

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 206**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012 PCT/FI2012/051098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068654**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12795832 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2776584**

54 Título: **Método y cebadores para la detección de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina**

30 Prioridad:

09.11.2011 FI 20116109
09.11.2011 US 201161557496 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2019

73 Titular/es:

TURUN YLIOPISTO (100.0%)
Yliopistonmäki
20014 Turun Yliopisto, FI

72 Inventor/es:

SAVELA, HENNA y
VEHNIÄINEN, MARKUS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 710 206 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

Método y cebadores para la detección de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la detección de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina de muestras ambientales. Particularmente, la presente invención proporciona un método de ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de dichas cianobacterias tóxicas. La presente invención proporciona además materiales tales como cebadores, pares de cebadores y sondas diseñados para el método de la invención.

Antecedentes de la invención

10 En los últimos años, las floraciones cianobacterianas tóxicas han llamado cada vez más la atención de la comunidad científica, autoridades y público general en todo el mundo. Las toxinas producidas por las apariciones masivas de cianobacterias han causado muertes de fauna silvestre y ganado (véase Stewart et al., 2008, para una revisión) y se han vinculado con dolencias y muertes humanas (Turner et al., 1990; Pilotto et al., 1997; Jochimsen et al., 1998). Las microcistinas, hepatotoxinas heptapeptídicas cíclicas que forman un grupo importante de cianotoxinas con más
15 de 90 variantes estructurales conocidas (Welker y von Döhren, 2006) se producen por cepas de *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix* y *Nostoc* (Sivonen y Jones, 1999), aunque se han descrito apariciones aisladas de *Hapalosiphon* (Prinsep et al., 1992), *Phormidium* (Izaguirre et al., 2007) y *Fischerella* (Fiore et al., 2009) productoras de microcistina. De estos ocho géneros, principalmente *Anabaena*, *Microcystis* y *Planktothrix* causan floraciones hepatotóxicas en agua dulce. Para entender mejor la dinámica de las floraciones cianobacterianas y los mecanismos
20 de producción de toxinas y predecir los riesgos asociados a estos fenómenos, son necesarios métodos de detección fáciles de usar para diferentes variantes de microcistina y cianobacterias productoras de toxinas. La exposición continua a un bajo nivel de microcistinas se ha vinculado con un riesgo aumentado de cáncer hepático (Yu, 1995; Ueno et al., 1996; Svircev et al., 2009), lo que acentúa adicionalmente la necesidad de estos métodos.

25 La identificación fiable de cianobacterias productoras de microcistina y no productoras de microcistina puede ser complicada. Son comunes floraciones mixtas de cepas tóxicas y no tóxicas morfológicamente indistintas de la misma especie (Vezie et al., 1998). El descubrimiento del agrupamiento génico *mcys* reveló un grupo de dianas potenciales para la detección basada en PCR de productores de microcistina.

30 Los genes vinculados con residuos de aminoácidos raros no proteinogénicos en la estructura de la toxina son especialmente bien adecuados con este fin (Mbedi et al., 2005). Muchos estudios describen métodos basados en ácido nucleico para detectar cianobacterias productoras de microcistina y su uso en un intento de evaluar el riesgo asociado a floraciones tóxicas (véase Sivonen, 2008, para una revisión). Por ejemplo, el documento WO2011003184 divulga cebadores diseñados para la detección de cianobacterias productoras de microcistina. Los cebadores divulgados son complementarios de la región conservada del dominio de ss-cetoacil sintasa (KS) del gen *mcysD* de la cepa UTCC 299 de *Microcystis aeruginosa*, o de la región conservada del primer dominio de deshidratasa del gen
35 *mcysD* de UTCC 300 de *Microcystis aeruginosa*. En el documento WO2006128230, se divulga otro método basado en PCR para la detección de cianobacterias hepatotóxicas. Las secuencias diana para amplificación se localizan en secuencias del dominio de aminotransferasa asociado a hepatotoxina derivadas del gen *mcysE* del complejo génico de microcistina sintetasa y el gen *ndaF* del complejo génico de nodularina sintetasa.

40 Sin embargo, se han descrito pocas PCR cuantitativas instantáneas capaces de detectar más de un género productor de microcistina (Al-Tebrineh et al., 2011; Vaitomaa et al., 2003; Briand et al., 2008), y actualmente la mayoría de los métodos de qPCR publicados se concentran en un solo género, lo más a menudo *Microcystis* (Foulds et al., 2002; Kurmayer y Kutzenberger, 2003; Rinta-Kanto et al., 2005; Furukawa et al., 2006; Fortin et al., 2010).

45 Las elecciones de preparación de muestras y tecnología de marcaje son importantes en qPCR. La pérdida de muestra durante los procesos de extracción de ADN multietapas combinada con una amplificación ineficaz causada por una retirada incompleta de los inhibidores de PCR puede dar como resultado un error de cuantificación significativo (Wilson, 1997). Abordar estos problemas mejoraría la fiabilidad de la PCR. La especificidad aumentada, a su vez, que puede conseguirse con sondas marcadas específicas de secuencia, (p. ej., TaqMan) y, al contrario que los fluoróforos rápidos más comúnmente usados, los marcajes de quelato de lantánido permiten la detección por
50 fluorometría resuelta en el tiempo, conduciendo a una sensibilidad mejorada debido a menores señales de fondo, puesto que cualquier autofluorescencia decae durante la ventana de tiempo entre excitación y medida (Soini and Lövgren, 1987).

55 El objetivo de este estudio era desarrollar un método de PCR cuantitativa instantánea para la detección de *Anabaena*, *Microcystis* y *Planktothrix* potencialmente productoras de microcistina. Para conseguir una cuantificación fiable, se compararon la extracción de ADN y la lisis celular simple en términos de desempeño de qPCR y rendimiento de molde. Se aplicó el ensayo de qPCR desarrollado al análisis de muestras ambientales y se examinó la correlación entre los números de copias de genes y las concentraciones de microcistina.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Curvas patrón para el ensayo de qPCR de *mcyB*. Se representan los log en base 10 de los números de copias de *mcyB* frente a sus ciclos umbral respectivos (C_t) para a) *Anabaena*, b) *Microcystis* y c) *Planktothrix*. Pudo detectarse un intervalo de 10^1 - 10^7 copias de la secuencia diana de *mcyB* por cada género diana. Las eficacias de amplificación eran similares (92,7-94,2 %) para todas las dianas. La variación de C_t dentro de las cuatro reacciones repetidas era muy baja, las desviaciones estándares se muestran como barras de error escondidas mayoritariamente dentro de los símbolos.

Figura 2. Comparación de dos métodos de preparación de muestras de qPCR. Se compararon cantidades de células determinadas microscópicamente (columnas rayadas) con las copias del gen *mcyB* detectadas en ADN genómico extraído (columnas blancas) y en células disgregadas (columnas grises). Se realizaron las comparaciones para NIVA-CYA 140 de *Microcystis aeruginosa*, NIVA-CYA 267/4 de *Anabaena cf. flos-aquae* y NIVA-CYA 299 de *Planktothrix agardhii* productoras de microcistina. La filtración y lisis celular procuraban un número de copias consistentemente mayor en comparación con el ADN extraído de la misma cantidad de células. Las barras de error indican la variación del número de copias tanto intermuestral como intramuestral.

Figura 3. Se determinó el desarrollo de los números de copias del gen *mcyB* de *Planktothrix* (■, línea continua), los números de células *Planktothrix* (▲, línea de puntos) y las concentraciones de microcistina total (□, línea discontinua) por LC-MS en el embalse Hauninen (Raisio, Finlandia) durante abril-junio de 2008. Los números de células se basan en el recuento microscópico de unidades filamentosas de 100 μm y una estimación de 30 células por cada una de tales unidades. Se observó una clara correlación positiva entre los números de copias de *mcyB* y la concentración de microcistina total (dmMC-RR y dmMC-LR). No se detectó *Microcystis* ni *Anabaena* potencialmente tóxicas.

Figura 4. Secuencias diana en el gen *mcyB* de *Anabaena* sp., *Microcystis aeruginosa* y *Planktothrix agardhii*, y cebadores y sondas usados en el Ejemplo.

Figura 5. Correlación del número de copias génicas totales del gen *mcyB* a concentraciones de microcistina [MC] en una muestra acuática ambiental medida por ELISA.

Figura 6. Correlación del número de copias génicas totales del gen *mcyB* a concentraciones de microcistina [MC] en una muestra acuática ambiental medida por HPLC.

Figura 7. Correlación del número de copias génicas totales del gen *mcyB* a concentraciones de microcistina [MC] en una muestra acuática ambiental medida por LC-MS.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención está dirigida a un método para detectar la presencia de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina en una muestra que comprende las etapas de:

- a) efectuar la lisis de las células en dicha muestra;
- b) poner en contacto el ácido nucleico obtenido de las células lisadas en una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa con cebadores que hibridan con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3 en el gen *mcyB* presente en *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* y *Anabaena* sp., en el que dichos cebadores amplifican al menos parte de la secuencia diana en el gen *mcyB*;
- c) efectuar una reacción en cadena de la polimerasa con una mezcla de reacción obtenida de la etapa b), de modo que se amplifiquen específicamente las secuencias de dicho gen *mcyB*, si dichas secuencias están presentes en la muestra; y
- d) detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico amplificadas, en el que la presencia de la secuencia del gen *mcyB* amplificada es indicativa de la presencia de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina en la muestra.

Las muestras preparadas por el método de la invención comprenden material cianobacteriano y preferiblemente muestras ambientales, tales como muestras de agua que pueden ser muestras de agua salada o muestras de agua dulce u otras muestras ambientales adecuadas. Aunque el método está dirigido principalmente a la detección de cianobacterias tóxicas, tales como *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* y *Anabaena* sp., puede usarse también para la cuantificación de las cianobacterias tóxicas productoras de microcistina en dichas muestras. Esto puede realizarse efectuando una PCR cuantitativa (qPCR) en el ADN extraído usando los cebadores de la presente invención, y determinando el número de copias génicas del gen *mcyB*. Además, la concentración de microcistina tóxica en la muestra puede monitorizarse también por correlación de dicho número de copias génicas obtenido por qPCR con la correspondiente concentración de microcistina.

En la etapa a), el ácido nucleico que se usa como molde en la PCR de la etapa b) puede extraerse y purificarse de las células lisadas por métodos convencionales. Sin embargo, la suspensión obtenida de las células lisadas preferiblemente se usa directamente como molde de PCR. Por consiguiente, en una realización de la invención, una muestra de agua no diluida sospechosa de comprender cianobacterias tóxicas puede filtrarse primero. Se suspenden entonces las células filtradas en agua desionizada estéril y se lleva a cabo la lisis celular por tratamiento térmico. La suspensión obtenida y el ácido nucleico de la misma pueden usarse como tales para la mezcla de reacción de la etapa b).

En la etapa b), dichos cebadores amplifican al menos parte de la secuencia diana en el gen *mcyB* como se expone en la SEQ ID NO:1 correspondiente a las posiciones 6147-6251 del genoma de *Microcystis aeruginosa* descrito en la Figura 4, o como se expone en la SEQ ID NO:2 correspondiente a las posiciones 6203-6305 del genoma de *Planktothrix agardhii* descrito en la Figura 4, o como se expone en la SEQ ID NO:3 correspondiente a las posiciones 6170-6272 de *Anabaena sp.* descrito en la Figura 4.

En realizaciones de la invención, el amplicón, concretamente la secuencia diana, que se amplifica en la etapa b) comprende al menos 20, preferiblemente al menos 50, más preferiblemente al menos 80 y lo más preferiblemente 103 o 105 nucleótidos consecutivos de la secuencia diana como se define por las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

Preferiblemente, los cebadores usados en el método comprenden o consisten en una de las siguientes secuencias:

5'-GCTTTAATCCACAAGAAGCTTTATTAGC-3' (SEQ ID NO:4)

5'-AGATTTTAATCCACAAGAAGCTTTATTAGC-3' (SEQ ID NO:5)

5'-GGTTTAATCAACAAGAGGCTTTATTAGC-3' (SEQ ID NO:6)

5'-CTGTTGCCTCCTAGTTCAAAAATGACT-3' (SEQ ID NO:7)

En una de las realizaciones más preferidas de la invención, dicho método se efectúa como una reacción en cadena de la polimerasa instantánea para la que están disponibles varios kits comerciales.

Para uso en la reacción en cadena de la polimerasa instantánea, la presente invención proporciona también sondas oligonucleotídicas que hibridan específicamente con la secuencia de ácido nucleico del gen *mcyB* presente en *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* y *Anabaena sp.*, en las que las sondas tienen la secuencia:

5'-ACTGAATTATTGGAGGTAGAGGTGAGTGATAC-3' (SEQ ID NO:8)

5'-CCTCTACCTCCAATAATTCA-3' (SEQ ID NO:9)

5'-GGGTGAGTTATTAGAAGCAGAAGTTAGTAACAG-3' (SEQ ID NO:10)

5'-TTCTGCTTCTAATAACTCACC-3' (SEQ ID NO:11)

5'-GGGGTGAATTATTAGAAATAGAAGTAAGTGACAA-3' (SEQ ID NO:12)

5'-TACTTCTATTTCTAATAATTCACC-3' (SEQ ID NO:13)

Se divulgan también cebadores que comprenden o consisten en cualquiera de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 4-7. Preferiblemente, el cebador tiene 28-40 nucleótidos. Más preferiblemente, el cebador comprende menos de 30, 35 o 40 nucleótidos.

Además, se proporcionan sondas que comprenden o consisten en cualquiera de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 8-13. Preferiblemente, la sonda tiene menos de 40 nucleótidos.

Los cebadores oligonucleotídicos y sondas son secuencias cortas de nucleótidos (tales como ARN o ADN, preferiblemente ADN), típicamente con 25 a 30 o menos bases. Sin embargo, los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos hasta 160 a 200 bases y los presentes oligonucleótidos pueden alargarse para añadir, p. ej. un sitio de escisión de enzima de restricción, al oligonucleótido. La longitud típica de los cebadores es preferiblemente de 26-32, más preferiblemente de 28-30 nucleótidos.

La presente invención proporciona también kits para la detección de la presencia de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina. El kit puede comprender cebadores y sondas como se define anteriormente. Tales cebadores y sondas se describen anteriormente y en los ejemplos siguientes. Preferiblemente, dicho kit comprende medios para una reacción en cadena de la polimerasa instantánea, tales como sondas marcadas, enzimas polimerasa, tampones y nucleótidos.

Es bien conocido en la materia que las secuencias del mismo gen varían algo en cepas de una especie microbiana

y, por tanto, la secuencia del gen *mcyB* presente en *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* y *Anabaena sp.* no es 100 % idéntica en todas las cepas de la especie. Sin embargo, está claro a partir de la descripción de la presente memoria, particularmente del Ejemplo siguiente, que un especialista en la materia reconocería la secuencia del gen *mcyB* en cualquier cepa relacionada basándose en la similitud y homología de estas secuencias génicas.

5 En la presente memoria, la expresión “hibrida específicamente” significa hibridación complementaria entre un oligonucleótido y una secuencia diana. El término “específicamente” hace referencia a la especificidad mostrada por la hibridación complementaria, que permite desapareamientos menores entre el oligonucleótido y la secuencia que no pueden comprometer la reasociación para detección de las señales de hibridación.

10 La presente invención se describe adicionalmente en el siguiente ejemplo, que no se pretende que limite el alcance de la invención.

Sección experimental

Materiales y métodos

1.1. Cepas cianobacterianas y muestras ambientales

15 Se enumeran en la Tabla 1 las cepas cianobacterianas usadas en este estudio. Se adquirieron las cepas de la Pasteur Culture Collection (PCC, París, Francia) y la Norwegian Institute for Water Research Cyanobacterial Culture Collection (NIVA, Oslo, Noruega) y se mantuvieron como se recomienda por los proveedores. Todas las cepas de NIVA se cultivaron en Z8 (Staub, 1961, NIVA modificado 1972, 1976). Las cepas de la PCC se cultivaron en BG 11 (Sigma), BG11₀ con omisión de nitrato o BG11₀ con NaNO₃ y NaHCO₃ añadidos usando formulaciones descritas por la PCC. Se mantuvieron también tres cepas adicionales de otras fuentes. Se cultivó NIES-107 de *Microcystis*
20 *aeruginosa* (National Institute of Environmental Studies, Tsukuba, Japón) en Z8. La cepa 966 de *Anabaena lapponica* (Finnish Environment Institute, Dr. Jarkko Rapala) así como *Anabaena sp.* 90 (University of Helsinki, Prof. Kaarina Sivonen) se cultivaron en Z8 modificado sin nitrógeno añadido. Se mantuvieron todos los cultivos a 23 °C usando bombillas de acuario PowerGlo 20 W (Hagen, Japón) como fuente de luz. Se contaron microscópicamente las células cianobacterianas de cultivos de 2,5 semanas de edad de NIVA-CYA 267/4, NIVA-CYA 140 y NIVA-CYA
25 299. Se diluyeron las muestras 1:100-1:200 en agua desionizada y se conservaron en yodo de Lugol. Después de una sedimentación de 16 h de alícuotas de muestra de 10 ml, se llevó a cabo el recuento en un microscopio invertido Nikon TE-200 (Nikon, Japón) con objetivos de 10x y 40x. Se recolectaron las células de los cultivos enumerados para cuantificación de *mcyB*. Se recogieron las muestras ambientales del embalse Hauninen, Raisio, Finlandia, durante abril-junio de 2008 (11 muestras) y de lagos de agua dulce de las islas Åland durante julio de
30 2008 (13 muestras). Todas las muestras, incluyendo ADN extraído y otros moldes de PCR, se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta análisis adicional. Las muestras de cultivo y ambientales se congelaron recientes o se liofilizaron.

1.2. Extracción de microcistinas

35 Se extrajeron muestras de 8 a 10 mg de material cianobacteriano liofilizado o filtros de fibra de vidrio GF/C liofilizados (Ø 25 mm; Whatman, Maidstone, RU) que contenían material cianobacteriano filtrado con 1,2 ml de metanol al 75 % (pureza de HPLC; Rathburn, Walkerburn, RU). Se trataron los extractos durante 15 min en un baño ultrasonificador (Bandelin Sonorex RK 156, Berlín, Alemania) y adicionalmente durante 1 min con un sonicador de sonda (Bandelin Sonopuls HD 2070 con micropunta de 3 mm, pulso del 30 %, energía del 30 %). Después de centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos, se dividieron los sobrenadantes en alícuotas y se evaporaron hasta sequedad con argón a 40 °C. Se resuspendieron los extractos pretendidos para análisis de microcistina por HPLC-DAD y LC-ES-MS-MS en metanol al 75 % mientras que en agua los orientados a ELISA.

1.3. HPLC con detección UV por fila de diodos (HPLC-DAD)

45 Se analizaron las muestras usando un sistema de HPLC Agilent (Waldbronn, Alemania) de serie 1100 consistente en un desgasificador, una bomba cuaternaria, un compartimento de columna termostatazado a 40 °C y un detector de fila de diodos funcionando a 200-300 nm (cuantificación a 238 nm). La fase estacionaria era una columna Purospher STAR, de partículas de 3 µm, 55 mm x 4 mm de Merck (Darmstadt, Alemania) o una columna Ascentis RP-Amide, partículas de 3 µm, 100 mm x 4,6 mm de D.I. de Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.). La fase móvil consistía en acetoneitrilo (pureza de HPLC S, Rathburn, Walkerburn, RU) (disolvente B) – agua ultrapura Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia) (disolvente A), conteniendo ambos ácido trifluoroacético al 0,05 % (TFA; Fluka, Buchs, Suiza) con el siguiente programa de gradiente lineal: 0 min 25 % de B, 7 min 70 % de B, 10 min 70 % de B, 10,1 min 25 %
50 de B; tiempo de parada 15 min; caudal 1 ml/min. Los volúmenes de inyección eran de 10 µl. Adicionalmente, se analizaron las muestras en una columna Merck Purospher STAR RP-18e, 55 mm x 4 mm de D.I. con partículas de 3 µm (Spooft y Meriluoto, 2005). Se usaron microcistinas purificadas en laboratorio individuales y las siguientes muestras de referencia para la identificación de microcistinas: a) extracto de PCC 7820 de *Microcystis aeruginosa* y
55 b) extracto de NIES-107 de *Microcystis aeruginosa* como se describe en (Spooft et al., 2003).

1.4. LC-MS y LC-MS-MS

Se efectuaron los experimentos de LC-MS en un sistema HPLC Agilent de serie 1100 acoplado con un espectrómetro de masas Waters Micromass (Manchester, RU) Quattro Micro de triple cuadrupolo equipado con una interfaz de electropulverización. Se cuantificaron las toxinas en una columna de extremos taponados Merck Purospher STAR RP-18 (30 mm x 4 mm, partículas de 3 µm). La fase móvil consistía en un gradiente de ácido fórmico acuoso al 0,1 % (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) con el siguiente programa de gradiente lineal: 25 % de B a 70 % de B durante 10 min, entonces 90 % de B durante 2 min, donde se mantuvo durante 1 min. El intervalo de inyección fue de 16 min, volumen de inyección 10 µl, caudal 0,5 l/min y temperatura de estufa de columna 40 °C. Se fijó el voltaje capilar a 3,8 kV y el voltaje de cono a 40 V (dmMC-RR y MC-RR) o 75 V (resto de microcistinas y nodularina). Se fijaron la temperatura y caudal del gas de desolvatación (nitrógeno) a 300 °C y 650 l/h, respectivamente. Se fijó la temperatura de la fuente iónica a 150 °C. Se detectaron los iones en el modo de ionización por electropulverización positivo. Las señales monitorizadas en el modo de registro iónico seleccionado (SIR) fueron *m/z* [dmMC-RR+2H]²⁺ 512,8, [MC-RR+2H]²⁺ 519,8, [MC-LF+H]⁺ 986,5 y [MC-LF+Na]⁺ 1008,5, [dmMC-LR+H]⁺ 986,5, [MC-LR+H]⁺ 995,5, [MC-LY+H]⁺ 1002,5, [MC-LW+H]⁺ 1025,5 y [MC-LW+Na]⁺ 1047,5, [MC-YR+H]⁺ 1045,5, [dmNod+H]⁺ 811,5 y [Nod+H]⁺ 825,5. Se realizó la adquisición de datos con el software Masslynx v. 4.0 (Micromass). Se llevaron a cabo los experimentos de LC-MS-MS en una Agilent 1200 Rapid Resolution (RR) LC acoplada con un espectrómetro de masas Bruker Daltonics HCT Ultra ion trap (Bremen, Alemania) con fuente iónica de electropulverización (ESI). El sistema 1200 RR LC incluía una bomba binaria, un desgasificador a vacío, un automuestreador de SL y un compartimento de columna termostatazado. Se hizo funcionar la trampa iónica en modo iónico de electropulverización positivo. Se fijaron los parámetros de fuente iónica como sigue: temperatura seca 350 °C, presión de nebulizador 276 kPa (40 psi), flujo de gas seco 10,0 l/min, voltaje capilar 4,0 kV. Se empleó un intervalo de barrido de MS de 500 a 1200 *m/z* con la función de Smart Parameter Setting (SPS). Se fijó la diana de ICC en 300.000 con un tiempo máximo de acumulación de 100 ms. Se promovió una abundante fragmentación de MS-MS por los ajustes de SmartFrag. Se consiguió la separación de las toxinas en una columna Ascentis C₁₈, 50 mm x 3 mm de D.I. con partículas de 3 µm (Supelco) at 40 °C. Los volúmenes de inyección fueron de 5 µl. La fase móvil consistía en agua-acetonitrilo-ácido fórmico (99:1:0,1; disolvente A) y acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1; disolvente B) con el siguiente programa de gradiente lineal: 0 min 25 % de B, 5 min 70 % de B, 6 min 70 % de B, 6,1 min 25 % de B; tiempo de parada 10 min: caudal 0,5 ml/min. Las señales monitorizadas primarias eran las mismas que con el instrumento Quattro micro, pero los espectros de masas adquiridos con el instrumento HCT Ultra permitían la identificación de toxinas adicionales basándose en patrones de fragmentación. Se realizó la adquisición de datos con el software Bruker Compass 1.3.

1.5. ELISA

Se analizaron las muestras con el kit Quantiplate Microcystin (Enviroligix, Portland, ME, EE. UU.) usando el protocolo proporcionado por el fabricante. Se diluyeron los extractos con agua según los resultados de HPLC para ajustar las concentraciones de microcistina al intervalo de trabajo del ensayo. Se realizaron dos diluciones diferentes de algunas muestras.

1.6. Preparación de muestra de PCR

Se usaron dos métodos para preparar muestras para análisis de PCR. Se extrajo el ADN genómico de células liofilizadas de cepas cultivadas o muestras ambientales de las islas Åland liofilizadas usando el kit de extracción de ADN NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se determinaron espectrofotométricamente la concentración y calidad de ADN (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). Se efectuaron el filtrado y lisis celular como sigue: se suspendieron 10 ml de cultivo celular recolectado en 90 ml de agua desionizada estéril y se filtraron a vacío en un filtro de fibra de vidrio (Ø47 mm GF/C, Whatman). En el caso de muestras del embalse Hauninen, se filtraron 50 ml de agua no diluida. Se cortaron trozos de cada filtro y se suspendieron en 100 µl de agua desionizada estéril. Se llevó a cabo la lisis celular a 80 °C durante 5 min. Se usó después de ello la suspensión directamente como molde de PCR. Se registraron las dimensiones del trozo de filtro con fines de cuantificación. Se trataron las muestras de cultivo contadas microscópicamente usando ambos métodos descritos anteriormente, con unas pocas modificaciones: se recolectaron las células como alícuotas tanto de 5 ml como de 10 ml, y se sometieron a filtración o bien extracción de ADN. Se llevó a cabo la preparación de muestras en células recién recolectadas. Se recogieron las células para extracción de ADN por centrifugación (4 °C, 3220 g, 20 min, Eppendorf 5810R, Hamburgo, Alemania).

1.7. Cebadores y sondas

Se recuperaron secuencias de *mcvB* (Nishizawa et al., 1999; Tillett et al., 2000; Christiansen et al., 2003; Rouhiainen et al., 2004; Kaneko et al., 2007) de la base de datos nucleotídica GenBank y se diseñaron los cebadores y sondas basándose en el alineamiento de secuencias. Se fabricaron los oligonucleótidos por Thermo Scientific (Ulm, Alemania) y biomers.net (Ulm, Alemania) (Tabla 2). Se sintetizaron las sondas con 5'-C6-aminoligadores y grupos 3'-fosfato. Se marcaron todas las sondas de detección en el aminoligador de extremo 5' con un quelato de Tb³⁺ orgánico (2,2',2'',2'''-{{6,6'-[4]-[2-(4-isotiocoanatofenil)etil]pirazol-1'',3''-diil}bis(piridin)-2,2'-diil}bis(metilenitrilo)}tetraquis(acetato)} de terbio (III)) como se describe anteriormente (Nurmi et al., 2002). Todas las sondas apagadoras tenían una molécula de BHQ1 (Black hole quencher® 1) conjugada en sus extremos 3' por el fabricante de oligonucleótidos. Se ensayó la especificidad del cebador en las cepas cianobacterianas enumeradas en la Tabla 1. Las reacciones de PCR individuales contenían 5 nmol de dNTP (Finnzymes, Espoo, Finlandia), 2,67

5 pmol de cada cebador directo y 8 pmol del cebador inverso, 0,5 unidades de ADN polimerasa DyNAzyme II HotStart (Finnzymes), 1X tampón DyNAzyme II HotStart y 1 µl de molde, 1 ng de ADN genómico o bien 1 µl de suspensión que contiene células lisadas. Se rellenó al volumen de reacción, 20 µl, con agua estéril Milli-Q. Se efectuó el termociclado usando un PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, EE. UU.), empezando con 10 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C y 1 min a 72 °C, y terminando con 10 min a 72 °C. Se analizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (0,5 ng·l⁻¹).

1.8. qPCR

10 El principio de la técnica de PCR cuantitativa instantánea se ha descrito con detalle en otro lugar (Nurmi et al., 2002). Brevemente, se monitoriza la acumulación de producto de amplificación midiendo la fluorescencia de larga duración obtenida de restos de quelato liberados de las sondas de detección por la actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa. Se mantiene la fluorescencia de fondo al mínimo con la ayuda de sondas apagadoras. Se confirmó la especificidad de la sonda de detección usando qPCR y ADN genómico purificado de todas las cepas cultivadas. Cada reacción qPCR contenía 4 nmol de dNTP, 2 pmol de cada cebador directo y 6 pmol del cebador inverso, 0,2 unidades de ADN polimerasa DyNAzyme II HotStart, 1X tampón DyNAzyme II HotStart, 0,25 pmol de sonda de detección (mcyB-mP, o bien mcyB-pP o mcyB-aP), 2,5 pmol de la correspondiente sonda apagadora (mcyB-mQ o mcyB-pQ, para mcyBaQ se usó la cantidad de 3,0 pmol) y 1 ng de ADN molde. Se rellenaron las reacciones con agua estéril Milli-Q hasta 20 µl. Se ejecutaron todas las reacciones en ThermoFast 96 Robotic PCR Plates (Abgene, Surrey, RU) con Applied Biosystems Optical Caps (Foster City, CA, EE. UU.). Se iniciaron las rondas de qPCR con 5 min a 95 °C, seguido de 8 ciclos de 30 s a 95 °C y 1 min a 62 °C. Después del ciclo 8, se bajó la temperatura a 35 °C durante 15 s para la medida de fluorescencia. Se repitieron las medidas cada segundo ciclo después del ciclo 40, y se llevaron a cabo con un Victor² 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer Life Sciences Wallac, Turku, Finlandia) usando el protocolo estándar del fabricante para la medida resuelta en el tiempo de la fluorescencia de Tb.

1.9. Desarrollo de la curva patrón

25 Se produjeron patrones de ADN bicatenarios por PCR a partir de *Anabaena* sp. 90, PCC 7806 (*Microcystis*) y NIVA-CYA 299 (*Planktothrix*) como se describe anteriormente. Se efectuó la purificación de productos de amplificación de *mcyB* usando el kit de purificación por PCR Qiaquick (Qiagen, Hilden, Alemania) y posterior cuantificación usando el kit QuantIt PicoGreen (Invitrogen, Eugene, OR, EE. UU.), ambos según las instrucciones del fabricante. Se calcularon las concentraciones molares de los productos de amplificación purificados y se preparó una serie de diluciones de 10 veces (n= 7) de cada patrón específico de género. Se mantuvieron los patrones a -20 °C hasta el uso. Se ejecutó la qPCR como se describe anteriormente. Se representaron los ciclos de umbral (C_t) frente al logaritmo de los números de copias de *mcyB*, y se calcularon las eficacias de amplificación (E) a partir de la pendiente de regresión lineal ($E = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$, donde el valor de 1,00 corresponde a una eficacia del 100 %).

1.10. Análisis de muestras ambientales y de cultivo por qPCR

35 Se prepararon series de diluciones de 10 veces (n= 4) de moldes preparados a partir de muestras de cultivo contadas microscópicamente. Los objetivos eran comparar la cuantificación por qPCR y las densidades celulares y valorar la eficacia de amplificación y posible inhibición de PCR. Se efectuaron todas las qPCR como se describe anteriormente, excepto por la cantidad de molde aumentada, 4 ng de ADN o 4 µl de muestra termotratada. Se analizaron las muestras de cultivo en cuatro reacciones repetidas, las muestras ambientales no diluidas por triplicado. En las muestras ambientales que procuraban un resultado negativo de *mcyB* se ensayó la inhibición de PCR añadiendo 1 ng de ADN genómico de *Anabaena* sp. 90 a cada reacción y visualizando los productos de PCR sobre geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio como se describe anteriormente.

Resultados

2.1. Especificidad de cebador y sonda

45 Se ensayó la especificidad de los cebadores y sondas de detección de *mcyB* en ADN extraído y células termotratadas de 30 cepas cianobacterianas. Se enumeran las especificidades de sonda, microcistinas y otras toxinas producidas por las cepas en la Tabla 1. No se observaron resultados faltos negativos. No se observaron productos de amplificación de cepas no productoras de microcistina, excepto para PCC 7804 de *Nodularia harveyana* productora de nodularina. Sin embargo, el producto de amplificación de *Nodularia* no se detectó en ninguna de las sondas de detección en qPCR. Por tanto, todas las sondas de detección específicas de género actuaban con 100 % de especificidad y sensibilidad. Cada una de las tres posibles combinaciones de cebadores podrían usarse para amplificar la secuencia de *mcyB* diana de todas las cepas productoras de microcistina independientemente del género, pero las eficacias de amplificación variaban de cepa a cepa (datos no mostrados). Cuando se usaron los tres cebadores directos juntos, se conseguía una amplificación eficaz.

2.2. Curvas patrón y eficacia de amplificación

Se determinaron las sensibilidades y eficacias de amplificación usando patrones preparados a partir de productos de PCR purificados. La sensibilidad analítica era de 10 copias de *mcyB* por reacción y el intervalo logarítmico lineal de

10 a 10^7 copias de *mcyB* para los tres géneros diana (Figura 1). Las eficacias de amplificación y coeficientes de correlación derivados de las curvas patrón eran de 93,8 % ($r^2 = 0,997$), 91,7 % ($r^2 = 0,999$) y 95,3 % ($r^2 = 0,998$) para *Anabaena*, *Microcystis* y *Planktothrix*, respectivamente.

2.3. Comparación de métodos de preparación de muestras

5 Para comparar los dos métodos de preparación de muestras, se prepararon moldes de PCR a partir de muestras de cultivo de densidad celular conocida. Las eficacias de amplificación obtenidas de moldes preparados por filtración y tratamiento térmico eran mayores o iguales a las de los correspondientes moldes de ADN purificados (89-100 %, media $r^2 = 0,9993 \pm 0,0008$ y 83-97 %, media $r^2 = 0,9976 \pm 0,0018$, respectivamente). La calidad del ADN extraído variaba, las relaciones de A_{260}/A_{280} oscilaban de 1,7 a 2,0. Las muestras termostratadas eran demasiado diluidas para examinarse espectrofotométricamente. La filtración y tratamiento térmico de muestras procuró 4-330 veces los números de copias de *mcyB* del correspondiente ADN extraído (Figura 2). Se observó la mayor diferencia en NIVA-CYA 299, una cepa de *Planktothrix agardhii*, donde los números de copias detectadas de muestras filtradas eran solo 1,5 veces los recuentos celulares, pero 330 veces los números de copias en las correspondientes muestras de ADN extraído. Para *Anabaena*, los números de copias en ADN y lisados celulares eran de la misma magnitud que los recuentos celulares. Para *Microcystis*, era cierto lo mismo para los recuentos celulares y números de copias de ADN extraído, mientras que la filtración y disgregación térmica de las células procuraban números de copias de alrededor de 30 veces la cantidad de células.

2.4. Análisis por qPCR de muestras ambientales

20 Se analizaron un total de 24 muestras ambientales. La mayoría de las muestras de lagos de las islas Åland (9/13) contenía copias del gen *mcyB* originarias de *Microcystis* solo, o *Microcystis* junto con *Anabaena* o *Planktothrix* (Tabla 3). Las microcistinas estaban presentes en todas las muestras que en qPCR procuraban un resultado positivo de *mcyB*. Sin embargo, no pudo establecerse una correlación lineal entre los números de copias totales y las concentraciones de toxina. Cuatro muestras no contenían copias de *mcyB* de los géneros diana, ni mostraban evidencias de inhibición de PCR que pudieran haber causado resultados falsos negativos. Los resultados de ELISA eran positivos para todas las muestras de las islas Åland negativas de *mcyB*, mientras que los resultados de HPLC-DAD para las mismas muestras eran todos negativos y los análisis de LC-MS-MS daban como resultado concentraciones que oscilan de 0 a 0,67 μg de microcistinas por g of muestra (peso seco).

5 de las 11 muestras del embalse Hauninen eran positivas de *mcyB*. De acuerdo con los exámenes microscópicos, la población estaba dominada por *Planktothrix*, y no se detectaron *Microcystis* ni *Anabaena* potencialmente tóxicas. No se observó inhibición de PCR con el examen visual de los productos de amplificación obtenidos de muestras adicionadas. Se encontró una clara correlación positiva entre los números de copias de *mcyB* de *Planktothrix* y las concentraciones de microcistina totales (Figura 3). Las cantidades de filamentos aumentaron gradualmente del 3 de abril en adelante y alcanzaron el máximo el 29 de mayo, después de lo cual se observó una rápida disminución. El máximo simultáneo de la concentración de microcistina y los números de copias de *mcyB* específico de *Planktothrix* no coincidieron con la densidad de población máxima observada de *Planktothrix*. Estaban presentes dos variantes de microcistina principales en las muestras que contienen toxina, dmMC-RR y dmMC-LR.

Discusión

3.1. qPCR de *mcyB* y fondo genético

40 La identificación de una diana adecuada para la detección de varios géneros tóxicos es crucial. En el ensayo de qPCR descrito aquí, la secuencia diana está localizada en el segundo motivo de tiolación de *mcyB*, en una secuencia codificante del dominio de proteína portadora de peptidilo, el dominio que sirve para transferir la cadena polipeptídica creciente de *McyB* a *McyC* para alargamiento adicional (Nishizawa et al., 1999; Tillett et al., 2000). A nuestro entender, esta es la primera vez que se ha usado como diana para detección por qPCR. Al contrario que el primer dominio de adenilación de *mcyB* diana en muchos estudios (p. ej. (Mbedi et al., 2005; Kurmayer y Kutzenberger, 2003; Nonnemann y Zimba, 2002; Mikalsen et al., 2003), el segundo motivo de tiolación no es probable que esté afectado por la variación de la estructura de microcistina. La detección simultánea de varios géneros potencialmente tóxicos, independientemente de los perfiles de toxina, es por lo tanto posible. El amplio intervalo de productores de hepatotoxina potenciales detectados se demostró por la amplificación de *ndaA*, homólogo de *mcyB*, a partir de PCC 7804 de *Nodularia harveyana* productora de nodularina. Los segundos motivos de condensación, adenilación y tiolación de *mcyB* tienen sus contrapartidas en el gen *ndaA* (Moffitt y Neilan, 2004), y el amplicón en *Nodularia* comparte un 80 %, 75 % y 76 % de identidad de secuencia con los correspondientes amplicones en *Anabaena*, *Microcystis* y *Planktothrix*, respectivamente. Sin embargo, puesto que se mostró que las sondas de detección hibridaban solo con sus dianas pretendidas, la especificidad de qPCR de *mcyB* no se comprometía por la amplificación de *ndaA*.

55 La mayoría de los ensayos de qPCR de *mcyB* cuantitativa existentes están basados en unas pocas sondas (si se usa la química de detección de TaqMan) y pares de cebadores (Kurmayer y Kutzenberger, 2003; Nonnemann y Zimba, 2002; Kaebernick et al., 2002), que tienen un único género diana. Con los nuevos cebadores y sondas específicos de género diseñados para detectar una parte diferente del mismo gen, se expande la detección

cuantitativa de *mcyB* para incluir también *Anabaena* y *Planktothrix*, y además se elabora una nueva diana para los ensayos de repertorio diseñados para detectar más de un género productor de microcistina. Aunque los cebadores generales proporcionan información sobre la abundancia de toda las especies tóxicas (Al-Tebrineh et al., 2011), la detección específica de género tiene el beneficio añadido de monitorización de la dinámica de población. La tecnología de marcaje sensible (Nurmi et al., 2002) usada proporciona un ensayo con buena sensibilidad y un amplio intervalo de cuantificación. Con el límite de detección de 10 copias de *mcyB* por reacción y un intervalo de 7 órdenes de magnitud, el actual ensayo es muy similar a los métodos anteriormente publicados (Al-Tebrineh et al., 2011; Vaitomaa et al., 2003; Foulds et al., 2002; Kurmayer and Kutzenberger, 2003; Rinta-Kanto et al., 2005; Furukawa et al., 2006).

3.2. Preparación de muestras

Las diferencias entre las eficacias de amplificación de los patrones de qPCR y las muestras pueden tener un efecto sustancial sobre el resultado de cuantificación (Wilson, 1997). Existe la misma fuente de error también entre muestras preparadas por diferentes métodos, y cualquier comparación tiene que hacerse cuidadosamente. En este estudio, las diferencias del número de copias teóricas entre los tipos de muestra causadas por la variación en las eficacias de amplificación observadas permanecían en el intervalo de 3-5 veces. Esto no puede explicar la diferencia de 1-2 órdenes de magnitud en los números de copias detectados (para *Microcystis* y *Planktothrix*), mostrando que hay una diferencia significativa real entre las cantidades de molde disponible por célula que producen la lisis sencilla de las células cianobacterianas y la extracción y purificación de ADN genómico. Una serie de razones podría causar tales resultados, probablemente pérdida del material de muestra y lisis celular ineficaz durante la extracción de ADN. También es posible que las discrepancias entre los números de copias génicas y los recuentos celulares estén causadas en cierto grado por errores en la cuantificación microscópica, aunque una enumeración efectuada por un experto lo hará considerablemente menos probable.

Basándose en estas observaciones, si se suponía una copia génica por célula, en una muestra termotratada los números de *mcyB* de *Microcystis* darían como resultado una sobreestimación de la concentración celular. Sin embargo, con la misma suposición, la cuantificación de *mcyB* de ADN genómico purificado conduciría a la subestimación de la concentración celular, especialmente en el caso de *Planktothrix*. Se han observado resultados de PCR cuantitativa que conducen a una sobreestimación del número de células antes para *Anabaena* y *Microcystis* (Vaitomaa et al., 2003), y hay estudios que han apoyado que las células cianobacterianas albergan múltiples genomas (Labarre et al., 1989; Becker et al., 2002). Si este fuera el caso, explicaría las sobreestimaciones, pero al mismo tiempo haría las subestimaciones más graves. Por lo tanto, se eligió usar filtración y tratamiento térmico en el análisis de muestras ambientales siempre que fuera posible, y comparar los números de copias directamente con las concentraciones de toxina, evitando la problemática traducción de copias génicas a números de células

Se han reseñado resultados similares a la comparación realizada aquí para análisis cualitativos antes, los métodos de preparación de muestras alternativos han procurado moldes comparables al ADN purificado (Hisbergues et al., 2003; Ouahid et al., 2005). Las valoraciones del desempeño cuantitativo de diferentes métodos de preparación de muestras han encontrado que la extracción con fenol-cloroformo de ADN procura un mayor número de copias y por lo tanto también mayores estimaciones de concentraciones celulares que un kit de reactivos comerciales para la extracción de ADN (Schober y Kurmayer, 2006). Rasmussen et al., 2008 encontraron que la ultrasonificación y tratamiento con microondas en soluciones detergentes actuaban tan bien como la extracción de ADN por un kit de reactivos comerciales. Estas observaciones coinciden con los resultados anteriormente publicados que indican que la lisis celular y la liberación de ADN sin purificación es un método válido para la separación de muestras precedente a la detección y cuantificación de dianas génicas *mcy*.

3.3. Muestras ambientales

Se siguió la población cianobacteriana en el embalse de Hauninen cuantificando los números de copias de *mcyB* y las concentraciones de microcistina totales durante la primavera y principio de verano de 2008. Aunque en teoría la presencia de genes de microcistina sintetasa revela solo el potencial de producción de toxinas, la correlación positiva entre las copias de *mcyB* de *Planktothrix* y las concentraciones de toxina era evidente. Puesto que ninguno de los otros dos productores de toxina diana se detectaban, se supuso que *Planktothrix* era el único género productor de microcistina del embalse. Esta conclusión se apoyaba por las variantes de microcistina encontradas en las muestras, MC-dmLR y MC-dmRR, que son típicas de *Planktothrix* (Fastner et al., 1999). Los recuentos de filamentos no tenían una vinculación clara con los números de copias de *mcyB* o concentraciones de toxina, lo que indicaba que la población de *Planktothrix* en el embalse de Hauninen era una mezcla de cepas tóxicas y no tóxicas, variando ampliamente sus proporciones relativas durante el periodo de monitorización. Se han reseñado genotipos de *mcy* inactivos en *Planktothrix*, y parecen ser bastante comunes (Kurmayer et al., 2004; Ostermaier y Kurmayer, 2009). La presencia de tales genotipos en el embalse de Hauninen no pudo inferirse basándose en las concentraciones de toxina y los números de copias génicas observados, y por lo tanto se supuso despreciable.

En contraposición con el embalse de Hauninen, las muestras únicas recogidas de lagos de agua dulce separados de las islas Åland no mostraban una clara correlación entre concentraciones de microcistina y números de copias de *mcyB*, aunque no se detectaron resultados de *mcyB* cualitativos falsos positivos (concretamente, copias génicas detectadas pero sin microcistina presente en la muestra). Los factores ambientales pueden introducir variación en

los patrones de expresión génica de *mcy* y la producción de toxina (Kaebernick et al., 2000; Sevilla et al., 2008), y por lo tanto las diferencias en los ambientes de lagos contribuían lo más probablemente a este resultado. Otro posible factor afectante era la preparación de muestras. Considerando los resultados sobre el desempeño de qPCR de los moldes producidos por diferentes métodos, es probable que los rendimientos reducidos de las extracciones de ADN introdujeran un error dependiente del método en los resultados de cuantificación.

Cuatro muestras de Åland mostraron concentraciones muy bajas de microcistinas o ninguna toxina en conjunto cuando se analizaron con métodos HPLC-DAD y LC-MS-MS, y no procuraron señal en qPCR. El ensayo ELISA, sin embargo, indicaba la presencia de cantidades variadas de microcistinas en estas muestras. Puesto que los inmunoensayos de microcistina pueden afectarse por la matriz de muestra (Metcalf et al., 2000), y los otros dos métodos empleados no indicaban altas concentraciones de toxina, no pueden excluirse resultados de ELISA sobreestimados o falsos positivos como posibilidad. Las microcistinas son relativamente estables y pueden persistir en el agua durante semanas (Lahti et al., 1997), por tanto podrían haber estado presentes cantidades traza en las muestras, incluso después de que el organismo productor ya no estuviera.

Conclusión

Como la concienciación de los riesgos sanitarios de las apariciones masivas de cianobacterias tóxicas ha crecido, la demanda de métodos de monitorización ha aumentado. Las directrices y legislación referentes a la valoración de los riesgos de cianobacterias se están poniendo al día con el conocimiento científico actual. Un método de qPCR para detectar y cuantificar todos los miembros productores de microcistina potenciales de los tres géneros formadores de floración principales, acoplado con una preparación de muestras eficaz, proporciona un medio para una monitorización de alerta temprana rápida. Las cianobacterias productoras de microcistina potenciales pueden detectarse con buena sensibilidad y un amplio intervalo de cuantificación, respondiendo a la significativa variación de densidades celulares en el ambiente. Aunque, en buen acuerdo cualitativo con los datos cromatográficos, los resultados de cuantificación génica de las islas Åland muestran que los puntos de recogida de muestra separados pequeños no son suficientes para proporcionar directrices del número de copias génicas generales. Tales directrices podrían establecerse solo con el análisis de mayores números de muestras. La población de *Planktothrix* del embalse de Hauninen exhibe la poca fiabilidad de la cuantificación microscópica en la estimación de la concentración de toxina, y subraya los beneficios de la detección por qPCR. En conjunto, todos los resultados fomentan el uso de métodos moleculares en la monitorización ambiental de cianobacterias productoras de microcistina.

Tabla 1. Especificidad de sondas específicas de género de *mcyB* y las toxinas producidas por las cepas cianobacterianas usadas en este estudio
Amplicón de *mcyB* detectado con sondas específicas de género

Especies cianobacterianas	Cepa*	Cianotoxinas producidas ^b	Amplicón de <i>mcyB</i> detectado con sondas específicas de género		
			<i>mcyB</i> -aP, <i>Anabaena</i>	<i>mcyB</i> -mP, <i>Microcystis</i>	<i>mcyB</i> -pP, <i>Planktothrix</i>
<i>Anabaena</i> sp.	90	MC-RR, MC-LR, dmMC-LR, dmMC-RR	+	-	-
<i>Anabaena lemmermannii</i> var. <i>minor</i>	NIVA-CYA 83/1	dmMC-LR, MC-RR, dmMC-RR, MC-LR	+	-	-
<i>Anabaena lemmermannii</i> var. <i>minor</i>	NIVA-CYA 266/1	dmMC-RR, didmMC-RR, MC-RR	+	-	-
<i>Anabaena flos-aquae</i>	NIVA-CYA 267/4	m/z 1059, m/z 1045, dmMC-LR, MC-LR, m/z 1015, m/z 1029*	+	-	-
<i>Anabaena flos-aquae</i>	NIVA-CYA 499	-	-	-	-
<i>Anabaena lapponica</i>	966	CYN	-	-	-
<i>Anabaena cylindrica</i>	PCC 73105	-	-	-	-
<i>Anabaena cylindrica</i>	PCC 7938	-	-	-	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES 107	MC-RR, dmMC-RR, MC-LR, dmMC-LR, MR-YR, dmMC-YR	-	+	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIVA-CYA 57	dmMC-RR, didmMC-RR, MC-RR, MC-LR, dmMC-LR	-	+	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIVA-CYA 140	MC-LR, dmMC-LR, m/z 1009	-	+	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIVA-CYA 228/1	dmMC-RR, didmMC-RR, MC-RR, MC-LR, dmMC-LR, MC-YR, dmMC-YR	-	+	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIVA-CYA 495	m/z 1045, m/z 1031, MC-YR**	-	+	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7806	MC-LR, dmMC-LR	-	+	-

<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7820	MC-LR, dmMC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF	-	-	+
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7941	MC-LR, dmMC-LR, MC-YR	-	-	+
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIVA-CYA 22	-	-	-	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIVA-CYA 464	-	-	-	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7005	-	-	-	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7804	NOD m/z 839, NOD-R, dmNOD-R***	-	-	-
<i>Nostoc spp.</i>	PCC 6310	-	-	-	-
<i>Nostoc spp.</i>	PCC 7422	-	-	-	-
<i>Planktothrix agardhii</i>	NIVA-CYA 15	didmC-RR, dmMC-RR	-	-	+
<i>Planktothrix agardhii</i>	NIVA-CYA 59/1	dmMC-RR, MC-LR, dmMC-LR	-	-	+
<i>Planktothrix agardhii</i>	NIVA-CYA 299	dmMC-RR	-	-	+
<i>Planktothrix agardhii</i>	PCC 7805	-	-	-	-
<i>Planktothrix agardhii</i>	NIVA-CYA 12	-	-	-	-
<i>Planktothrix agardhii</i>	NIVA-CYA 21	-	-	-	-
<i>Planktothrix agardhii</i>	NIVA-CYA 116	-	-	-	-
<i>Planktothrix agardhii</i>	PCC 7811	-	-	-	-

^aLos nombres de cepas incluyen abreviaturas de nombres de la colección de cultivo. PCC, Pasteur Culture Collection, París, Francia; NIVA-CYA, Norwegian Institute for Water Research Culture Collection, Oslo, Noruega y NIES, National Institute of Environmental Studies, Tsukuba, Japón. ^bLa negrita indica las variantes tóxicas principales, las identificaciones provisionales tienen asteriscos: *m/z 1059 MC-HtyR, m/z 1045 MC-HtyR, m/z 1029 MC-FR, m/z 1015 MC-[Asp³]FR, **MC desconocidas de m/z 1031 y m/z 1045 con tiempos de retención más largos que MC-LR, *** m/z 839 L-HarNOD.

Tabla 2. Secuencias de cebadores, sondas de detección y sondas apagadoras

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	T _m /°C	Tipo oligonucleótido	de Especificidad
mcyBHF03A	GCTTTAATCCACAAGAAGCTTTATTAGC	56,1	Cebador directo	<i>Anabaena</i>
mcyBHF03M	AGATTTTAAATCCACAAGAAGCTTTATTAGC	56,1	Cebador directo	<i>Microcystis</i>
mcyBHF03P	GGTTAATCAACAAGAGGCTTTATTAGC	55,9	Cebador directo	<i>Planktothrix</i>
mcyBHR04	CTGTGCCCCTCCTAGTTCAAAAAATGACT	58,5	Cebador inverso	Los tres géneros diana
mcyB-aP	ACTGAATTATTGGAGGTAGAGGTGAGTGATAC	58,9	Sonda de detección	<i>Anabaena</i>
mcyB-aQ	CCTCTACCTCCAATAATTCA	43,6	Sonda apagadora	<i>Anabaena</i>
mcyB-mP	GGGTGAGTTATTAGAAGCAGAAAGTTAGTAACAG	58,4	Sonda de detección	<i>Microcystis</i>
mcyB-mQ	TTCGTCTCTAATAAATCACC	43,4	Sonda apagadora	<i>Microcystis</i>
mcyB-pP	GGGGTGAATTATTAGAAATAGAAAGTAAGTGACAA	59,2	Sonda de detección	<i>Planktothrix</i>
mcyB-pQ	TTACTTCTATTTCTAATAATTCACC	43,9	Sonda apagadora	<i>Planktothrix</i>

Tabla 3. Números de copias de *mcyB* específico de género, cantidades de microcistina y variantes de microcistina identificadas en 13 lagos de las islas Åland durante el período de tiempo de 14 de julio a 16 de julio de 2008.

Lago	Copias de <i>mcyB</i> /g de peso de muestra seca		Concentraciones de microcistina en equivalentes de MC-LR, µg totales de MC/g de peso de muestra seca		Variantes de microcistina identificadas por LC-MS-MS		
	<i>Anabaena</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Planktothrix</i>	HPLD-DAD	ELISA	LC-MS-MS	
Godby träsk	-	1,0 x 10 ⁸	-	40,4	62,2	24,5	dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dmMC-LR, MC-LR
Brantsböle träsk	4,1 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁸	-	43,0	94,0	95,3	MC-YR, dmMC-LR, MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF

Gloskärs träsk	-	-	0	6,6	0,67	dmMC-LR
Tjudö träsk	-	1,4 x 109	67,9	49,5	45,7	dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dmMC-LR, MC-LR, MC-LA
Markusbölefjärden	-	-	0	1,2	0,37	MC-LR
Nätö hemviken	-	3,9 x 1011	114,8	137,8	85,6	dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dmMC-LR, MC-LR
Hammarlands långträsk	-	1,3 x 109	0,97	1,5	1,65	MC-LR
Lemböte byträsk	-	2,8 x 1010	0	3,4	2,5	MC-YR, dmMC-LR, MC-LR
Vargata träsk	-	1,3 x 1011	78,3	145,1	71,3	dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dmMC-LR, MC-LR
Kaldersfjärden	-	1,3 x 109	3,3 x 108	8,3	11,8	MC-YR, dmMC-LR, MC-LR
Norsträsk	-	4,0 x 107	0	6,1	1,4	dmMC-LR, MC-LR
Långsjön	-	-	0	0,1	0	-
Slussfjärden	-	-	0	0,9	0	-

Referencias

- Al-Tebrineh, J., Gehringer, M.M., Akcaalan, R., Neilan, B.A., 2011. A new quantitative PCR assay for the detection of hepatotoxic cyanobacteria. *Toxicon* 57, 546-554.
- 5 Becker, S., Fahrbach, M., Boger, P., Ernst, A., 2002. Quantitative tracing, by Taq nuclease assays, of a *Synechococcus* ecotype in a highly diversified natural population. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4486-4494.
- Briand, E., Gugger, M., Francois, J.C., Bernard, C., Humbert, J.P., Quiblier, C., 2008. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) population. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3839-3848.
- 10 Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E., 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J. Bacteriol.* 185, 564-572.
- Fastner, J., Erhard, M., Carmichael, W.W., Sun, P., Rinehart, K.L., Ronicke, H., Chorus, I., 1999. Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Arch. Hydrobiol.* 45, 147-163.
- 15 Fiore, M.P., Genuario, D.B., da Silva, C.S., Shishido, T.K., Moraes, L.A, Cantusio Neto, R., Silva-Stenico, M.E., 2009. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. *Toxicon* 53, 754-761.
- Fortin, N., Aranda-Rodríguez, R., Jing, H., Pick, F., Bird, D., Greer, C.W., 2010. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5105-5112.
- Foulds, I.V., Granacki, A., Xiao, C., Krull, D., Castle, A, Horgen, P.A, 2002. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR. *J. Appl. Microbiol.* 93, 825-834.
- 20 Furukawa, K, Noda, N., Tsuneda, S., Saito, T., Itayama, T., Inamori, Y., 2006. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. *J Biosci Bioeng* 102, 90-96.
- Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K, Börner, T., 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch. Microbiol.* 180, 402-410.
- 25 Izaguirre, G., Jungblut, AD., Neilan, B.A., 2007. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. *Water Res.* 41, 492-498.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E., Antunes, M.B., de Melo Filho, D.A, Lyra, T.M., Barreto, V.S., Azevedo, S.M., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338, 873-878.
- 30 Kaebernick, M., Dittmann, E., Börner, T., Neilan, B.A, 2002. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 449-455.
- Kaebernick, M., Neilan, B.A., Börner, T., Dittmann, E., 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3387-3392.
- 35 Kaneko, T., Nakajima, N., Okamoto, S., Suzuki, I., Tanabe, Y., Tamaoki, M., Nakamura, Y., Kasai, F., Watanabe, A, Kawashima, K, Kishida, Y., Ono, A, Shimizu, Y., Takahashi, C., Minami, C., Fujishiro, T., Kohara, M., Katoh, M., Nakazaki, N., Nakayama, S., Yamada, M., Tabata, S., Watanabe, M.M., 2007. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *DNA Res.* 14, 247-256.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Fastner, J., Börner, T., 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix spp.* *Environ. Microbiol.* 6, 831-841.
- 40 Kurmayer, R., Kutzenberger, T., 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.
- Labarre, J., Chauvat, F., Thuriaux, P., 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171, 3449-3457.
- Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M., Sivonen, K, 1997. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Res.* 31,1005-1012.
- 45 Mbedi, S., Welker, M., Fastner, J., Wiedner, C., 2005. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 299-306.
- Metcalf, J.S., Hyenstrand, P., Beattie, KA., Codd, G.A., 2000. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. *J. Appl. Microbiol.* 89, 532-538.

- Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O.M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T.M., Rudi, K., Jakobsen, K.S., 2003. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J. Bacteriol.* 185, 2774-2785.
- 5 Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6353-6362.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Shirai, M., 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J Biochem* 126, 520-529.
- Nonnemann, D., Zimba, P.V., 2002. A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *J. Phycol.* 38, 230-233.
- 10 Nurmi, J., Wikman, T., Karp, M., Lövgren, T., 2002. High-performance real-time quantitative RT-PCR using lanthanide probes and a dual-temperature hybridization assay. *Anal. Chem.* 74, 3525-3532.
- Ostermaier, V., Kurmayer, R., 2009. Distribution and Abundance of Nontoxic Mutants of Cyanobacteria in Lakes of the Alps. *Microb. Ecol.* 58, 323-333.
- 15 Ouahid, Y., Pérez-Silva, G., del Campo, F.F., 2005. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environ. Toxicol.* 20, 235-242.
- Pilotto, L.S., Douglas, R.M., Burch, M.D., Cameron, S., Beers, M., Rouch, G.J., Robinson, P., Kirk, M., Cowie, C.T., Hardiman, S., Moore, C., Attewell, R.G., 1997. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust. N. ZeÅland J. Public Health* 21, 562-566.
- 20 Prinsep, M., Caplan, F., Moore, R., Patterson, G., Honkanen, R., Boynton, A., 1992. Microcystin-LA from a blue-green alga belonging to the stigonematales. *Phytochemistry* 31, 1247-1248.
- Rasmussen, J.P., Barbez, P.H., Burgoyne, L.A, Saint, C.P., 2008. Rapid preparation of cyanobacterial DNA for real-time PCR analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 14-19.
- 25 Rinta-Kanto, J.M., Ouellette, A.J., Boyer, G.L., Twiss, M.R, Bridgeman, T.B., Wilhelm, S.W., 2005. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4198-4205.
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R, Sivonen, K., 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 686-692.
- 30 Schober, E., Kurmayer, R., 2006. Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 412-417.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.P., Peleato, M.L., 2008. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ. Microbiol.* 10, 2476-2483.
- 35 Sivonen, K., 2008. Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 619, 539-557.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins, en: Bartram, J., Chorus, I. (Eds.). Spon Press, RU, pág. 41-111.
- Soini, E., Lövgren, T., 1987. Time-Resolved Fluorescence of Lanthanide Probed and Applications in Biotechnology. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 18, 105-154.
- 40 Spoof, L., Meriluoto, J., 2005. Analysis of microcystins by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection., en: Meriluoto, J., Codd, G.A (Eds.). Åbo Akademi University Press, Turku, Finlandia, pág. 77-84.
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J., 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1020, 105-119.
- 45 Staub, R., 1961. Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. Schweiz. Z. Hydrol. 23, 82-198.
- Stewart, I., Seawright, AA, Shaw, G.R., 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds-an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 619, 613-637.
- Svircev, Z., Krstic, S., Miladinov-Mikov, M., Baltic, V., Vidovic, M., 2009. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27, 36-55.

- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., Neilan, B.A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7, 753-764.
- 5 Turner, P.V., Gammie, A.J., Hollinrake, K, Codd, G.A, 1990. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *BMJ* 300, 1440-1441.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A, Watanabe, M.F., Park, H.D., Chen, G.C., Chen, G., Yu, S.Z., 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17, 1317-1321.
- 10 Vaitomaa, J., Rantala, A, Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Mokolke, L., Sivonen, K., 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.
- Vezie, C., Brient, L., Sivonen, K, Bertru, G., Lefeuvre, J., Salkinoja-Salonen, M., 1998. Variation of Microcystin Content of Cyanobacterial Blooms and Isolated Strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microb. Ecol.* 35, 126-135.
- 15 Welker, M., von Döhren, H., 2006. Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 530-563.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.
- Yu, S.Z., 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 674-682.

Listado de secuencias

<110> Turun Yliopisto

5 <120> Método y cebadores para la detección de una cianobacteria tóxica que produce microcistina

<160> 20

<170> BiSSAP 1.0

10 <210> 1
<211> 105
<212> ADN
<213> Microcystis aeruginosa UV027

15 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..105
<223> /mol_tipo="ADN"

20 /organismo="Microcystis aeruginosa UV027"

<400> 1
agattttaat ccacaagaag ctttattagc ttccctttgg ggtgagttat tagaagcaga 60
agttagtaac agtaatcagt ctttttttga actaggagga aacag 105

25 <210> 2
<211> 103
<212> ADN
<213> Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8

30 <220>
<221> fuente
<222> 1..103
<223> /mol_tipo="ADN"

35 /nota=" cebador A PCR"
/organismo="Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8"

<400> 2
ggtttaatca acaagaggct ttattagcct tggtttgggg tgaattatta gaaatagaag 60
taagtgacaa taatcagtca ttttttgaac tcggaggcaa tag 103

40 <210> 3
<211> 103
<212> ADN
<213> Anabaena sp.

45 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..103
<223> /mol_tipo="ADN"

50 /organismo="Anabaena sp."

<400> 3
gctttaatcc acaagaagct ttattagcct ccatttggac tgaattattg gaggtagagg 60
tgagtgatac taatcagtca ttttttgagc taggaggaaa tag 103

55 <210> 4
<211> 28
<212> ADN
<213> Anabaena sp.

60 <220>
<221> FUENTE

<222> 1..28
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Anabaena sp."

5 <400> 4
gctttaatcc acaagaagct ttattagc 28
 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN

10 <213> Microcystis aeruginosa UV027
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..30
 15 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Microcystis aeruginosa UV027"

<400> 5
agattttaat ccacaagaag ctttattagc 30
 20 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8

25 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..28
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8"

30 <400> 6
ggtttaatca acaagaggct ttattagc 28
 <210> 7
 <211> 28
 35 <212> ADN
 <213> Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8

<220>
 <221> FUENTE
 40 <222> 1..28
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8"

<400> 7
 45 **ctggtgcctc ctagttcaaa aaatgact** 28
 <210> 8
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Anabaena sp.

50 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..32
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota=" cebador A PCR"
 /organismo="Anabaena sp."

55 <400> 8
actgaattat tggaggtaga ggtgagtgat ac 32
 60 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Anabaena sp.

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..20
 5 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Anabaena sp."

<400> 9
 cctctacctc caataattca 20

10 <210> 10
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Microcystis aeruginosa UV027

15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..33
 20 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Microcystis aeruginosa UV027"

<400> 10
 gggtgagtta ttagaagcag aagttagtaa cag 33

25 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Microcystis aeruginosa UV027

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..21
 35 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota=" cebador A PCR "
 /organismo="Microcystis aeruginosa UV027"

<400> 11
 ttctgcttct aataactcac c 21

40 <210> 12
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8

45 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..34
 50 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota=" cebador A PCR"
 /organismo="Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8"

<400> 12
 ggggtgaatt attagaaata gaagtaagtg acaa 34

55 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8

60 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota=" cebador A PCR"
 /organismo="Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8"

<400> 13

	ttacttctat ttctaataat tcacc	25
	<210> 14	
	<211> 120	
	<212> ADN	
5	<213> Anabaena sp.	
	<220>	
	<221> FUENTE	
	<222> 1..120	
10	<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Anabaena sp."	
	<400> 14	
	caaattacta gctttaatcc acaagaagct ttattagcct ccatttggac tgaattattg	60
	gaggtagagg tgagtgatac taatcagtca ttttttgagc taggaggaaa tagtttaaag	120
15		
	<210> 15	
	<211> 120	
	<212> ADN	
	<213> Microcystis aeruginosa	
20		
	<220>	
	<221> FUENTE	
	<222> 1..120	
25	<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Microcystis aeruginosa"	
	<400> 15	
	caagtcaccag attttaatcc acaagaagct ttattagcct ccctttgggg tgagttatta	60
	gaagcagaag ttagtaacag taatcagtca ttttttgaac taggaggaaa cagtctgaag	120
30		
	<210> 16	
	<211> 120	
	<212> ADN	
	<213> Planktothrix agardhii	
35		
	<220>	
	<221> FUENTE	
	<222> 1..120	
40	<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Planktothrix agardhii"	
	<400> 16	
	caaccaactg ggtttaatca acaagaggct ttattagcct tggtttgggg tgaattatta	60
	gaaatagaag taagtgacaa taatcagtca ttttttgaac tggaggcaa tagtttaaaa	120
45		
	<210> 17	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Microcystis aeruginosa	
50		
	<220>	
	<221> FUENTE	
	<222> 1..28	
	<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Microcystis aeruginosa"	
55	<400> 17	
	agtcattttt tgaactagga ggcaacag	28
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	

<213> Anabaena <cyanobacteria>
 <220>
 <221> FUENTE
 5 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Anabaena <cyanobacteria>"
 <400> 18
 10 **tgaattattg gaggtagagg** 20
 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Microcystis aeruginosa
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..21
 20 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Microcystis aeruginosa"
 <400> 19
 25 **ggtgagttat tagaagcaga a** 21
 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Planktothrix agardhii
 <220>
 30 <221> FUENTE
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Planktothrix agardhii"
 35 <400> 20
ggtgaattat tagaaataga agtaa 25

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina en una muestra, que comprende las etapas de:

a) efectuar la lisis de las células de dicha muestra;

5 b) poner en contacto el ácido nucleico obtenido de las células lisadas en una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa con cebadores que hibridan con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3 en el gen *mcyB* presente en *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* y *Anabaena sp.*, en el que dichos cebadores amplifican al menos parte de dichas secuencias en el gen *mcyB*;

10 c) efectuar una reacción en cadena de la polimerasa con una mezcla de reacción obtenida de la etapa b), de modo que se amplifiquen las secuencias de dicho gen *mcyB*, si dichas secuencias están presentes en la muestra; y

d) detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico amplificadas de dicho gen *mcyB*, en el que la presencia de la secuencia del gen *mcyB* amplificada es indicativa de la presencia de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina en la muestra.

15 2. El método según la reivindicación 1, en el que al menos uno de los cebadores comprende una de las siguientes secuencias:

5'-GCTTTAATCCACAAGAAGCTTTATTAGC-3' (SEQ ID NO:4)

5'-AGATTTTAATCCACAAGAAGCTTTATTAGC-3' (SEQ ID NO:5)

5'-GGTTTAATCAACAAGAGGCTTTATTAGC-3' (SEQ ID NO:6)

5'-CTGTTGCCTCCTAGTTCAAAAAATGACT-3' (SEQ ID NO:7)

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha mezcla de reacción en cadena de la polimerasa es para reacción en cadena de la polimerasa instantánea.

4. El método según la reivindicación 3, en el que se usa al menos una de las siguientes sondas en la reacción:

5'-ACTGAATTATTGGAGGTAGAGGTGAGTGATAC-3' (SEQ ID NO:8)

5'-CCTCTACCTCCAATAATTCA-3' (SEQ ID NO:9)

5'-GGGTGAGTTATTAGAAGCAGAAGTTAGTAACAG-3' (SEQ ID NO:10)

5'-TTCTGCTTCTAATAACTCACC-3' (SEQ ID NO:11)

5'-GGGGTGAATTATTAGAAATAGAAGTAAGTGACAA-3' (SEQ ID NO:12)

20 5'-TTRACTTCTATTTCTAATAATTCACC-3' (SEQ ID NO:13)

5. El método según la reivindicación 3 o 4, en el que la reacción en cadena de la polimerasa instantánea es una reacción de PCR cuantitativa y el método comprende una etapa adicional de determinación del número de copias génicas del gen *mcyB* en dicha muestra.

25 6. El método según la reivindicación 5, que comprende una etapa adicional de monitorización de la concentración de microcistina tóxica en la muestra por correlación de dicho números de copias génicas obtenidos por PCR cuantitativa con la correspondiente concentración de microcistina.

7. Un kit para la detección de la presencia de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina en una muestra que comprende un conjunto de cebadores oligonucleotídicos como se expone en las SEQ ID NO: 4-7 y cualquiera de las sondas oligonucleotídicas como se expone en las SEQ ID NO: 8-13.

30 8. El kit según la reivindicación 7, en el que dichas cianobacterias tóxicas productoras de microcistina se seleccionan del grupo consistente en *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* y *Anabaena sp.*

9. Uso de un kit según la reivindicación 7 u 8 para la detección de la presencia de cianobacterias tóxicas productoras de microcistina en una muestra.

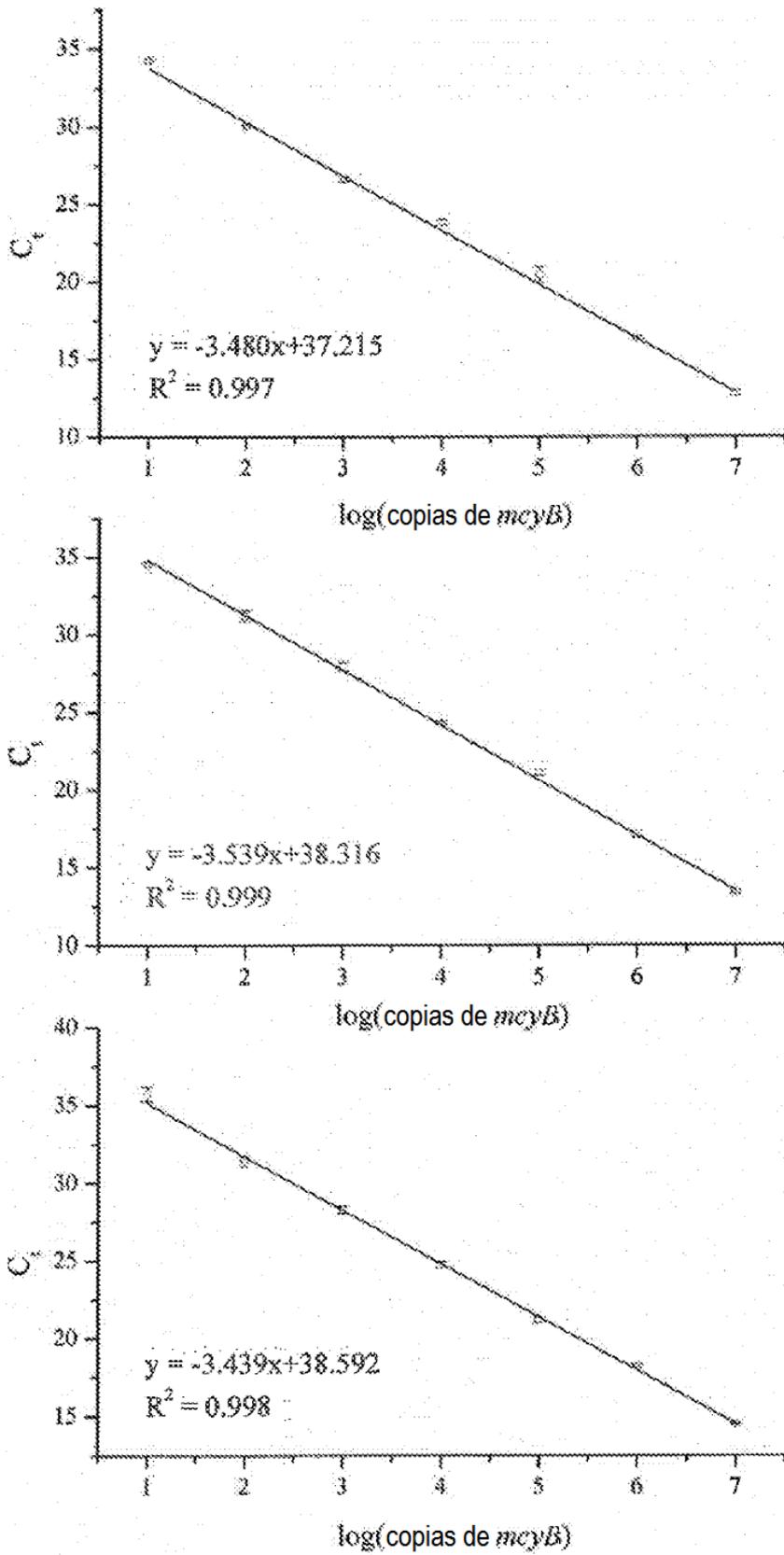


Figura 1

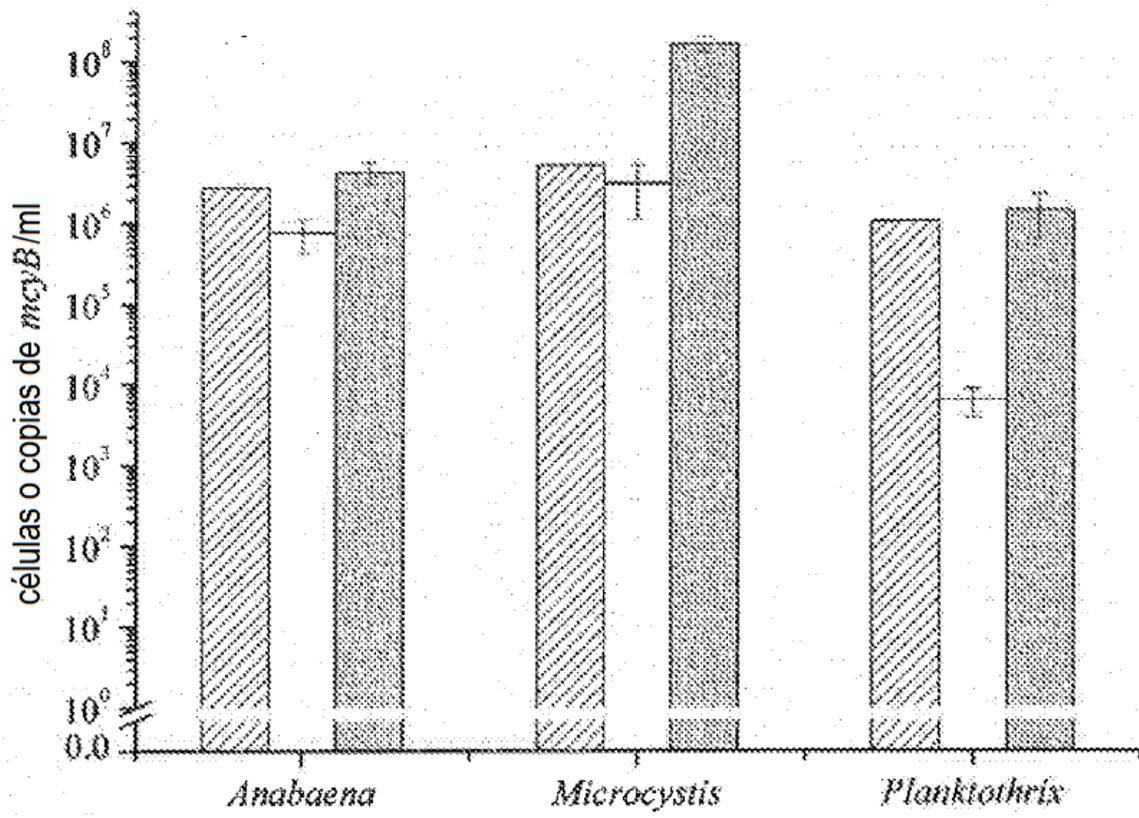


Figura 2

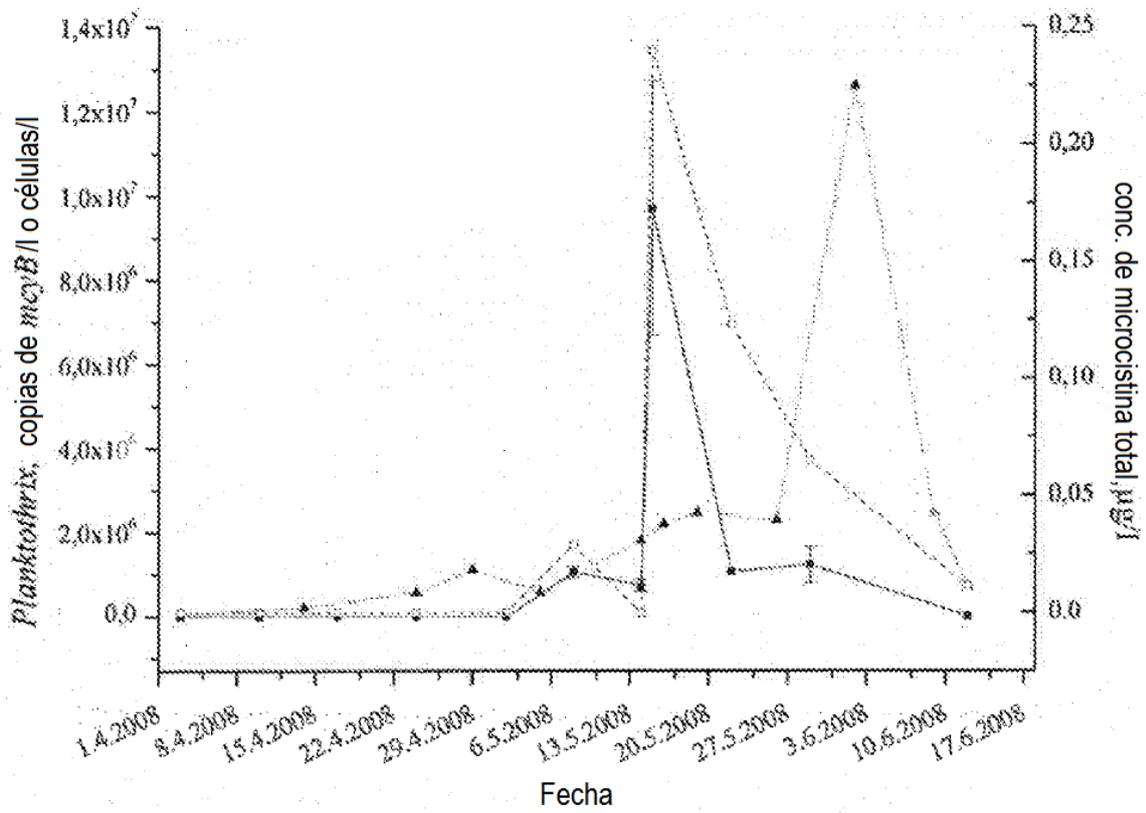


Figura 3

mcyB frente a ELISA

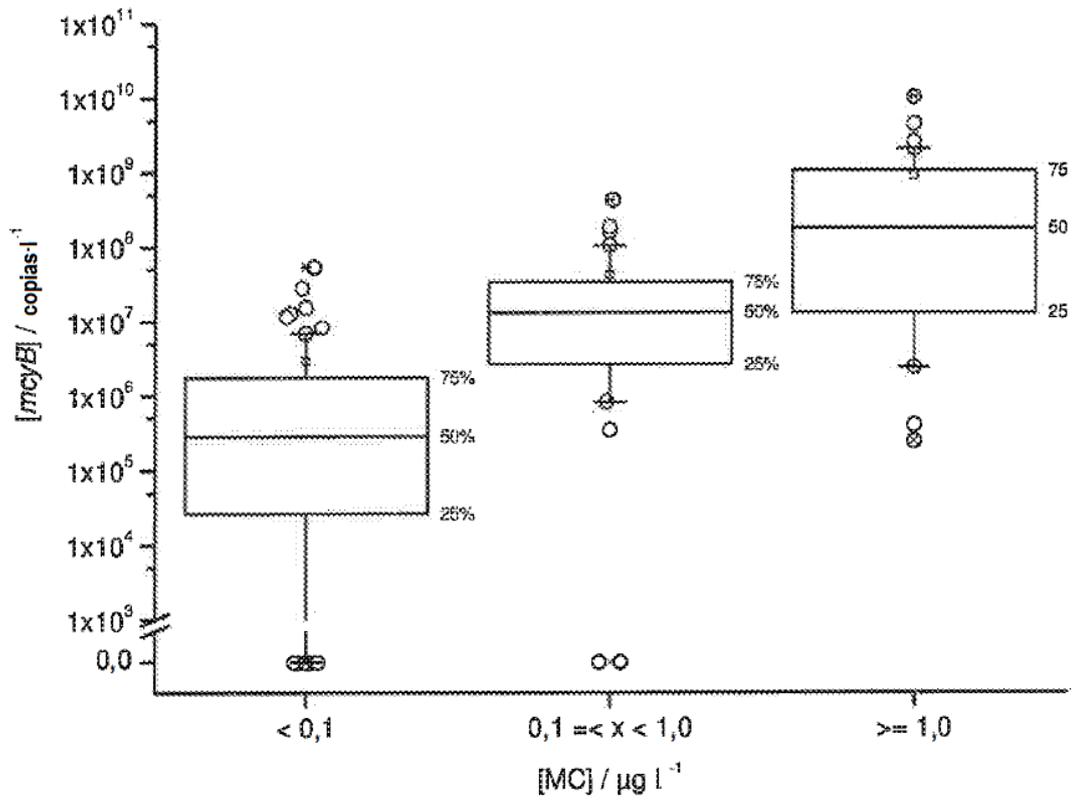


Figura 5

mcyB frente a HPLC

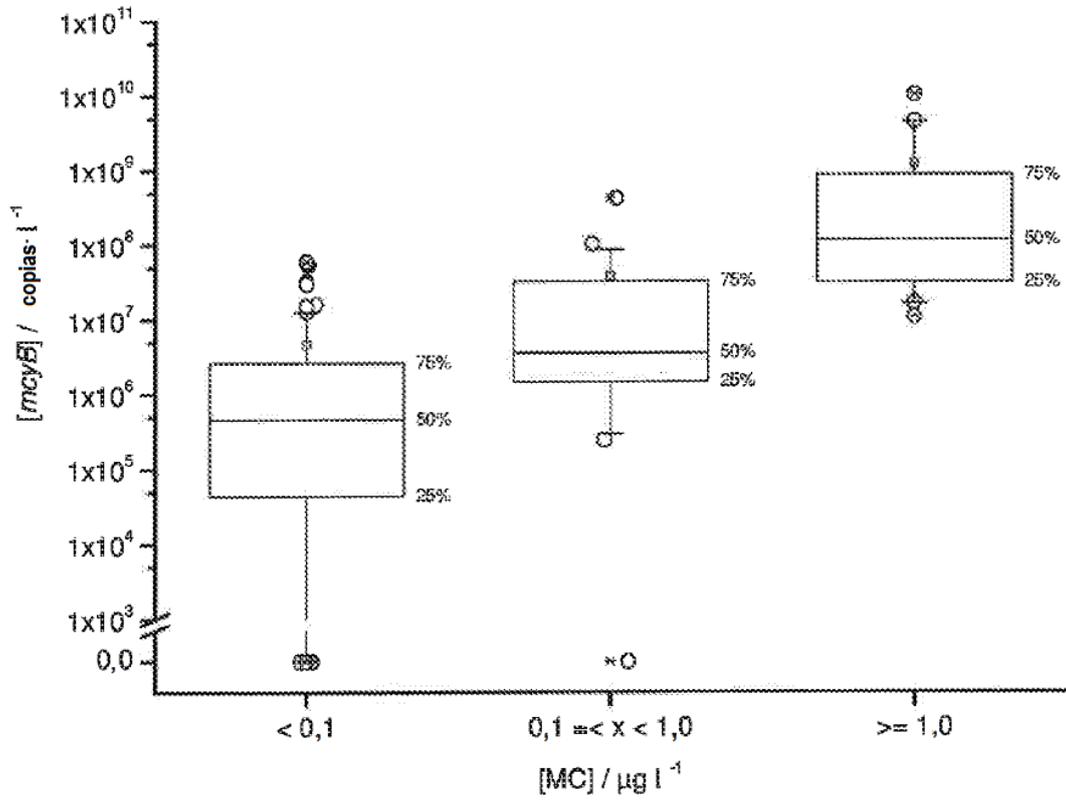


Figura 6

mcyB frente a LC-MS:

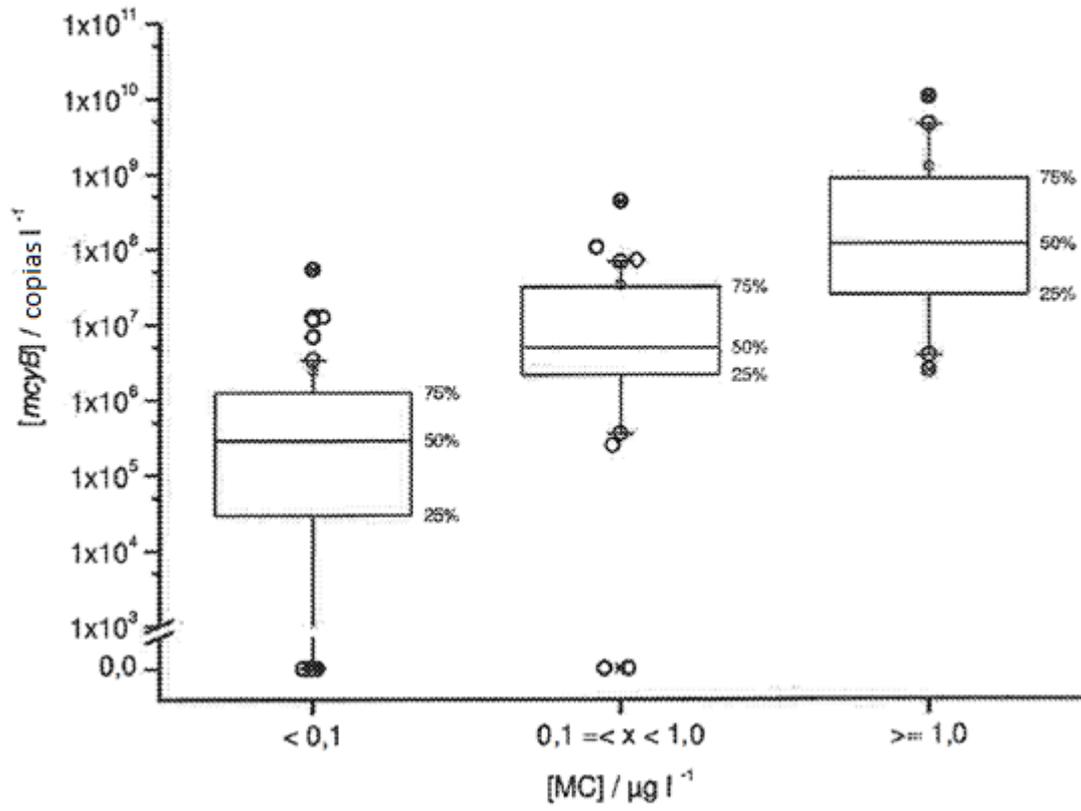


Figura 7