Mar Bermejo 195, Playa Palo Santa Rita, La Paz, 23090, Baja California Sur, México. Fax: +(612)1253625
e-mail: nhernan@cibnor.mx.

Palabras clave: cianobacterias, gen 16s ribosomal

Introducción. La proliferación de cianobacterias en reservorios de agua naturales y artificiales eutrofizados es un fenómeno común y representa un peligro potencial para muchos organismos silvestres, domésticos y cultivados, e incluso puede impactar seriamente la salud pública debido a que existen muchas especies que producen toxinas muy potentes (1, 2). A pesar de que se han implementado varias estrategias para identificar y evitar el crecimiento de cianobacterias tóxicas, la mayoría presenta algunas limitaciones, por lo que fue necesario diseñar métodos más confiables y reproducibles para el monitoreo rutinario en cuerpos de agua (2,3,4). El uso de herramientas moleculares como la caracterización de ácidos nucleicos, PCR y secuenciación proveen resultados más sensibles y específicos (1-4).

Objetivo. En este trabajo se caracterizaron secuencias parciales de la subunidad ribosomal 16s (ADNr) de algunas cepas de cianobacterias tóxicas y de especies silvestres asociadas a eventos tóxicos, para encontrar fragmentos variables y conservados que ayuden al diagnóstico oportuno y confiable de su presencia en cuerpos de agua.

Metodología. Se cultivaron 11 especies de cianobacterias tóxicas comerciales (UTEX) y 8 especies aisladas de eventos tóxicos naturales. La amplificación se realizó mediante PCR usando como templado ADNg, siguiendo la metodología descrita por Nübel *et al.*, utilizando primers específicos que amplifican ~400 {CYA106F-CYA781R-I} y ~700 pb {CYA359F-CYA781R-II}. (1, 2). Los productos de PCR se purificaron con un kit comercial y se secuenciaron. Los cromatogramas se analizaron con el programa Chromas y se alinearon y confrontaron con otras secuencias del GenBank en el programa BLAST. Finalmente se utilizó el programa DNAMAN[®] para obtener las secuencias consenso, el análisis de alineamiento y un dendrograma de homologías.

Resultados. El ADNg de los cultivos se obtuvo aplicando el protocolo estándar de fenol-cloroformo y perlas de vidrio. Con otros métodos la calidad y cantidad de ADNg recuperada fue muy baja, debido a que las cianobacterias poseen cubiertas extracelulares gruesas que dificultan la disrupción mecánica de las células y la extracción de ácidos nucleicos (5). Con los primers que amplifican fragmentos de ~700 pb se obtuvieron amplicones de alta calidad y cantidad, sin embargo, con los que amplifican fragmentos de ~400 pb

no se obtuvieron amplicones en todas las muestras. Los 19 cultivos se concentraron en 5 grupos diferentes pertenecientes a géneros filamentosos (*Schizothrix*, *Anabaena*, *Nodularia* y *Geitlerinema*) y una especie unicelular (*Synechococcus*). La mayoría tuvo homologías entre 92% y 99% con especies reportadas en el GenBank. Se obtuvieron 14 secuencias diferentes, en las que se incluyen 5 de cepas silvestres relacionadas con muerte de aves, peces y daños a camarones cultivados e irritación en humanos (6,7).

Conclusiones. Hasta la realización de este trabajo, no existían secuencias de *S. calcicola* reportadas en el GenBank, por lo que este trabajo proporcionó los primeros registros, ya que se cuenta con cultivos de cepas de referencia y un aislamiento silvestre. Por otro lado, el género *Geitlerinema* no había sido asociado a eventos tóxicos y en este trabajo se cuenta con una cepa relacionada a muerte de peces, y cepas provenientes de localidades donde se han reportado daños en camarones cultivados por blooms de *Microcystis* y *Synechococcus*, ésta última de origen silvestre y tóxica, incluida en las secuencias obtenidas (7, 8). Aunque el género *Geitlerinema* se considera inocuo, debe considerarse el peligro potencial de especies filamentosas formadoras de blooms debido los reportes de daños y muerte en peces, crustáceos y moluscos por la dificultad del intercambio de O₂ debido a la obstrucción de las branquias (8). *Anabaena variabilis* (8), relacionada con muerte de aves (6), se pudo identificar por medio de su secuencia. Se encontraron fragmentos variables en las secuencias parciales de la subunidad ribosomal 16s de cianobacterias, útiles para diferenciar los géneros estudiados y discriminar entre las especies y cepas.

Agradecimientos. Este proyecto fue financiado por el proyecto RP1 (CIBNOR), y el autor principal recibió la beca CONACyT con número de registro 158418.

Bibliografía. (1) Rouhiainen *et al.* 1995. *J. Bacteriol.* 177(20):6021-6026. (2) Rudi *et al.* 1998. *Appl. Env. Microbiol.* 64(7): 2639-2643. (3) Nübel *et al.* 1997. *Appl. Env. Microbiol.* 63(8):3327-3332. (4) Neilan *et al.* 1994. *Aust. J. Mar. FW Res.* 45:869-873. (5) García-Pichel *et al.* 2001. *Int. Microb.* 4: 227-236. (6) Sierra-Beltrán *et al.*, 2000. *SMP-UdeG*, 147 pp. (7) Cortés y Licea. 1999. *Rev. Lat. Microbiol.*, 41: 157-166. (8) Whitton y Potts. 2000. Kluwer Academic. 632 pp.