

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 517**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2006 E 06741147 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1888766**

54 Título: **Detección de cianobacterias hepatotóxicas**

30 Prioridad:

**31.05.2005 AU 2005902805**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.05.2013**

73 Titular/es:

**NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED  
(100.0%)**

**Rupert Myers Building Gate, Gate 14, Barker  
Street  
SYDNEY, NSW 2052, AU**

72 Inventor/es:

**NEILAN, BRETT, A y  
JUNGBULT, ANNE, DOROTHEE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 404 517 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Detección de cianobacterias hepatotóxicas.

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a métodos y kits para la detección de cianobacterias tóxicas, en particular de cianobacterias que producen hepatotoxinas.

**Antecedentes de la invención**

10 Las cianobacterias, también conocidas como algas verde-azuladas, son bacterias fotosintéticas ampliamente distribuidas a nivel mundial en entornos de agua salada y dulce. Las cianobacterias que producen compuestos tóxicos son especialmente importantes para la calidad del agua y para la salud humana y animal. Una diversa gama de géneros de cianobacterias son conocidos por formar florecimientos de algas verde-azuladas tóxicos sobre superficies de agua (véase, por ejemplo, Codd *et al.*, 1999; Carmichael, 2001). Muchos de estos florecimientos son perjudiciales para los seres humanos y los animales debido a que los organismos que forman el florecimiento producen hepatotoxinas y neurotoxinas, y a la capacidad de los florecimientos para crecer y expandirse en aguas costeras, arroyos, lagos y en el agua potable y depósitos de agua recreativos.

15 Son necesarios métodos rápidos para la detección precisa de cianobacterias tóxicas para permitir una evaluación del riesgo sanitario potencial de la formación de florecimientos de cianobacterias y para permitir la aplicación de estrategias de gestión del agua eficaces para minimizar los efectos de los brotes de florecimientos tóxicos.

20 Dos hepatotoxinas particularmente problemáticas son la microcistina y la nodularina. Ambas toxinas son inhibidoras de las proteínas de tipo eucariota fosfatasa 1 y 2A y, en vertebrados, la toxicidad está mediada por el transporte de las toxinas hacia el interior de los hepatocitos. La exposición aguda a cualquiera de las toxinas puede conducir a una insuficiencia hepática y la muerte en animales, incluyendo seres humanos. Además, la exposición subcrónica a la microcistina y la nodularina se asocia con la estimulación de tumores y, en el caso de la nodularina, al inicio de tumores (Hitzfeld *et al.*, 2000).

25 La microcistina y la nodularina son péptidos cíclicos sintetizados de forma no ribosómica por grandes complejos multienzimáticos que consisten en diferentes módulos que incluyen sintetetas peptídicas no ribosómicas (NRPS) y poliquetida sintetas (PKS) (Tillett *et al.*, 2000; Moffitt y Neilan, 2001). Estos módulos catalizan la activación, la modificación y la condensación de aminoácidos específicos. Las microcistinas forman una gran familia de heptapéptidos cíclicos con la fórmula general ciclo-(D-alanina-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-glutamato-Mdha), en la que D-MeAsp es ácido D-β-eritrometilaspártico, Mdha es N-metil-deshidroalanina, y X y Z son L-aminoácidos variables. La nodularina es un pentapéptido cíclico con la fórmula general ciclo-(D-MeAsp-L-arginina-Adda-D-glutamato-Mdha), en la que Mdha es ácido 2-(metilamino)-2-deshidrobutírico. El resto más poco común de la microcistina y la nodularina es Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,3,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienoico).

30 Las especies que producen microcistina normalmente producen un cóctel de diferentes variantes de microcistina, aunque sólo un tipo será sintetizado de modo predominante (Mikalsen *et al.*, 2001). Sólo se han identificado unos pocos variantes de la nodularina hasta ahora.

35 Hasta la fecha han aparecido informes acerca de la producción de microcistina por especies de cianobacterias de los cuatro órdenes Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales, y Stigonematales, que incluyen *Microcystis* sp., *Chroococcus dispersus* (Chroococcales), *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Anabaenopsis* sp. (Nostocales), *Hapalosiphon*, *Phormidium* sp., *Planktothrix* sp., y *Oscillatoria* sp. Sin embargo, sólo se han indicado genes para la producción de nodularina en *N. spumigena* y en una cepa de *N. harveyana* (Moffitt y Neilan, 2001).

40 Debido a esta amplia distribución de producción de hepatotoxinas y diferencias en la secuencia de los géneros de cianobacterias, no existen protocolos moleculares fiables que permitan la detección de todas las especies de cianobacterias que potencialmente producen hepatotoxinas. La mayoría de los métodos de detección basados en la PCR sólo se basan en la amplificación de las secuencias de los genes de la microcistina o nodularina sintetasa procedentes de un género o de una especie (por ejemplo, Neilan, 1996; Moffitt *et al.*, 2001; Tillett *et al.*, 2000; Christiansen *et al.*, 2003; Vaitomaa *et al.*, 2003; Kurmayer *et al.*, 2003, 2004). Los protocolos basados en más de un conjunto de datos sólo se dirigen a las especies formadoras de florecimientos que producen microcistina más comunes *Microcystis*, *Planktothrix*, y *Anabaena* (Hisbergues *et al.*, 2003). La detección molecular de otras especies productoras de microcistina, tales como *Anabaenopsis*, *Phormidium*, y *Nostoc*, no se ha tratado previamente.

45 El documento WO 2004/104211 describe un método para detectar cianobacterias tóxicas mediante la detección de una región del gen *mcyE*, preferiblemente la región responsable de añadir Adda y D-glutamato al producto inmaduro de la síntesis de microcistina.

Ouahid *et al.* (2005), Environ. Toxicol.m, 20(3):235-242, describen un método para detectar cianobacterias que producen microcistina que comprende amplificar un segmento del gen *mcyE*.

Por consiguiente, claramente es necesario el desarrollo de un sistema de detección sencillo para la identificación de múltiples especies y géneros de cianobacterias productoras de hepatotoxinas.

Los presentes inventores ahora han desarrollado un método molecular que permite la detección de todas las especies conocidas potencialmente productoras de microcistina y nodularina con una única reacción de PCR.

## 5 Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la detección de cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) obtener una muestra de cianobacterias; y

10 (b) analizar la muestra para detectar la presencia de secuencias del dominio de aminotransferasa (AMT) asociadas a hepatotoxinas,

en el que dicho dominio AMT está localizado dentro de los marcos de lectura abiertos de *mcyE* y *ndaF*, y la presencia de secuencias del dominio AMT de la aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas es indicativa de dichas cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina.

15 Las secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas pueden proceder del marco de lectura abierto de *mcyE* del complejo de genes de la microcistina sintetasa o de uno de sus ortólogos u homólogos y/o del marco de lectura abierto de *ndaF* del complejo de genes de la nodularina sintetasa o de uno de sus ortólogos u homólogos.

La etapa de análisis (b) puede comprender:

(i) la amplificación de ADN a partir de la muestra utilizando cebadores adecuados; y

20 (ii) la detección de secuencias amplificadas.

Los cebadores pueden ser cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en cualquiera de SEQ ID NO:1 a 4. En una realización, la amplificación puede realizarse utilizando la pareja de cebadores que comprende las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 2. En una realización, la amplificación puede realizarse utilizando la pareja de cebadores que comprende las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 4. En una realización, la amplificación puede realizarse utilizando la pareja de cebadores que comprende las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:3 y 4.

La detección de las secuencias amplificadas puede comprender una electroforesis en gel y/o una secuenciación de ácidos nucleicos.

30 La muestra de cianobacterias puede comprender uno o más organismos cianobacterianos aislados o cultivados, o puede ser una muestra extraída del entorno que contenga uno o más organismos cianobacterianos. La muestra extraída del entorno puede proceder de agua salada o de agua dulce. La muestra extraída del entorno puede ser una muestra de agua o una muestra de un florecimiento de algas verde-azuladas.

La descripción también se refiere a un método para la detección de cianobacterias productoras de hepatotoxinas, comprendiendo dicho método las etapas de:

35 (a) obtener una muestra de cianobacterias; y

(b) analizar la muestra para detectar la presencia de secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas,

en el que la presencia de secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas es indicativa de cianobacterias productoras de hepatotoxinas.

40 La hepatotoxina puede ser microcistina o nodularina.

Las secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas pueden proceder del marco de lectura abierto de *mcyE* del complejo de genes de la microcistina sintetasa o de uno de sus ortólogos u homólogos y/o del marco de lectura abierto de *ndaF* del complejo de genes de la nodularina sintetasa o de uno de sus ortólogos u homólogos.

45 La etapa de análisis (b) puede comprender:

(i) la amplificación de ADN a partir de la muestra utilizando cebadores adecuados; y

(ii) la detección de secuencias amplificadas.

Los cebadores pueden ser cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en cualquiera de SEQ ID NO:1 a 4. En una realización, la amplificación puede realizarse utilizando la pareja de cebadores que comprende las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 2. En una realización, la amplificación puede realizarse utilizando la pareja de cebadores que comprende las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 4. En una realización, la amplificación puede realizarse utilizando la pareja de cebadores que comprende las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:3 y 4.

La detección de las secuencias amplificadas puede comprender una electroforesis en gel y/o una secuenciación de ácidos nucleicos.

La muestra de cianobacterias puede comprender uno o más organismos cianobacterianos aislados o cultivados, o puede ser una muestra extraída del entorno que contenga uno o más organismos cianobacterianos. La muestra extraída del entorno puede ser una muestra de agua o una muestra de un florecimiento de algas verde-azuladas.

Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para la detección de cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina, comprendiendo dicho kit una pareja de cebadores diseñados para la amplificación mediante PCR de secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas en los genes *ndaF* y *mcyE*.

Los cebadores pueden ser cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 a 4. Los cebadores oligonucleotídicos pueden comprender las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 2. Los cebadores oligonucleotídicos pueden comprender las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 4. Los cebadores oligonucleotídicos pueden comprender las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:3 y 4.

Esta descripción también se refiere a un kit para la detección de cianobacterias productoras de heptatoxinas, comprendiendo dicho kit al menos un cebador diseñado para detectar secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas.

El kit puede comprender múltiples cebadores diseñados para amplificar las secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas. Los cebadores pueden ser cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 a 4. Los cebadores oligonucleotídicos pueden comprender las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 2. Los cebadores oligonucleotídicos pueden comprender las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 4. Los cebadores oligonucleotídicos pueden comprender las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:3 y 4.

### 30 Definiciones

La expresión “secuencia del dominio de aminotransferasa asociada a hepatotoxina”, tal como se emplea en la presente, significa una secuencia de nucleótidos que codifica una actividad aminotransferasa que actúa para la adición de un grupo amino a un péptido cíclico de hepatotoxina. Generalmente, la secuencia del dominio de aminotransferasa es parte de un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un complejo multienzimático que actúa para la producción de la hepatotoxina, estando el ORF físicamente localizado dentro del agrupamiento de genes biosintéticos de la hepatotoxina, como en el caso del ORF de *mcyE* del complejo de genes de la microcistina sintetasa, y del ORF de *ndaF* del complejo de genes de la nodularina sintetasa. Como alternativa, el dominio de aminotransferasa puede localizarse dentro de un gen distinto que codifique una enzima aminotransferasa.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término “comprende” significa “incluye principalmente, pero no necesariamente de forma única”. Además, las variaciones del término “comprende”, tales como “que comprende” y “comprendiendo” tienen significados que varían en la misma medida.

### Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirán realizaciones de la presente invención, sólo como ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos.

**Figura 1.** Alineamiento de los cebadores HEPF y HEPR con la región diana de la aminotransferasas a partir de la especie hepatotóxica caracterizada *Nodularia* NSOR10 (Moffitt y Neilan, 2004), *Anabaena* cepa 90 (Rouhiainen *et al.*, 2004), *M. aeruginosa* PCC7806 (Tillett *et al.*, 2000), *M. aeruginosa* K-139 (Nishizawa *et al.*, 1999), y *Plankothrix* NIVACYA126/8 (Christiansen *et al.*, 2003).

**Figura 2.** Posiciones relativas de los cebadores HEPF, HEPR, HEPF2 y HEPR2, y tamaños aproximados (pb) de los productos de la PCR.

**Figura 3.** Productos de la PCR que contienen el dominio AMT empleando los cebadores HEPF/HEPR de muestras de florecimientos de algas verde-azuladas separados mediante electroforesis en gel sobre un gel de agarosa al 2%: M: 1 kb + escalera-ADN. Carril 1: control positivo (*M. aeruginosa* PCC7806), carril 2: muestra del lago Spino (Italia), carril 3: muestra del lago Alexandria (Australia), carril 4: muestra del lago del John Oldman Park (Australia), carril 5:

muestra del río Swan (Australia).

**Figura 4.** Análisis filogenético del fragmento de la PCR de 472 pb que contiene el dominio AMT. La relación filogenética se construyó utilizando el método de Neighbor-Joining (método del vecino más próximo). Se muestran unos valores de inicialización mayores que 500 (después de 1000 acontecimientos de remuestreo de datos). La escala es de 0,05 mutaciones por posición de aminoácido. Las muestras de florecimiento se indican en negrita.

La secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico HEPF se indica en SEQ ID NO:1, y la secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico HEPR se indica en SEQ ID NO:2. La secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico HEPF2 se indica en SEQ ID NO:3. La secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico HEPR2 se indica en SEQ ID NO:4.

#### Mejor modo de realizar la invención

La invención se describirá a continuación con más detalle, incluyendo, sólo como ejemplo, la referencia a los siguientes ejemplos.

Tal como se describe en la presente, los presentes inventores han desarrollado una herramienta molecular que permite la identificación satisfactoria de especies de cianobacterias y florecimientos de algas verde-azuladas potencialmente hepatotóxicos. La herramienta reside en una única reacción de PCR basada en la presencia/ausencia de un dominio de aminotransferasa (AMT) dentro del agrupamiento de los genes de síntesis de hepatotoxina. El dominio AMT está localizado entre los módulos de poliquetida sintasa (PKS) y de péptido sintetasa no ribosómica (NRPS), dentro de los marcos de lectura abiertos de *mcyE* y *ndaF* de los complejos enzimáticos de microcistina y nodularina o sintetasa, respectivamente. AMP desempeña un papel clave en la biosíntesis de microcistinas y nodularinas en la transferencia de un grupo amino al resto Adda (Tillett *et al.*, 2000).

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la detección de cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) obtener una muestra de cianobacterias; y

(b) analizar la muestra para detectar la presencia de secuencias del dominio de aminotransferasa (AMT) asociadas a hepatotoxinas,

en el que dicho dominio AMT está localizado dentro de los marcos de lectura abiertos de *mcyE* y *ndaF*, y la presencia de secuencias del dominio AMT de la aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas es indicativa de dichas cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina.

La presente invención también proporciona kits para la detección de cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina, comprendiendo dichos kits un cebador diseñado para la amplificación mediante PCR de secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas en los genes *ndaF* y *mcyE*.

Tal como se ejemplifica en la presente, mediante la utilización del método según una realización de la invención se detectan con éxito cultivos de cianobacterias hepatotóxicas, así como florecimientos de algas verde-azuladas, de los órdenes Oscillatoriales, Chroococcales y Nostocales. Además, pueden determinarse los géneros de las cianobacterias hepatotóxicas identificadas mediante análisis de la secuencia debido a la congruencia entre especies y evolución del péptido de hepatotoxina en cianobacterias.

Los métodos y los kits de la presente invención proporcionan una herramienta valiosa para la detección de aislados de cianobacterias potencialmente tóxicas, por ejemplo, en muestras de agua salada o agua dulce, permitiendo con ello la evaluación del potencial para la formación de un florecimiento tóxico, la identificación de florecimientos tóxicos, o la evaluación del potencial tóxico y, por tanto, del peligro para la salud que representa un florecimiento de algas verde-azuladas. Por consiguiente, los métodos y los kits de la invención pueden formar parte de procedimientos de control de la calidad del agua rutinarios, o pueden utilizarse según se requiera en el caso de un brote de florecimiento de algas verde-azuladas, o en condiciones que se considera que puedan apoyar o conducir a dicho brote.

Los expertos en la técnica apreciarán que los métodos y los kits de la presente invención pueden utilizarse solos o junto con otros ensayos disponibles para identificar florecimientos y especies de cianobacterias tóxicas.

Los expertos en la técnica apreciarán que las cianobacterias relacionadas con la presente invención son cualquier cianobacteria potencialmente hepatotóxica, generalmente las que son capaces de producir microcistina o nodularina. Por ejemplo, las cianobacterias a las que puede aplicarse la presente invención pueden seleccionarse de los órdenes Chroococcales, Nostocales y Stigonematales. Por ejemplo, las cianobacterias pueden seleccionarse de los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, y *Nodularia*. Por ejemplo, las cianobacterias pueden seleccionarse de las especies *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Microcystis wesenbergii*, *Nodularia harveyana* y *Nodularia spumigena*. Por ejemplo, las cianobacterias pueden seleccionarse de

5 *Microcystis aeruginosa* PCC7806, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis* NIES 102, *Microcystis wesenbergii* NIES 107, *Microcystis* sp. cepa UTEX 2667, *Microcystis* sp. cepa UTEX 2664, *Nodularia harveyana* PCC7804, *Nodularia spumigena* NROS 10, *Nodularia spumigena* BY1, *Nodularia spumigena* HEM, *Anabaena* sp. cepa 202A2, *Nostoc* sp. cepa 152, *Oscillatoria* sp. cepa 18R, *Oscillatoria* sp. cepa 195, *Phormidium* sp. aislado 2-26b, *Phormidium* sp. aislado 1-6c, y *Phormidium* sp. aislado 4-19b.

Los métodos y los kits de la invención también pueden emplearse para el descubrimientos de nuevos géneros o especies hepatotóxicas en colecciones de cultivos o procedentes de muestras extraídas del entorno.

### Métodos y kits

10 El ADN que se va analizar utilizando los métodos y los kits de la presente invención puede extraerse de células de cianobacterias, en cultivo mixto o como aislados de géneros o especies individuales. Por consiguiente, las células pueden cultivarse antes del aislamiento del ADN o, como alternativa, el ADN puede extraerse directamente de muestras procedentes del entorno, tales como muestras de agua salada, muestras de agua dulce o florecimientos de algas verde-azuladas. Puede utilizarse una serie de métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica para la extracción y la purificación del ADN para los fines de la presente invención, por ejemplo según se describe en Neilan (1995) y Neilan *et al.* (2002). Los expertos en la técnica apreciarán con facilidad que la presente invención no debe limitarse al uso de método específicos para el aislamiento del ADN. En efecto, la presente invención puede realizarse sin aislamiento de ADN antes del análisis del ADN.

20 Generalmente, según los métodos de la invención, el análisis del ADN se realiza mediante una amplificación con PCR. Los productos amplificados después pueden analizarse mediante secuenciación de ácidos nucleicos. La amplificación con PCR puede realizarse en ADN extraído de aislados de cianobacterias o de muestras del entorno según se describió anteriormente o, como alternativa, las secuencias pueden amplificarse directamente de organismos sin necesidad de unas etapas previas de extracción o purificación de ADN. Los expertos en la técnica conocen una diversidad de métodos para la PCR directa.

25 Los métodos y los reactivos para su uso en las reacciones de amplificación con PCR, la posterior resolución de los fragmentos, y la secuenciación de ácidos nucleicos son muy conocidos por los expertos en la técnica. En cada caso, los protocolos y los reactivos adecuadas dependerán en gran medida de las circunstancias individuales. Puede obtenerse una orientación en una diversidad de fuentes tales como, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992. Los expertos en la técnica apreciarán con facilidad que pueden alterarse diversos parámetros de estos procedimientos sin afectar a la capacidad para lograr el producto deseado. Por ejemplo, en el caso de la amplificación con PCR, puede variarse la concentración salina o el tiempo y/o la temperatura de una o más de las etapas de desnaturalización, reasociado y extensión. De modo similar, también puede variar la cantidad de ADN utilizado como molde dependiendo de la cantidad de ADN disponible o de la cantidad óptima de molde requerida para una amplificación eficaz.

35 Los cebadores para su uso en los métodos y los kits de la presente invención generalmente son oligonucleótidos, en general con una longitud de 15 a 30 bases. Estos cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado que incluye, por ejemplo, la síntesis química directa o la clonación y restricción de las secuencias apropiadas. No todas las bases del cebador deben reflejar la secuencia de la molécula molde con la cual se hibrida el cebador; el cebador sólo necesita contener las suficientes bases complementarias para permitir que el cebador se hibride con el molde. Un cebador también puede incluir bases desapareadas en una o más posiciones, que son bases que no son complementarias con las bases en el molde pero que se diseñan para incorporar cambios en el ADN tras la extensión de bases o la amplificación. Un cebador puede incluir otras bases, por ejemplo, en forma de una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción en el extremo 5' para facilitar la clonación del ADN amplificado.

45 Tal como se ejemplifica en la presente, los cebadores adecuados para la amplificación de los productos que contienen el dominio AMT para la detección de cianobacterias potencialmente hepatotóxicas pueden comprender las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 a 4. Las parejas de cebadores adecuadas para la amplificación con PCR pueden comprender las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que la presente invención no se limita al uso de los cebadores específicos ejemplificados, sino que también pueden utilizarse otras secuencias de cebadores, con la condición de que los cebadores se diseñen de forma apropiada para permitir la amplificación de la secuencias de AMT de cianobacterias hepatotóxicas. Por ejemplo, en realizaciones alternativas, la secuencia de nucleótidos de un cebador puede compartir al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de coincidencia con la secuencia indicada en SEQ ID NO:1 a 4. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse una o más sustituciones, adiciones o deleciones de bases en la secuencia de estas secuencias para generar una secuencia con al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de coincidencia.

Además, la localización de cebadores adecuados para la amplificación de secuencias de AMT puede determinarse mediante factores como el contenido en G+C, y la capacidad de una secuencia para formar estructuras secundarias

no deseadas.

Los expertos en la técnica pueden determinar secuencias de los cebadores adecuadas utilizando procedimientos habituales sin experimentación indebida.

5 Los métodos de análisis adecuados del ADN amplificado son muy conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, la electroforesis en gel, que puede o no ser precedida por una digestión con enzimas de restricción, y la secuenciación de ácidos nucleicos. La electroforesis en gel puede comprender una electroforesis en gel de agarosa o una electroforesis en gel de poliacrilamida, las técnicas que emplean habitualmente los expertos en la técnica para la separación de fragmentos de ADN basándose en su tamaño. La concentración de agarosa o poliacrilamida en el gel determina en gran parte la capacidad de resolución del gel y, por tanto, la concentración apropiada de agarosa o poliacrilamida dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN que van a distinguirse.

10 La presente invención también proporciona kits para su uso en la detección de cianobacterias tóxicas. Generalmente, los kits según la presente invención se diseñan específicamente con componentes que permiten la detección de secuencias del dominio AMT y, por tanto, facilitan la identificación de cianobacterias potencialmente tóxicas.

15 Por consiguiente, los kits según se describen en la presente pueden incluir uno o más cebadores oligonucleotídicos que se hibridan de modo específico con secuencias del dominio AMT de cianobacterias y permiten la detección de cianobacterias hepatotóxicas. En estos kits, pueden proporcionarse cantidades apropiadas de los cebadores en recipientes adecuados. Los cebadores oligonucleotídicos pueden proporcionarse suspendidos en una disolución acuosa o como un polvo liofilizado, por ejemplo.

20 Las secuencias apropiadas de los cebadores pueden variar. El kit de la invención comprende una pareja de cebadores adecuados para la amplificación con PCR de secuencias de AMT de cianobacterias. La pareja de cebadores puede comprender secuencias como las indicadas en SEQ ID NO:1 y 2. La pareja de cebadores puede comprender secuencias como las indicadas en SEQ ID NO:1 y 4. La pareja de cebadores puede comprender secuencias como las indicadas en SEQ ID NO:3 y 4. La cantidad de cada cebador suministrada en el kit puede ser cualquier cantidad apropiada, dependiendo de la naturaleza de la aplicación, y generalmente puede ser una cantidad suficiente para cebar al menos varias reacciones de amplificación. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad la cantidad apropiada de cada cebador que se va a utilizar en una única reacción de amplificación.

25 Un kit según la presente invención también puede incluir una molécula molde control adecuada y/o cebadores control para su uso en una reacción de control. El diseño de moldes y cebadores control adecuados y de reacciones control es muy conocido por los expertos en la técnica.

30 Un kit según la presente invención también puede incluir otros componentes para realizar las reacciones de amplificación que incluyen, por ejemplo, reactivos para la preparación de muestras de ADN, tampones apropiados (por ejemplo, tampón polimerasa), sales (por ejemplo, cloruro de magnesio), enzimas polimerasas, y desoxirribonucleótidos (dNTP). El kit también puede incluir los reactivos necesarios para realizar análisis del ADN amplificado, tales como una enzima o enzimas de restricción apropiadas, un tampón o tampones de reacción para la digestión con las enzimas de restricción, y reactivos para su uso en la separación de los fragmentos digeridos (por ejemplo, agarosa) y/o la secuenciación de los ácidos nucleicos. Generalmente, un kit también puede incluir recipientes para albergar los diversos componentes, e instrucciones para utilizar los componentes del kit para realizar las reacciones de amplificación según la presente invención.

40 La presente invención se describirá a continuación con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos, que no deben considerarse limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Detección mediante PCR de genes de péptidos cíclicos de hepatotoxinas

45 Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos para que fuesen adecuados para la amplificación del dominio de aminotransferasa (AMT) codificado dentro de los complejos multienzimáticos de *mcyE* de microcistina sintetasa y *ndaF* de nodularina sintetasa. El diseñador de los cebadores se basó en las cuatro secuencias completas de microcistina sintetasa de *Microcystis aeruginosa* PCC7806, *Microcystis aeruginosa* K-139, *Anabaena* cepa 90, y *Planktothrix* sp. 128/6, así como el gen de nodularina sintetasa de *Nodularia spumigena* NSOR10 (véase la figura 1). A partir de estas cinco secuencias se identificaron dos sitios conservados que permiten el diseño de cebadores específicos, HEPF y HEPR, tal como se muestra en la figura 1 y en SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente. También se diseñaron y se sintetizaron dos cebadores alternativos, HEPF2 y HEPR2, siendo estos cebadores complementarios con secuencias diana de aproximadamente 170 pb y 560 pb corriente abajo de las secuencias diana para HEPR (véase la figura 2). Tal como se ilustra en la figura 2, la amplificación con PCR se realizó utilizando el conjunto de cebadores HEPF/HEPR, el conjunto de cebadores HEPF/HEPR2, y el conjunto de cebadores HEPF2/HEPR2, para determinar su capacidad para seleccionar productores de péptidos de hepatotoxina cianobacterianos.

55 La especificidad de los cebadores se ensayó utilizando especies de cianobacterias hepatotóxicas en cultivo, así

como material de florecimiento total.

5 Se ensayaron 17 cultivos heptotóxicos (tabla 1), que pertenecen a los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, y *Nodularia*. Se conocía la presencia de microcistina o nodularina en las cepas investigadas gracias a estudios previos. Se ensayaron 12 cultivos no tóxicos de los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Synechocystis*, y *Cylindrospermopsis*. Los géneros formadores de florecimientos dominantes en estas muestras fueron *Microcystis*, *Planktothrix*, y *Nodularia*.

10 Las muestras de florecimientos seleccionadas (tabla 2) se recogieron en el lago Alexandria, el lago del John Oldman Park y el río Swan, Australia. La muestra de florecimiento del lago Spino (Italia) fue suministrada por Milena Bruno (Departamento de Higiene Ambiental, Instituto Nacional de Salud, Italia). El aislado de florecimiento de *Planktothrix* sp. (lago Ammersee, Alemania) y los aislados de *Phormidium* sp. fueron suministrados por Daniel Dietrich (Universidad de Constanza, Alemania), y George Izaguirre (Water Quality Section, Metropolitan Water District of Southern California, EEUU), respectivamente. Otras cepas de cianobacterias se obtuvieron de la colección de the School of Biotechnology and Biomolecular Culture, University of New South Wales, Australia (tabla 1).

Tabla 1. Especies de cianobacterias ensayadas para la producción de hepatotoxinas

Especie	Cepa	Hepatotóxica	Hepatotoxina	Otras cianotoxinas	Origen	Referencia
<b>Chroococcales</b>						
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC7806	+	microcistina	-	Países Bajos	Rippka y Herdman (1992)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC7005	+	microcistina	-	Escocia	Rippka y Herdman (1992)
<i>Microcystis</i> sp.	UTEX 2667	+	microcistina	-	EEUU	Eloff y van der Westhuizen (1981)
<i>Microcystis</i> sp.	UTEX 2664	+	microcistina	-	EEUU	Eloff y van der Westhuizen (1981)
<i>Microcystis viridis</i>	NIES 102	+	microcistina	-	Japón	Lyra et al. (2001)
<i>Microcystis wesenbergii</i>	NIES 107	+	microcistina	-	Japón	Lyra et al. (2001)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	HUB53	-	-	-	Alemania	Lyra et al. (2001)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	UWOCC C1	-	-	-	EEUU	Dempsey (1977)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	UWOCC C4	-	-	-	EEUU	Dempsey (1977)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	UWOCC P3	-	-	-	EEUU	Doers y Parker (1988)
<i>Microcystis</i> sp.	UWOCC Bauld B	-	-	-	Australia	Starr y Zeikus (1993)
<i>Synechocystis</i> sp.	PCC6803	-	-	-	EEUU	Rippka y Herdman (1992)
<b>Nostocales</b>						
<i>Anabaena</i> sp.	cepa 202A2	+	microcistina	-	Finlandia	Lyra et al. (2001)
<i>Anabaena circinalis</i>	NIES 19	-	-	saxitoxina	Inglaterra	Neilan et al. (1999)
<i>Cylindropermopsis</i> sp.	cepa T3	-	-	cilindropermopsis	Australia	Hawkins et al. (1997)
<i>Nodularia harveyana</i>	PCC7804	+	nodularina	-	Francia	Rippka y Herdman (1992)
<i>Nodularia harveyana</i>	PCC73104	-	-	-	Canadá	Rippka y Herdman (1992)
<i>Nodularia spumigena</i>	NROS 10	+	nodularina	-	Finlandia	Bolch et al. (1999)
<i>Nodularia spumigena</i>	BY1	+	nodularina	-	Mar Báltico	Lehtimaki et al. (1994)
<i>Nodularia spumigena</i>	HEM	+	nodularina	-	Mar Báltico	Lehtimaki et al. (1994)

<i>Nostoc</i> sp.	cepa 152	+	microcistina	-	Japón	Lyra <i>et al.</i> (2001)
<i>Nostoc</i> sp.	PCC7120	-	-	-	EEUU	Lyra <i>et al.</i> (2001)
<i>Nostoc</i> sp.	PCC73120	-	-	-	Australia	Rippka y Herdman (1992)
<b>Oscillatoriales</b>						
<i>Lyngbya</i> sp.	BAN 01	-	-	n/a	Australia	Salmon (no publicado)
<i>Oscillatoria</i> sp.	cepa 18R	+	microcistina	-	Finlandia	Neilan <i>et al.</i> (1999)
<i>Oscillatoria</i> sp.	cepa 195	+	microcistina	-	Finlandia	Neilan <i>et al.</i> (1999)
<i>Phormidium tenue</i>	-	-	-	n/a	Japón	Sugira (no publicado)
<i>Phormidium</i> sp.	aislado 2-26b	+	microcistina	n/a	EEUU	Izaguirre <i>et al.</i> (2004)
<i>Phormidium</i> sp.	aislado 1-6c	+	microcistina	n/a	EEUU	Izaguirre <i>et al.</i> (2004)
<i>Phormidium</i> sp.	aislado 4-19b	+	microcistina	n/a	EEUU	Izaguirre <i>et al.</i> (2004)
* Según se confirmó mediante PCR en el presente estudio utilizando los cebadores HIEPF/HEPR.						

Tabla 2. Orígenes de las muestras de florecimientos seleccionadas

Florecimiento de algas verde-azuladas (género dominante)	Localización	Hepatotóxica	Hepatotoxina	Referencia
<i>Microcystis</i> sp.*	Lago del John Oldman Park, Australia	+	microcistina	Neilan (no publicado)
<i>Microcystis</i> sp.	Rio Swan, Australia	+	microcistina	Neilan (no publicado)
<i>Planktothrix</i> sp.	Ammersee, Alemania	+	microcistina	Ernst <i>et al.</i> , 2001
<i>Planktothrix</i> sp.*	Lago Spino, Italia	+	microcistina	Viaggiu B. (comunicación personal)
<i>Nodularia</i> sp.*	Lago Alexandria, Australia	+	nodularina	Moffitt y Neilan, 2001

Todas las muestras de florecimientos se ensayaron utilizando la pareja de cebadores HEPF/HEPR. Sólo las indicadas (\*) fueron ensayadas utilizando la pareja de cebadores HEPF/HEPR2 o HEPF2/HEPR2.

El ADN genómico total de las cepas y del material de los florecimientos se extrajo utilizando tampón XS (Neilan *et al.*, 2002). Se emplearon aproximadamente 200 mg de células de cianobacterias para cada extracción. Las células se combinaron con 600 µl de tampón de extracción XS (metilxantogenato de potasio al 1%, acetato de amonio 800 mM, EDTA 20 mM, SDS al 1%, Tris-HCl 100 mM, pH 7,4). La mezcla se agitó en vórtice y se incubó a 65 °C durante 2 h, y los extractos se enfriaron durante 10 min sobre hielo. Se retiraron los residuos celulares mediante centrifugación a 12000 x g durante 10 min. El ADN se precipitó mediante la adición de 1 volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de acetato de amonio 4 M durante 15 min a 4 °C. El ADN precipitado se sedimentó mediante centrifugación a 12000 x g durante 10 min y se lavó con etanol al 70%. El ADN extraído se resuspendió en 100 µl de agua estéril.

La amplificación con PCR se realizó utilizando diversas combinaciones de los cebadores HEPF (5'-TTTGGGGTTAACTTTTTGGGCATAGTC-3') (SEQ ID NO:1), HEPR (5'-AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGT-3') (SEQ ID NO:2), HEPF2 (5'-AGTATGATCTGCGTAAAGCAGATTTCT-3') (SEQ ID NO:3) y HEPR2 (5'-AAACAACTCGTTTTTCCCATGT-3') (SEQ ID NO:4), según se indicó anteriormente (véase la figura 2).

Todas las reacciones de PCR se realizaron utilizando 0,2 unidades de Taq polimerasa (Fischer Biotech, Perth, Australia) en una mezcla de reacción de 20 µl que contenía MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 1x tampón de Taq polimerasa (Fischer Biotech), dNTP 0,2 mM (Fischer Biotech), 0,5 pmol de cebador directo e inverso. La PCR se realizó utilizando 1 µl de ADN molde a una concentración de aproximadamente 100 ng µl<sup>-1</sup>. El ciclado térmico se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, CT). La temperatura de reasociado utilizada fue de 52 °C para los cebadores HEPF/HEPR, 57 °C para HEPF/HEPR2, y 53 °C para HEPF2/HEPR2. A una etapa de desnaturalización inicial a 92 °C durante 2 min le siguieron 35 ciclos de 92 °C durante 20 sg, 52 °C/57 °C/53 °C (según sea apropiado) durante 30 sg, y 72 °C durante 1 min, con una etapa de extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de la PCR se analizaron sobre geles de agarosa al 1% o al 2% con 1x tampón TAE. Los productos de la PCR se tñieron con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 10 min. Para la fotodocumentación se utilizó un sistema Gel-DOC Bio-RAD con el programa informático Quantity One 4.1 R (BIO-RAD, EEUU).

La secuenciación se realizó utilizando los cebadores HEPF, HEPR y HEPF2 para cada producto de la amplificación. La secuenciación automática se realizó utilizando el sistema de secuenciación de ciclos PRISM Big Dye y ABI 3730 Capillary Applied Biosystem (Foster City, California). Las identidades de los amplicones secuenciados se determinaron utilizando una búsqueda BLAST en GenBank.

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 472 pb mediante PCR utilizando el conjunto de cebadores HEPF/HEPR a partir del ADN de todas las cepas hepatotóxicas que pertenecen a *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Phormidium*, y *Nodularia*, mientras que no se obtuvo producto en la PCR de ninguna de las cepas no tóxicas que pertenecen a *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Nodularia*, *Lyngbya*, *Synechocystis*, y *Cylindrospermopsis* (los datos no se muestran). Por tanto, los resultados de la PCR son completamente coherentes con la denominación de tóxica o no tóxica de todas las especies listadas en la tabla 1.

Todos los productos de la PCR se secuenciaron para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados. El análisis de la secuencia de los amplicones reveló que representaban el fragmento del gen de AMT esperado de ortólogos de *mcyE* o *ndaF*. La PCR de HEPF/HEPR también amplificó con éxito el fragmento de 472 pb de todas las muestras de los florecimientos de cianobacterias hepatotóxicas (véase la figura 3). Estos fragmentos también se

secuenciaron y se compararon con los datos de secuencia de las cianobacterias cultivadas.

Además, se amplificaron unos fragmentos de aproximadamente 1000 pb mediante PCR utilizando el conjunto de cebadores HEPF/HEPR2, y de aproximadamente 400 pb utilizando el conjunto de cebadores HEPF2/HEPR2 a partir del ADN de cepas hepatotóxicas que pertenecen a *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Phormidium*, y *Nodularia*, mientras que no se obtuvo producto de la PCR de la cepa no tóxica *Microcystis* sp. HUB 53 (véase la tabla 3). Estas dos parejas de cebadores también amplificaron con éxito los fragmentos de las muestras de florecimientos de cianobacterias hepatotóxicas procedentes del lago del John Oldman Park, del lago Spino y del lago Alexandria (véase la tabla 2), lo cual resulta coherente con los resultados obtenidos utilizando el conjunto de cebadores HEPF/HEPR (los datos no se muestran). Los productos de la PCR obtenidos de la cepa de *M. aeruginosa* PCC7806 utilizando los conjuntos de cebadores HEPF/HEPR2 y HEPF2/HEPR2 se secuenciaron para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados. El análisis de la secuencia de los amplicones reveló que representaban el fragmento del gen de AMT esperado de *mcyE* (*M. aeruginosa* PCC7806, nº de registro AAF00958).

Tabla 3. Aislados de cianobacterias seleccionados utilizando HEPF/HEPR2 y HEPF2/HEPR2

Especie	Cepa	Hepatotóxica	HEPF/HEPR2	HEPF2/HEPR2	Hepatotoxina
<b>Chroococcales</b>					
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC7806	+	+	+	microcistina
<i>Microcystis aeruginosa</i>	HUB53	-		-	-
<b>Nostocales</b>					
<i>Anabaena</i> sp.	cepa 202A2	+	+	+	microcistina
<i>Anabaena</i> sp.	cepa 90	+	+	+	microcistina
<i>Nodularia spumigena</i>	NROS 10	+	+	+	nodularina
<i>Nostoc</i> sp.	cepa 152	+	+	+	microcistina
<b>Oscillatoriales</b>					
<i>Oscillatoria</i> sp.	cepa 18R	+	+	+	microcistina
<i>Oscillatoria</i> sp.	cepa 195	+	+	+	microcistina
<i>Phormidium</i> sp.	aislado 2-26b	+	+	+	microcistina
<i>Phormidium</i> sp.	aislado 1-6c	+	+	+	microcistina
<i>Phormidium</i> sp.	aislado 4-19b	+	+	+	microcistina

## 15 Ejemplo 2 - Evolución de los genes del péptido cíclico de la hepatotoxina

Las secuencias de los cultivos se alinearon y se analizaron filogenéticamente según sus secuencias de aminoácidos traducidas. Se eligió la glutamato-1-semialdehído aminotransferasa de *Aquifex* sp. (nº de registro de GenBank AE000709) como grupo externo. Las secuencias obtenidas del ADN total de los florecimientos también se incluyeron en el análisis cuando las secuencias se consideran de alta calidad, tales como las muestras del río Swan (Australia), del lago Alexandria (Australia), del lago del John Oldman Park (Australia) y del lago Spino (Italia).

Los datos de las secuencias se analizaron utilizando el programa informático Applied Biosystem Auto-Assembler. Las secuencias se compararon en un alineamiento múltiple utilizando Clustal x (1.8) y la matriz de PAM-Dayhoff. Los árboles filogenéticos se obtuvieron utilizando los métodos de Neighbor-Joining, y se calcularon los niveles de confianza mediante inicialización utilizando un número de remuestreo de 1000. Las secuencias de referencia se obtuvieron en GenBank (NCBI).

Para la comparación filogenética, se utilizaron las regiones de AMP amplificadas a partir de los cultivos de cianobacterias, así como el material total de los florecimientos agrupado en agrupaciones bien diferenciadas, A y B (figura 3). La agrupación A comprende cepas de los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, y *Nodularia* que pertenecen al orden Nostocales, mientras que la agrupación B contiene los géneros *Oscillatoria*/*Planktothrix* y *Phormidium*, así como las cepas hepatotóxicas de *Microcystis*. Los datos de las secuencias obtenidos de las muestras de florecimientos de *Microcystis* se agruparon con las cepas de *Microcystis* y el material de florecimiento de *Nodularia* alineado con *N. spumigena* NSOR10. Los datos de las secuencias para AMT de *McyE* de las diferentes cepas de

*OscillatoriaPlanktothrix* fueron idénticos. Lo mismo se observó para los tres aislados de *Phormidium*, aunque los datos de *McyE* para *Microcystis*, *Anabaena*, y los datos de la secuencia de *NdaF* de las cepas de *Nodularia* no fueron 100% similares.

5 Los análisis filogenéticos indicaron que *NdaF* evolucionó a partir de *McyE*. Además, la AMT de la nodularina sintetasa muestra la relación más cercana con la AMT de productores de microcistina que forman heterocistos, y se sitúa como una subrama de AMT de la cepa 152 de *Nostoc* (figura 4).

10 La filogenia de AMT revela agrupamientos según el género de las especies investigadas y, por tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la microcistina y la nodularina son vestigios ancestrales que se han perdido en las cepas no tóxicas. Esto podría sugerir la coevolución de la microcistina sintetasa, la nodularina sintetasa, y el ADNr 16S.

### Referencias

- Bolch, C. J. S. et al. 1999. Genetic, morphological, and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 35:339-355.
- 15 Carmichael, W. W. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: The CyanoHABs. *Human and ecological risk assessment* 7:1393-1407.
- Christiansen, G., J. et al. 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J. Bacteriol.* 185:564-572.
- Codd, G. A. et al. 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Europ. J. Phycol.* 34:405-415.
- 20 Dempsey, L. C. 1977. The isolation and characterization of *Microcystis aeruginosa* Kützing emend. Elenkin 1924 from the Lake Winnebago Pool. M.S. thesis. University of Wisconsin, Oshkosh.
- Doers, E. P., y D. L. Parker. 1988. Properties of *Microcystis aeruginosa* and *M. flosaquae* (Cyanophyta) in culture: taxonomic implications. *J. Phycol.* 24:502-508.
- Eloff, J. N., y A. J. Van der Westhuizen. 1981. Toxicological studies on *Microcystis*, p. 343-364. In W. W. Carmichael (ed.), *The Water Environment - Algal Toxins and Health*. Plenum. Press, New York.
- 25 Ernst et al. 2001. Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish (*Correogonus lavaretus* L.). *Environ. Tox.* 16:483-488.
- Hawkins, P. R. et al. 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35:341-346.
- 30 Hisbergues, M. et al. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyano-bacterial genera. *Arch. Microbiol.* 180:402-410.
- Hitzfeld, B. et al. 2000. Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 108:113-122.
- Izaguirre, G. et al. 2004. A benthic *Phormidium* species that produces microcystin-LR, isolated from three reservoirs in Southern California. 6th International Conference on Toxic Cyanobacteria.
- 35 Kurmayer, R. et al. 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ. Microbiol.* 6:831-841.
- Kurmayer, R., and T. Krutzenberger. 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6723-6730.
- 40 Lehtimäki, J. et al. 1994. The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia* strains. *Arch. Hydrobiol.* 130:269-282.
- Lyra, C. et al. 2001. Molecular characterization of planktonic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:513-526.
- Mikalsen, B. et al. 2003. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on micro-cystin production in *Microcystis* strains. *J. Bacteriol.* 185:2774-2785.
- 45 Moffitt, C. M., y B. A. Neilan 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6353-6362.
- Moffitt, M. C., y B. A. Neilan 2001. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthetase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 196:207-214.

- Neilan, B. A. 1995. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2286-2291.
- Neilan, B. A. et al. 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 181:4089-97.
- 5 Neilan, B. A. et al. 2002. Molecular identification of cyanobacteria associated with stromatolites from distinct geographical locations. *Astrobiol.* 2:271-280.
- Nishizawa, T. et al. 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* 126:520-529.
- 10 Rippka, R., y M. Herdman. 1992. Pasteur Culture Collection (PCC) of cyanobacterial strains in axenic culture, vol.1, catalogue of strains. Paris, France; Institut Pasteur.
- Rouhiainen; L. et al. 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:686-692.
- Starr, R. C., y J. A. Zeikus. 1993. UTEX-the Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29 (Supl.):1-106.
- 15 Tillet, D. et al. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7:753-764.
- Vaitomaa, J. et al. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7289-7297.

Listado de Secuencias

<110> Unisearch Limited

5 <120> Detección de cianobacterias hepatotóxicas

<130> 702175

<160> 4

10

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 28

15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

20

<400> 1

ttgggggta actttttgg gcatagtc 28

<210> 2

25

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

30

<400> 2

aattcttgag gctgtaaadc gggtt 25

<210> 3

35

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

40

<223> Secuencia sintética

<400> 3

agtatgatct gcggtaaagc agatttct 28

<210> 4

45

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

50

<223> Secuencia sintética

<400> 4

aaacaaactc gttttccca tgt 23

55

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para la detección de cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina, comprendiendo dicho método las etapas de:
- (a) obtener una muestra de cianobacterias; y
- 5 (b) analizar la muestra para detectar la presencia de secuencias del dominio de aminotransferasa (AMT) asociadas a hepatotoxinas,
- en el que dicho dominio AMT está localizado dentro de los marcos de lectura abiertos de *mcyE* y *ndaF*, y la presencia de dichas secuencias del dominio AMT de la aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas es indicativa de dichas cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina.
- 10 2.- El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de análisis (b) puede comprender:
- (i) la amplificación de ADN a partir de la muestra utilizando cebadores adecuados; y
- (ii) la detección de secuencias amplificadas.
- 3.- El método de la reivindicación 2, en el que los cebadores son cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 2.
- 15 4.- El método de la reivindicación 2, en el que los cebadores son cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 4.
- 5.- El método de la reivindicación 2, en el que los cebadores son cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:3 y 4.
- 20 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que la detección de las secuencias amplificadas comprende una electroforesis en gel y/o una secuenciación de ácidos nucleicos.
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra de cianobacterias comprende uno o más organismos cianobacterianos aislados o cultivados.
- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra de cianobacterias comprende una muestra extraída del entorno que contiene uno o más organismos cianobacterianos.
- 25 9.- El método de la reivindicación 8, en el que la muestra extraída del entorno es una muestra de agua salada o de agua dulce.
- 10.- El método de la reivindicación 8, en el que la muestra extraída del entorno es una muestra de un florecimiento de algas verde-azuladas.
- 30 11.- Un kit para la detección de cianobacterias productoras de microcistina y cianobacterias productoras de nodularina, comprendiendo dicho kit una pareja de cebadores diseñados para la amplificación con PCR de secuencias del dominio de aminotransferasa asociadas a hepatotoxinas en los genes *ndaF* y *mcyE*.
- 12.- El kit de la reivindicación 11, en el que los cebadores son cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 2.
- 35 13.- El kit de la reivindicación 11, en el que los cebadores son cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 y 4.
- 14.- El kit de la reivindicación 11, en el que los cebadores son cebadores oligonucleotídicos que comprenden las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:3 y 4.

<b>HEPF</b>	5'	TTTGGGGTT AACTTTTT GGCATAGT C	3'	
<i>N. spumigena</i> NSOR10		TTTGGGGTT AACTTTTT GGCATAGT C	-----	AACCCGAT TTACAGCCT CAAGAATT
<i>Anabaena</i> sp. 90		TTTGGAGTT AACTTTTT GGCATAGT C	-----	AACCCAGAT TTACAGCCT AAAGAATT
<i>M. aeruginosa</i> PCC7806		TTTGGGGTT AACTTTTT GGCATAGT C	-----	AACCCGAT TTACAGCCT CAAGAATT
<i>M. aeruginosa</i> K-139		TTTGGGGTT AACTTTTT GGCATAGT C	-----	AACCCGAT TTACAGCCT CAAGAATT
<i>Planktothrix</i> sp. 126/8		TTTGGGGTT AACTTTTT GGCATAGT C	-----	AACCCGAT TTACAACCT CAAGAATT
<b>HEPR</b>			3'	AACCCGAT TTACAGCCT CAAGAATT 5'
Consenso		*****G***	*****G***	*****G*** C*****

Figura 1

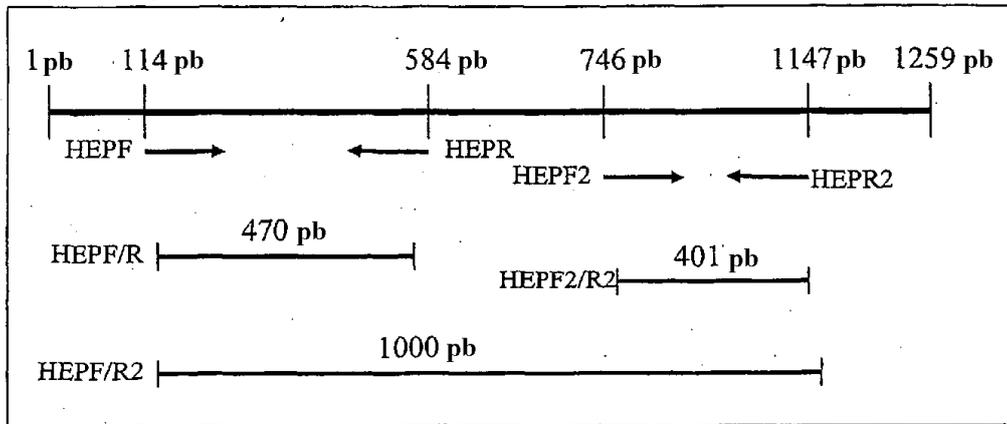
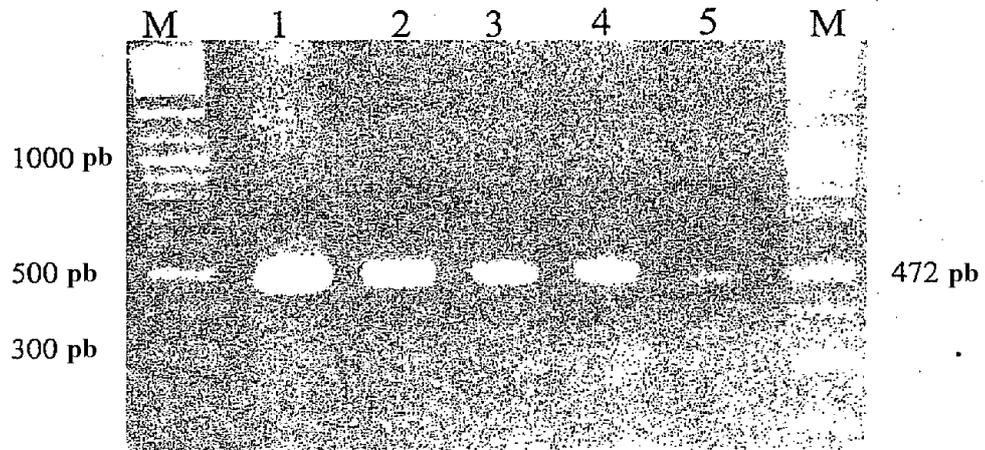


Figura 2



**Figura 3**

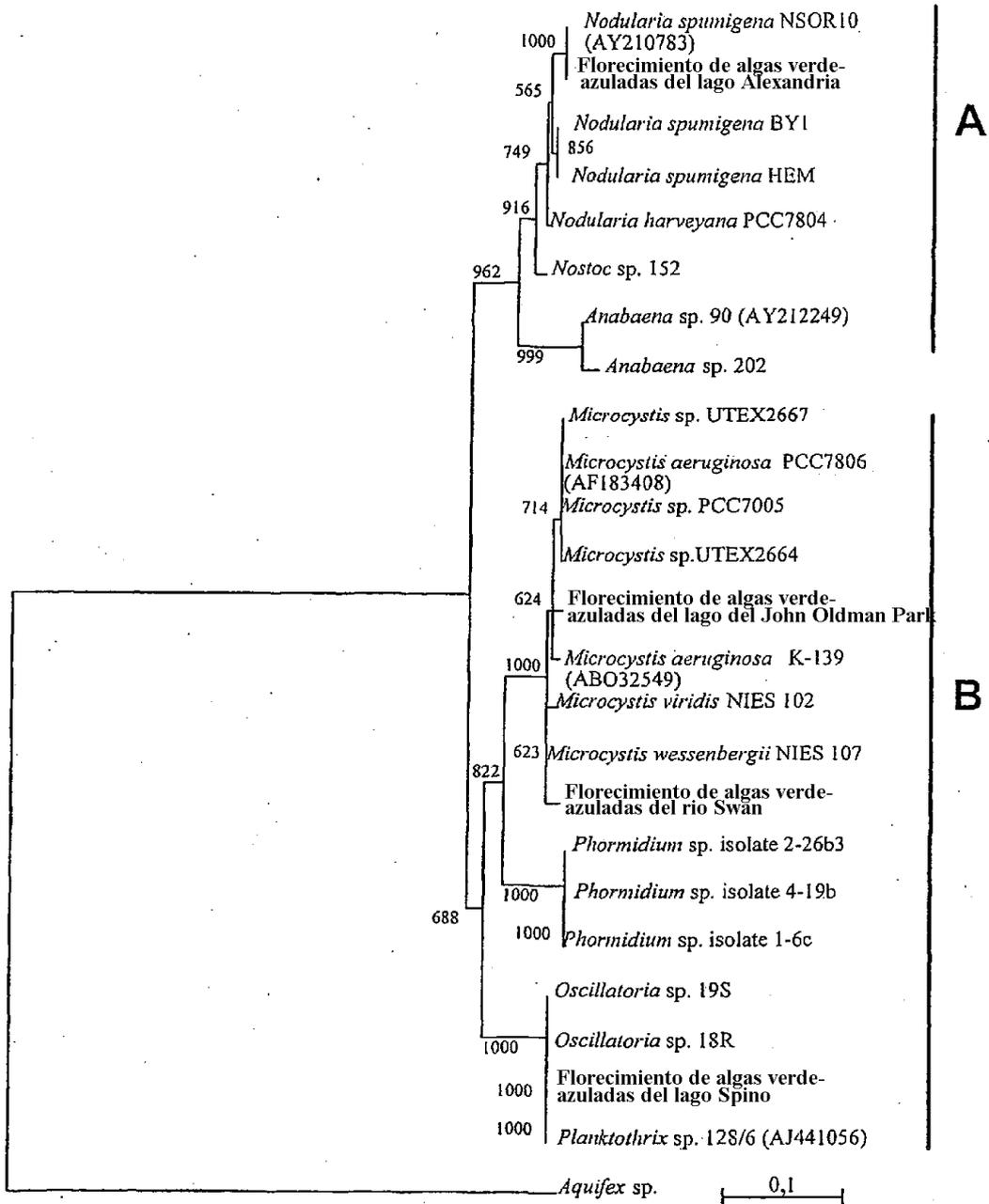


Figura 4