

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Detección de *Microcystis aeruginosa* y microcistina mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

***Microcystis aeruginosa* and microcystin detection by Polymerase Chain Reaction**

Authors/Autores: Chávez-Luzanía, R.A., Olea-Félix, M.J., Alonso-Rodríguez, R., Hernando, M.P., de los Santos-Villalobos, S.

ID: e1758

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1758>

Received/Fecha de recepción: September 05th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: September 24th 2024

Available online/Fecha de publicación: September 30th 2024

Please cite this article as/Como citar este artículo: Chávez-Luzanía, R.A., Olea-Félix, M.J., Alonso-Rodríguez, R., Hernando, M.P., de los Santos-Villalobos, S. (2024). *Microcystis aeruginosa* and microcystin detection by Polymerase Chain Reaction. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1758. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1758>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo breve

Detección de *Microcystis aeruginosa* y microcistina mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Microcystis aeruginosa and microcystin detection by Polymerase Chain Reaction

Detección de *Microcystis* y microcistina

Chávez-Luzanía, R.A. ¹ (ID), Olea-Félix, M.J. ¹ (ID), Alonso-Rodríguez, R. ² (ID),
Hernando, M.P. ^{3,4,5} (ID), de los Santos-Villalobos, S. ^{1*} (ID)

¹ Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de febrero, 818 sur, Cajeme. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México.

² Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Calz. Joel Montes Camarena, s/n, Mazatlán. 82040, Mazatlán, Sinaloa, México.

³ Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica. Av. General Paz, 1499, San Martín. B1650KNA, Buenos Aires, Argentina.

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Godoy Cruz, 2290, Cdad. Autónoma de Buenos Aires, C1414, Buenos Aires, Argentina

⁵ Red de Investigación de Estrésos Marinos-Costeros en América Latina y El Caribe, Juan Bautista Justo, 2550, Mar del Plata, Argentina

*Autor por correspondencia:

Sergio de los Santos-Villalobos. Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano. Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de febrero, 818 sur, Cajeme. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. Teléfono: (644) 4100900 Ext. 2124. E-mail: sergio.delossantos@itson.edu.mx

RESUMEN

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos importantes para diversos ciclos vitales de la biósfera; sin embargo, algunos géneros como *Microcystis* tienen la capacidad de formar floraciones y producir cianotoxinas que comprometen la calidad del agua. Este estudio tuvo como objetivo validar el uso de PCR punto final para detectar cianobacterias, el género *Microcystis* y su capacidad genética para producir microcistinas. Se utilizaron tres pares de oligonucleótidos para obtener las secuencias de las regiones del gen 16S ARNr de cianobacterias y del género *Microcystis*, así como del gen *mcyA* asociado con la producción de microcistinas. El uso de PCR de punto final permitió la detección específica de cianobacterias y de *Microcystis aeruginosa* MicArg en concentraciones celulares hasta 10 veces por debajo del límite de alerta de florecimiento, así como la detección del gen *mcyA*, tanto en cepas aisladas como en una comunidad microbiana simulada. La eficacia del uso de PCR de punto final para la detección específica de cianobacterias lo convierte en una herramienta de monitoreo temprano, capaz de predecir la producción potencial de microcistinas y, por tanto, resaltar su utilidad para la gestión de la calidad del agua para consumo humano.

PALABRAS CLAVE:

Cianobacterias, cianotoxina, *mcyA*, *Microcystis aeruginosa*.

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic organisms important in multiple biosphere life cycles; however, some genera such as *Microcystis* can form blooms and produce cyanotoxins that compromise water quality. This study aimed to validate the use of end-point PCR to detect cyanobacteria, the species *Microcystis aeruginosa*, and its genetic capacity to produce microcystins. Three pairs of oligonucleotides were used to obtain the sequences of the 16S rRNA gene regions of cyanobacteria and genus *Microcystis*, as well as, the *mcyA* gene associated with microcystin production. The use of end-point PCR allowed the specific detection of cyanobacteria and *Microcystis aeruginosa* MicArg in cell concentrations up to 10 times below the bloom alert limit, as well as the detection of the *mcyA* gene, both in isolated strains and in a simulated microbial community. The effectiveness of using end-point PCR for the specific detection of cyanobacteria makes it an early monitoring tool, capable of predicting the potential production of microcystins and, therefore, highlighting its usefulness for managing water quality for human consumption.

KEYWORDS:

Cyanobacteria, cyanotoxin, *mcyA*, *Microcystis aeruginosa*.

Introducción

Las cianobacterias son procariontes fotosintéticas oxigénicas con una historia evolutiva que se remonta a 3,500 millones de años (Kaushik & Balasubramanian, 2013). Aunque se encuentran de forma natural en ríos y fuentes de agua, los cambios ambientales inducidos por el hombre, como la eutrofización y el cambio climático, han acelerado su proliferación en las últimas décadas (Thawabteh *et al.*, 2023). Esto ha provocado floraciones de cianobacterias más frecuentes, que pueden degradar gravemente la calidad del agua y suponer una amenaza importante para las fuentes de agua potable y recreativa (Chorus *et al.*, 2021). Una preocupación clave es la capacidad de muchas especies de cianobacterias para producir cianotoxinas que pueden afectar a los seres humanos, los animales y las plantas. Estas toxinas se clasifican en función de sus efectos toxicológicos en hepatotoxinas, citotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas (Bláha *et al.*, 2009; Codd *et al.*, 2020)

El género *Microcystis*, se ha reportado en florecimientos en todos los continentes excepto en la Antártida, es una de las cianobacterias capaces de formar floraciones y producir toxinas (Zurawell *et al.*, 2005). Algunas especies de *Microcystis* producen microcistinas (MCs), toxinas conocidas por su toxicidad para los seres humanos, animales, plantas, fitoplancton, zooplancton y peces (Campos *et al.*, 2021; Lad *et al.*, 2022; Ren *et al.*, 2023). Las MCs son heptapéptidos cíclicos hepatotóxicos que contienen un componente central compartido, que consiste en una secuencia de siete aminoácidos (Watanabe *et al.*, 1996). Se han detectado más de 246 isoformas de MCs (Meriluoto *et al.*, 2016), que difieren principalmente en los L-aminoácidos en las posiciones 2 y 4, lo que da lugar a diferencias en las propiedades toxicocinéticas y toxicodinámicas (Rinehart *et al.*, 1994). Estas toxinas pueden contaminar ríos y arroyos, lo que supone una amenaza importante para el suministro de agua potable, ya que pueden pasar por alto los sistemas estándar de tratamiento de agua sin ser detectadas (Thawabteh *et al.*, 2023). Por lo tanto, políticas eficaces de gestión del agua son esenciales no solo para detectar las cianobacterias responsables de las floraciones, sino también para evaluar la presencia de cianotoxinas en los cuerpos de agua. Si bien la microscopía se ha utilizado tradicionalmente para identificar y cuantificar las especies de cianobacterias, tiene limitaciones significativas, incluida la incapacidad de diferenciar entre cepas tóxicas y no tóxicas, y la necesidad de una considerable experiencia taxonómica. Por otro lado, los métodos moleculares ofrecen especificidad, confiabilidad y menor tiempo, lo que permite la detección y cuantificación de cianobacterias y sus genes codificadores de toxinas. Estas técnicas altamente sensibles permiten una alerta temprana de cianobacterias tóxicas, a menudo detectándolas mucho antes de que se produzcan floraciones visibles, lo que las convierte en una herramienta valiosa para el monitoreo de

la calidad del agua (Codd *et al.*, 2020; Farrer *et al.*, 2015). En este sentido, los esfuerzos para detectar genes asociados con la producción de MCs se han centrado principalmente en el gen *mcyA*, uno de los diez genes dentro del grupo de genes *mcy* responsables de la biosíntesis de MCs (55 kpb en total) (Beversdorf *et al.*, 2015). El gen *mcyA* se destaca específicamente porque codifica una péptido sintetasa no ribosómica, que juega un papel crucial en la síntesis de las MCs (Rouhiainen *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la abundancia de genes *mcyA* se correlaciona significativamente con las concentraciones de MCs en entornos de agua dulce (Lee *et al.*, 2020).

Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo validar el uso de PCR para la detección de cianobacterias, específicamente del género *Microcystis*, y su potencial genético para producir MCs en una comunidad microbiana simulada, mediante la amplificación del gen 16S ARNr de cianobacterias (Valério *et al.*, 2009) y del género *Microcystis* (Martins & Vasconcelos, 2011), así como el gen *mcyA* (Sabart *et al.*, 2015), para evaluar la eficacia de la PCR como herramienta de alerta temprana de floraciones de cianobacterias nocivas.

Material y Métodos

Cepas microbianas

Los aislamientos estudiados fueron proporcionados por: i) Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML), Mazatlán, México (cepas M132/1 y NIES-39); ii) Colección de Microalgas del Proyecto de Cultivos de Microalgas Usos Potenciales, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México (SaJ 1, PAM1 y AAS1); iii) *Microcystis aeruginosa* MicArg por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina; y iv) cepas de bacterias y hongos de la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018, 2021), Cd. Obregón, México (*Bacillus cabrialesii* TE3T, *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, *Priestia megaterium* TRQ8, *Rhizopus* sp. 11, *Curvularia spicifera* 6, *Fusarium* sp. 20, *Nannochloropsis* sp. Los aislados de cianobacterias se cultivaron para obtener biomasa usando medio BG-11 (SIGMA) (Rippka *et al.*, 1981), caldo nutritivo (MCD LAB) para las cepas de *Bacillus* y *Priestia*, y caldo de dextrosa y papa (MCD LAB) para hongos; estos cultivos se incubaron a 28 °C durante 7, 2 y 5 días, respectivamente.

Extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de amplicones

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito por Raeder & Broda (1985). La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (MCD LAB) a 100 V durante 1 h, y la calidad se evaluó utilizando un NanoDrop 2000C. Los pares de primers para la amplificación del 16S ARNr de cianobacterias (CYAN738F: ATACCCWGTAGTCCTAGC; CYAN1281R: GCAATTACTAGCGATTCTCC) (Valério *et al.*, 2009), 16S ARNr de *Microcystis* (MICR 184F: GCCGCRAGGTGAAAMCTAA; MICR 431R: AATCCAAARACCTTCCTCCC) (Martins & Vasconcelos, 2011), y el gen *mcyA* (*mcyA*-Cd-1F: AAAATTTAAAGCCGTATCAAA; *mcyA*-Cd-1R: AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT) (Sabart *et al.*, 2015), se probaron como se menciona en las siguientes secciones a través de PCR de punto final (n = 3). Estas PCR se llevaron a cabo utilizando el kit PCR Master Mix 2X PCR (Promega) y el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 57 °C para 16S ARNr de cianobacterias y *mcyA*, y 54 °C para 16S ARNr de *Microcystis* durante 40 segundos, y elongación a 72 °C durante 30 segundos, y se realizó un paso final de elongación a 72 °C durante 5 minutos. El límite de detección de los cebadores evaluados se determinó como se describió anteriormente y utilizando 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 ng de ADN por reacción, correspondientes a 1.39, 1.39×10¹, 1.39×10², 1.39×10³, 1.39×10⁴, 1.39×10⁵, 1.39×10⁶ células de *Microcystis aeruginosa* MicArg/mL respectivamente. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 100 V durante 60 min.

Así, los amplicones del 16S ARNr de cianobacterias y del género *Microcystis*, así como del gen *mcyA* utilizados en este trabajo, fueron purificados mediante el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y posteriormente secuenciados mediante la tecnología Sanger (Langebio-Cinvestav, Irapuato, Guanajuato). Las secuencias obtenidas fueron: i) procesadas mediante FinchTV V1.4.0; ii) alineadas en CLC Sequence Viewer 8 para crear un árbol filogenético mediante el método de construcción Neighbor-Joining con 1,000 réplicas (solo 16S ARNr de cianobacterias); y iii) cargadas en la base de datos GenBank.

Detección de cianobacterias, *Microcystis* y el gen *mcyA* en una comunidad microbiana simulada

Se formuló una comunidad microbiana simulada utilizando todas las cepas de cianobacterias, bacterias y hongos mencionadas anteriormente (ver sección de cepas microbianas), en presencia y ausencia de *Microcystis aeruginosa* MicArg, realizando PCR punto final utilizando los primers evaluados con 30 ng de ADN por cada aislado por reacción bajo las condiciones de amplificación mencionadas anteriormente. Los amplicones se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 100 V durante 60 min.

Resultados y Discusión

Extracción y evaluación de ADN

La electroforesis del ADN extraído mostró una banda de ADN genómico intacto, como se observa en la parte superior de los carriles en la Figura 1. Los resultados de la espectrofotometría de microvolúmenes mostraron valores de 22.5-402.5 ng/μL, 1.50-2.22 (260/280) y 1.68-2.29 (260/230), concentraciones adecuadas para las siguientes evaluaciones (Kadri, 2020; Lucena-Aguilar *et al.*, 2016).

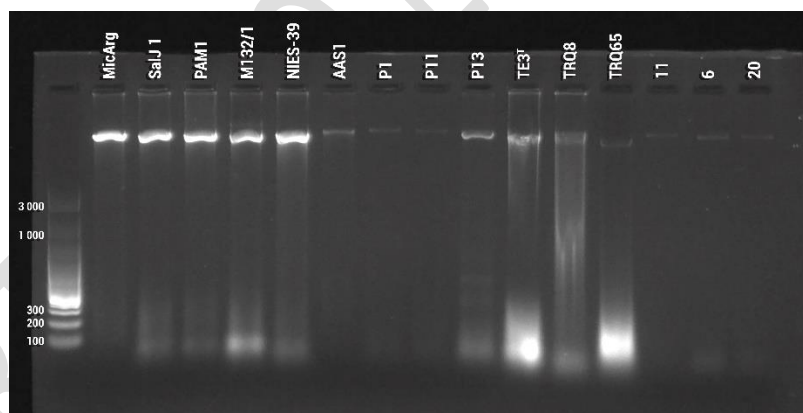


Figura 1. Extracción de ADN de las cepas estudiadas. Fuente: elaboración propia.

Determinación del límite de detección

Los límites de detección del gen 16S ARNr de cianobacterias y *Microcystis* se determinaron a partir de 1 ng por reacción, lo que corresponde a 1.39×10^3 células de *Microcystis aeruginosa* MicArg/mL (Figura 2). Esta detección se encuentra en 1 orden de magnitud por debajo del límite inferior de alerta para efectos sobre la salud publicado por la Environmental Protection Agency (EPA) (2024), o considerando un biovolumen equivalente a 0.099 mm^3 de *Microcystis aeruginosa* MicArg/L (Reynolds *et al.*, 1981), 40 veces por debajo del nivel de vigilancia fijado en 4 mm^3 de cianobacterias/L publicado por la World Health Organization (WHO) (2021). La detección del gen *mcyA* fue posible a partir de

10 ng por reacción. Este enfoque permite detectar cianobacterias y *Microcystis* en concentraciones diez veces inferiores a las consideradas de riesgo y monitorear la presencia del gen *mcyA*.

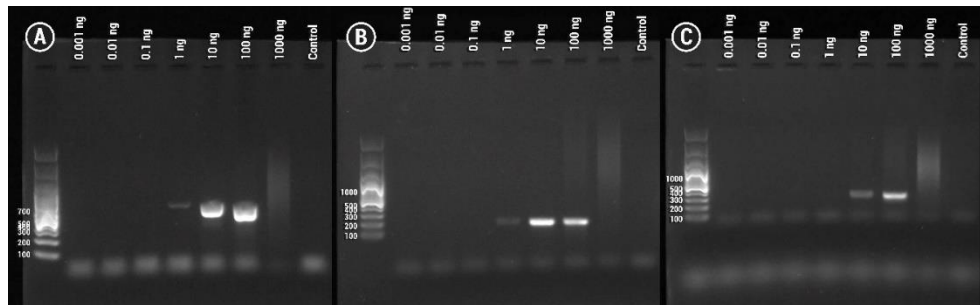


Figura 2. Límite de detección de los genes (A) 16S ARNr de cianobacterias, (B) 16S ARNr de *Microcystis*, y (C) *mcyA*, utilizando ADN de *Microcystis aeruginosa* MicArg y sus respectivos controles sin ADN. Fuente: elaboración propia.

Secuenciación del 16S ARNr y del gen *mcyA* de cepas de cianobacterias

La amplificación de los genes estudiados mostró amplicones con los tamaños de banda esperados (Figura 3), mostrando amplicones del 16S ARNr de cianobacterias de ~550 pb (Valério *et al.*, 2009), 16S ARNr de *Microcystis* de ~220 pb (Martins & Vasconcelos, 2011) y del gen *mcyA* de ~290 pb (Sabart *et al.*, 2015). Así mismo, las secuencias obtenidas posterior a la purificación y secuenciación de los amplicones se utilizaron para realizar el árbol filogenético (Figura 4), y para realizar búsquedas en BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) (Tabla 1).

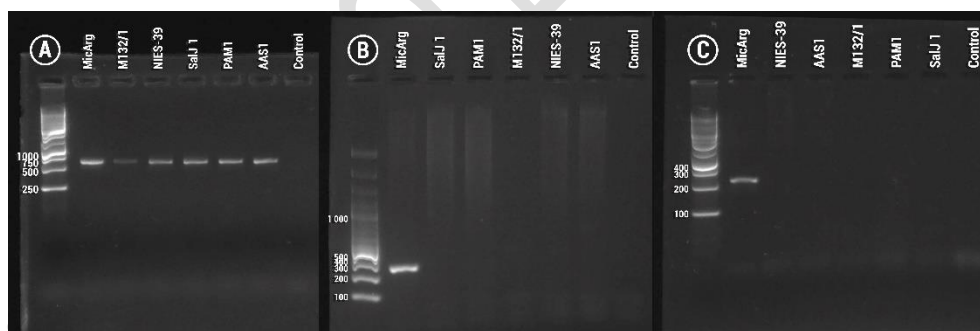


Figura 3. Amplificación de los genes: (A) 16S ARNr de cianobacterias, (B) 16S ARNr de *Microcystis*, y (C) *mcyA*, con ADN de aislados de cianobacterias, y sus respectivos controles sin ADN. Fuente: elaboración propia.

El control positivo, la cepa MicArg, se identificó con precisión como *Microcystis aeruginosa* mediante análisis filogenético y búsquedas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La clasificación taxonómica de estos organismos se puede lograr analizando las regiones hipervariables del gen 16S ARNr. Estas regiones, que contienen secuencias tanto conservadas como hipervariables, las cuales permiten la diferenciación de relaciones filogenéticas y la asignación de grupos taxonómicos (Shahi *et al.*, 2017; Valério *et al.*, 2009). Aunque la secuenciación de un gen conservado es un buen enfoque para la afiliación de un microorganismo,

la taxonomía polifásica es necesaria para proporcionar más información sobre el aislado y permitir que esta tarea se realice con precisión (Morales-Sandoval *et al.*, 2021).

La amplificación del gen 16S ARNr de *Microcystis* se obtuvo solo con el ADN de *Microcystis aeruginosa* MicArg y no con el resto de las cianobacterias (Figura 3); este resultado se alinea con la clasificación taxonómica previa y confirma la precisión de este enfoque (Martins & Vasconcelos, 2011).

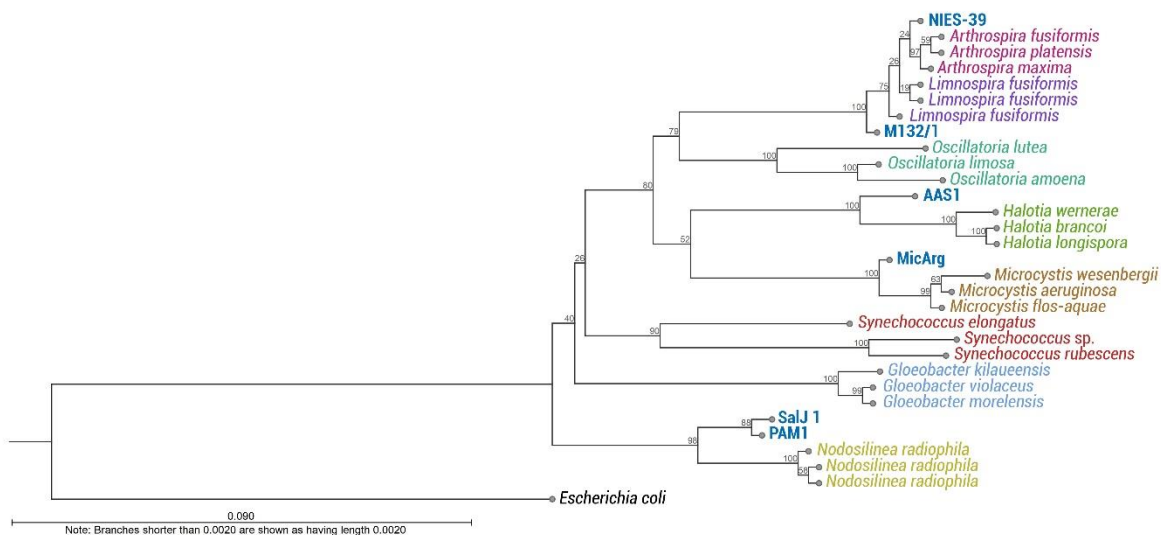


Figura 4. Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining con 1,000 réplicas, utilizando la secuencia amplificada del gen 16S ARNr con primers específicos para cianobacterias. Fuente: elaboración propia.

Tabla 1. Identificación de secuencias de ARNr 16S y mcyA en BLAST®.

Gen	Cepa	Afiliación	Cobertura (%)	Similitud (%)	Numero de accesoión
16S ARNr Cianobacterias	M132/1	<i>Limnospira</i> sp.	99	98.44	PQ308697
	NIES-39	<i>Arthrospira</i> sp.	99	99.81	PQ308696
	AAS1	<i>Halotia</i> sp.	100	97.34	PQ285593
	SalJ 1	<i>Nodosilinea</i> sp.	100	97.13	PQ301223
	PAM1	<i>Nodosilinea</i> sp.	99	96.83	PQ301224
	MicArg	<i>Microcystis aeruginosa</i>	100	100.00	PQ276908
16S ARNr <i>Microcystis</i>	MicArg	<i>Microcystis aeruginosa</i>	99	100.00	PQ276909
<i>mcyA</i>	MicArg	<i>Microcystis aeruginosa</i> peptide synthetase (<i>mcyA</i>) gene	100	99.33	PQ303791

Fuente: elaboración propia.

Además, las características morfológicas observadas al microscopio (Figura 5) fortalecen la afiliación taxonómica mediante técnicas moleculares, observándose las morfologías distintivas de: i) *Limnospira* (M132/1) formando tricomas de ancho uniforme, protoplasma granular, aerótopos facultativos (no observados) y ancho de 6-8 μm (Santos *et al.*, 2023); ii) *Arthrospira* (NIES-39) siendo filamentososa, cilíndrica y formando tricomas de 3-12 μm de ancho por 50-500 μm de largo (Wan *et al.*, 2016); iii) *Halotia* (AAS1) forma tricomas con células especialmente esféricas o hemisféricas (Genuário *et al.*, 2015); iv) *Nodosilinea* (SaJ 1 y PAM1) con extremos redondeados, no ramificada, formadora de tricomas y con vainas de aspecto difuso (Perkerson III *et al.*, 2011); y iv) *Microcystis aeruginosa* (MicArg) esférica, formadora de colonias y aglomerada (Radkova *et al.*, 2020).

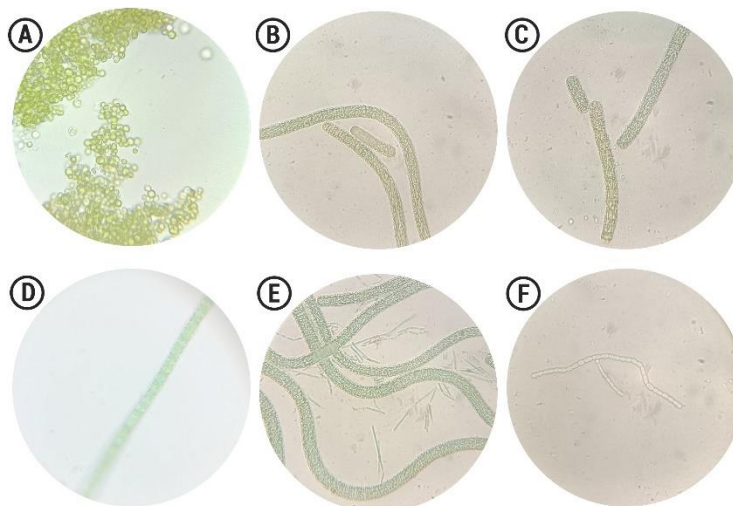


Figura 5. Observación microscópica de la morfología de: (A) *Microcystis aeruginosa* MicArg, (B) *Arthrospira* sp. NIES-39, (C) *Limnospira* sp. M132/1, (D) *Nodosilinea* sp. SaJ 1, (E) *Nodosilinea* sp. PAM1 y (F) *Halotia* sp. AAS1. Fuente: elaboración propia.

Teniendo en cuenta la afiliación taxonómica anterior y la capacidad conocida de solo ciertos géneros de cianobacterias (*Microcystis*, *Anabaena* ahora *Dolichospermum* o *Sphaerospermopsis*, *Oscillatoria* ahora *Planktothrix*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaenopsis*, *Aphanocapsa*, *Aphanizomenon* y *Hapalosiphon*) para producir MCs (Beasley, 2020; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2014), la detección del gen *mcyA* confirma la presencia de un organismo potencial productor de MCs y verifica que no hay falsos positivos. La detección de este gen constituye un paso crucial para predecir la producción de MC en una muestra, esto debido a que el gen *mcyA* codifica para la producción de una Sintetasa de Péptidos No Ribosomales (NRPS), que junto con las enzimas producidas por los genes *mcyA-E* y *mcyG* participan en 45 de las 48 reacciones para dar lugar a la formación de MCs (Omidi *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2021). Además, se ha reportado que las cepas no toxigénicas pierden principalmente este gen, inhibiendo la producción de MCs (Chen *et al.*, 2021).

Detección de cianobacterias, *Microcystis* y el gen *mcyA* en una comunidad microbiana simulada

Al amplificar los genes estudiados utilizando ADN de una comunidad microbiana simulada, fue posible identificar a *Microcystis aeruginosa* MicArg y el gen *mcyA* sólo cuando este organismo estaba en la muestra (Figura 6).

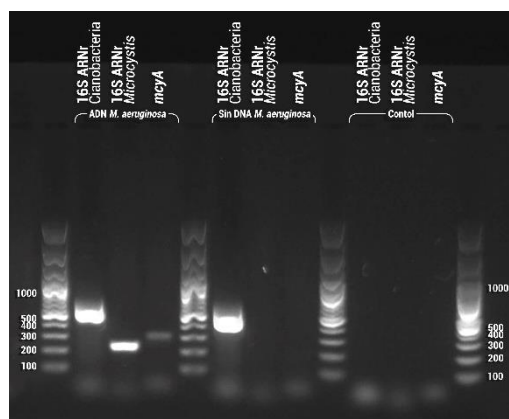


Figura 6. Amplificación de 16S ARNr de cianobacterias y *Microcystis*, y el gen *mcyA* utilizando ADN de una comunidad microbiana simulada y sus respectivos controles sin ADN. Fuente: elaboración propia.

La detección de *Microcystis aeruginosa* MicArg y del gen *mcyA* en una comunidad microbiana simulada, y la extrapolación de resultados similares esperados en muestras ambientales, sugiere que existe un riesgo de producción de MCs. Como lo demostraron Singh *et al.* (2015), con una correlación entre la detección del gen *mcyA* y la concentración de MCs en muestras de agua; además, la presencia de genes *mcyA* se alinea con la detección de cianobacterias mediante el análisis del gen 16S ARNr. En apoyo de esta idea, estudios posteriores mostraron una correlación positiva entre el número de copias del gen *mcyA* y la concentración de MCs en el agua (Dong *et al.*, 2016), y la investigación de Hu *et al.* (2016) determinó cómo la concentración de MCs en el agua aumenta a medida que aumentan las copias del gen *mcyA* a lo largo de un año. Esto muestra una tendencia en la que la presencia de *Microcystis* y el gen *mcyA* está relacionada con la producción de MCs en muestras de agua, alineándose con posibles escenarios ambientales.

Además, Ngwa *et al.* (2014) demuestran la eficacia de los métodos basados en PCR punto final para detectar genotipos de *Microcystis* productores de MCs. Aplicaron tres ensayos de PCR independientes dirigidos a los genes *mcyA*, *E* y *G* para detectar y cuantificar de manera rápida y confiable genotipos de *Microcystis* potencialmente tóxicos en el agua. De manera similar, Valério *et al.*, (2010) desarrollaron un método de PCR multiplex que amplifica simultáneamente múltiples fragmentos del gen *mcy*. Su método logró una alta sensibilidad y especificidad para identificar cianobacterias productoras de MCs, independientemente de sus taxones. Este enfoque, validado tanto con aislamientos como con muestras ambientales, respalda aún más la utilidad de los métodos basados en PCR para evaluar el potencial toxigénico de las cianobacterias en los sistemas hídricos.

Las MCs, las toxinas de cianobacterias más extendidas mundialmente, suponen una grave amenaza para la salud humana y afectan a organismos que van desde las microalgas hasta mamíferos (De Figueiredo *et al.*, 2004). Los seres humanos pueden estar expuestos a MCs a través del agua contaminada, alimentos, suplementos de algas, inhalación, contacto con la piel y hemodiálisis (Massey *et al.*, 2018). Una vez en el torrente sanguíneo, las MCs se dirigen principalmente al hígado, pero también afectan al cerebro, riñones, pulmones, corazón y el sistema reproductivo (Massey *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2021). Por lo tanto, la identificación de los genes responsables de la biosíntesis de la MCs mediante métodos moleculares es esencial para controlar la producción de toxinas y cianobacterias dañinas (Saker *et al.*, 2007). Para reducir los riesgos a la salud, las empresas de suministro de agua deben desarrollar métodos de detección sensibles y fiables en varios tipos de muestras (Kaushik & Balasubramanian, 2013). La PCR ofrece un enfoque para detectar cianobacterias tóxicas directamente de muestras ambientales, con su alta sensibilidad que permite la detección temprana de especies productoras de toxinas antes de que alcancen

concentraciones dañinas, mejorando así el monitoreo de floraciones de cianobacterias tóxicas (De Figueiredo *et al.*, 2004; Saker *et al.*, 2007).

Conclusión

La PCR de punto final con primers específicos permite detectar cianobacterias, el género *Microcystis*, y su capacidad genética para la producción de MCs. Esto confirma el valor de la PCR para la detección específica de cianobacterias nocivas y explora su aplicación en muestras ambientales.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, SdISV, RAR, MPH.; desarrollo de la metodología, RACL, MJOF.; gestión del software, RACL.; validación experimental, RACL, MJOF.; análisis de resultados, RACL, MJOF, SdISV.; gestión de datos, RACL, SdISV.; redacción y preparación del manuscrito, RACL, MJOF, SdISV.; redacción, revisión y edición, RACL, MJOF, SdISV, RAR, MPH.; administrador del proyecto, SdISV.; adquisición de fondos, SdISV. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) a través del proyecto Evaluación de la contaminación ambiental orgánica e inorgánica en ambientes acuáticos y su impacto en el riesgo de cianobacterias productoras de cianotoxinas (ARCAL CLXXVIII) y RACL fue financiada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) para una maestría (beca número: 1221581).

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano por su dedicación y compromiso con el desarrollo de todos los proyectos de investigación, así como al OIEA y al CONAHCYT por los recursos financieros otorgados, y a la Dra. Mónica Cristina Rodríguez-Palacio, Dirección de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, por proporcionar cepas de cianobacterias.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Beasley, V. R. (2020). Harmful Algal Blooms (Phycotoxins). In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11275-8>
- Beversdorf, L. J., Chaston, S. D., Miller, T. R., & McMahon, K. D. (2015). Microcystin *mcyA* and *mcyE* Gene Abundances Are Not Appropriate Indicators of Microcystin Concentrations in Lakes. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0125353>
- Bittencourt-Oliveira, M. do C., Piccin-Santos, V., Moura, A. N., Aragão-Tavares, N. K. C., & Cordeiro-Araújo, M. K. (2014). Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 86(1), 297–310. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201302512>
- Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(2). <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2>
- Campos, A., Redouane, E. M., Freitas, M., Amaral, S., Azevedo, T., Loss, L., Máthé, C., Mohamed, Z. A., Oudra, B., & Vasconcelos, V. (2021). Impacts of Microcystins on Morphological and Physiological Parameters of Agricultural Plants: A Review. *Plants*, 10(4), 639. <https://doi.org/10.3390/plants10040639>

- Chen, M., Xu, C., Wang, X., Wu, Y., & Li, L. (2021). Nonribosomal peptide synthetases and nonribosomal cyanopeptides synthesis in *Microcystis*: A comparative genomics study. *Algal Research*, 59, 102432. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102432>
- Chorus, I., Fastner, J., & Welker, M. (2021). Cyanobacteria and Cyanotoxins in a Changing Environment: Concepts, Controversies, Challenges. *Water* 2021, 13(18), 2463. <https://doi.org/10.3390/W13182463>
- Codd, G. A., Testai, E., Funari, E., & Svirčev, Z. (2020). Cyanobacteria, Cyanotoxins, and Human Health. In *Water Treatment for Purification from Cyanobacteria and Cyanotoxins*, (pp. 37–68). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118928677.ch2>
- De Figueiredo, D. R., Azeiteiro, U. M., Esteves, S. M., Gonçalves, F. J. M., & Pereira, M. J. (2004). Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 151–163. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2004.04.006>
- de los Santos-Villalobos, S., Díaz-Rodríguez, A. M., Ávila-Mascareño, M. F., Martínez-Vidales, A. D., & Parra-Cota, F. I. (2021). COLMENA: A Culture Collection of Native Microorganisms for Harnessing the Agro-Biotechnological Potential in Soils and Contributing to Food Security. *Diversity*, 13(8), 337. <https://doi.org/10.3390/d13080337>
- de los Santos-Villalobos, S., Parra Cota, F. I., Herrera Sepúlveda, A., Valenzuela Aragón, B., & Estrada Mora, J. C. (2018). Colmena: colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos, para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(1), 191–202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- Dong, X., Zeng, S., Bai, F., Li, D., & He, M. (2016). Extracellular microcystin prediction based on toxigenic *Microcystis* detection in a eutrophic lake. *Scientific Reports*, 6(1), 20886. <https://doi.org/10.1038/srep20886>
- Environmental Protection Agency [EPA]. (2024, July 22). *World Health Organization (WHO) 1999 Guideline Values for Cyanobacteria in Freshwater*. <https://www.epa.gov/habs/world-health-organization-who-1999-guideline-values-cyanobacteria-freshwater>
- Farrer, D., Counter, M., Hillwig, R., & Cude, C. (2015). Health-based cyanotoxin guideline values allow for cyanotoxin-based monitoring and efficient public health response to cyanobacterial blooms. *Toxins*, 7(2), 457–477. <https://doi.org/10.3390/toxins7020457>
- Genuário, D. B., Vaz, M. G. M. V., Hentschke, G. S., Sant'Anna, C. L., & Fiore, M. F. (2015). Halotia gen. nov., a phylogenetically and physiologically coherent cyanobacterial genus isolated from marine coastal environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2), 663–675. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070078-0>
- Hu, C., Rea, C., Yu, Z., & Lee, J. (2016). Relative importance of *Microcystis* abundance and diversity in determining microcystin dynamics in Lake Erie coastal wetland and downstream beach water. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 138–151. <https://doi.org/10.1111/jam.12983>
- Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>
- Kaushik, R., & Balasubramanian, R. (2013). Methods and Approaches Used for Detection of Cyanotoxins in Environmental Samples: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(13), 1349–1383. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.644224>
- Lad, A., Breidenbach, J. D., Su, R. C., Murray, J., Kuang, R., Mascarenhas, A., Najjar, J., Patel, S., Hegde, P., Youssef, M., Breuler, J., Kleinhenz, A. L., Ault, A. P., Westrick, J. A., Modyanov, N. N., Kennedy, D. J., & Haller, S. T. (2022). As We Drink and Breathe: Adverse Health Effects of Microcystins and Other Harmful Algal Bloom Toxins in the Liver, Gut, Lungs and Beyond. *Life*, 12(3), 418. <https://doi.org/10.3390/life12030418>
- Lee, J., Choi, J., Fatka, M., Swanner, E., Ikuma, K., Liang, X., Leung, T., & Howe, A. (2020). Improved detection of mcyA genes and their phylogenetic origins in harmful algal blooms. *Water Research*, 176, 115730. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2020.115730>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Martins, A., & Vasconcelos, V. (2011). Use of qPCR for the study of hepatotoxic cyanobacteria population dynamics. *Archives of Microbiology*, 193(9), 615–627. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0724-7>
- Massey, I. Y., Yang, F., Ding, Z., Yang, S., Guo, J., Tezi, C., Al-Osman, M., Kamegni, R. B., & Zeng, W. (2018). Exposure routes and health effects of microcystins on animals and humans: A mini-review. *Toxicol*, 151, 156–162. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2018.07.010>
- Meriluoto, J., Spoof, L., & Codd, G. A. (2016). *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* (J. Meriluoto, L. Spoof, & G. A. Codd, Eds.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119068761>
- Morales-Sandoval, P. H., Valenzuela-Ruiz, V., Ortega-Urquieta, M. E., Martínez-Vidales, A. D., Félix-Pablos, C. M., Chávez-Luzania, R. A., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2021). Taxonomía bacteriana basada en índices relacionados al genoma completo. *La Sociedad Académica*, 58, 39–51.
- Ngwa, F., Madramootoo, C., & Jabaji, S. (2014). Monitoring toxigenic *Microcystis* strains in the Missisquoi bay, Quebec, by PCR targeting multiple toxic gene loci. *Environmental Toxicology*, 29(4), 440–451. <https://doi.org/10.1002/tox.21770>
- Omidi, A., Esterhuizen-Londt, M., & Pflugmacher, S. (2018). Still challenging: the ecological function of the cyanobacterial toxin microcystin—What we know so far. *Toxin Reviews*, 37(2), 87–105. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1326059>
- Perkerson III, R. B., Johansen, J. R., Kováčik, L., Brand, J., Kaštvoský, J., & Casamatta, D. A. (2011). A unique pseudanabaenalean (cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology*, 47(6), 1397–1412. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01077.x>
- Radkova, M., Stefanova, K., Uzunov, B., Gärtner, G., & Stoyneva-Gärtner, M. (2020). Morphological and Molecular Identification of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Nine Shallow Bulgarian Water Bodies. *Toxins*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.3390/toxins12010039>

- Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1), 17–20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Ren, X., Wang, Y., Zhang, K., Ding, Y., Zhang, W., Wu, M., Xiao, B., & Gu, P. (2023). Transmission of Microcystins in Natural Systems and Resource Processes: A Review of Potential Risks to Humans Health. *Toxins*, 15(7), 448. <https://doi.org/10.3390/toxins15070448>
- Reynolds, C., Jaworski, G., Cmiech, H., & Leedale, G. (1981). On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 293(1068), 419–477. <https://doi.org/10.1098/rstb.1981.0081>
- Rinehart, K. L., Namikoshi, M., & Choi, B. W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 159–176. <https://doi.org/10.1007/BF02186070>
- Rippka, R., Waterbury, J. B., & Stanier, R. Y. (1981). Isolation and Purification of Cyanobacteria: Some General Principles. *The Prokaryotes*, 212–220. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_8
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B. L., Buikema, W., Hasekorn, R., & Sivonen, K. (2004). Genes Coding for Hepatotoxic Heptapeptides (Microcystins) in the Cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 686. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.686-692.2004>
- Sabart, M., Crenn, K., Perrière, F., Abila, A., Lereboure, M., Colombet, J., Jousse, C., & Latour, D. (2015). Co-occurrence of microcystin and anatoxin-a in the freshwater lake Aydat (France): Analytical and molecular approaches during a three-year survey. *Harmful Algae*, 48, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.06.007>
- Saker, M. L., Vale, M., Kramer, D., & Vasconcelos, V. M. (2007). Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2), 441–449. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0813-8>
- Santos, K. R. de S., Hentschke, G. S., Ferrari, G., Andreote, A. P. D., Fiore, M. de F., Vasconcelos, V., & Sant'Anna, C. L. (2023). Molecular, morphological and ecological studies of *Limnospira platensis* (Cyanobacteria), from saline and alkaline lakes, Pantanal Biome, Brazil. *Frontiers in Environmental Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1204787>
- Shahi, S. K., Freedman, S. N., & Mangalam, A. K. (2017). Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. *Gut Microbes*, 8(6), 607–615. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1349041>
- Shi, L., Du, X., Liu, H., Chen, X., Ma, Y., Wang, R., Tian, Z., Zhang, S., Guo, H., & Zhang, H. (2021). Update on the adverse effects of microcystins on the liver. *Environmental Research*, 195, 110890. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110890>
- Singh, S., Rai, P. K., Chau, R., Ravi, A. K., Neilan, B. A., & Asthana, R. K. (2015). Temporal variations in microcystin-producing cells and microcystin concentrations in two fresh water ponds. *Water Research*, 69, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.015>
- Thawabteh, A. M., Naseef, H. A., Karaman, D., Bufo, S. A., Scranio, L., & Karaman, R. (2023). Understanding the Risks of Diffusion of Cyanobacteria Toxins in Rivers, Lakes, and Potable Water. *Toxins* 2023, 15(9), 582. <https://doi.org/10.3390/TOXINS15090582>
- Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., & Tenreiro, R. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology*, 155(2), 642–656. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022848-0>
- Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., & Tenreiro, R. (2010). Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples. *Environmental Toxicology*, 25(3), 251–260. <https://doi.org/10.1002/tox.20502>
- Wan, D., Wu, Q., & Kuča, K. (2016). Spirulina. In *Nutraceuticals* (pp. 569–583). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00042-5>
- Watanabe, M. F., Harada, K., Carmichael, W. W., & Fujiki, H. (1996). Toxic *Microcystis* (pp. 103–105). CRC Press. https://books.google.com/books/about/Toxic_Microcystis.html?hl=es&id=u8giz-ptTCYC
- World Health Organization [WHO]. (2021). *Guidelines on recreational water quality. Volume 1, Coastal and fresh waters*. World Health Organization.
- Zhou, C., Chen, H., Zhao, H., & Wang, Q. (2021). Microcystin biosynthesis and toxic effects. *Algal Research*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102277>
- Zurawell, R. W., Chen, H., Burke, J. M., & Prepas, E. E. (2005). Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Biological Importance of Microcystins in Freshwater Environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 8(1), 1–37. <https://doi.org/10.1080/10937400590889412>