

## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS AISLADAS DE FLORECIMIENTOS DE TRES LAGOS URBANOS EUTRÓFICOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

Rosa Pineda-Mendoza<sup>1</sup>, Fernando Martínez-Jerónimo<sup>1</sup>,  
Gloria Garduño-Solórzano<sup>2</sup> y Roxana Olvera-Ramírez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Prol. Carpio Esq. Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomás, México, DF, 11340, México.

Correo electrónico: \*rolvera\_2000@yahoo.com.mx

<sup>2</sup>Herbario IZTA. FES-Iztacala-UNAM. Av. de los Barrios. núm.1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México.

### RESUMEN

Las cianobacterias se clasifican tradicionalmente con base en caracteres morfológicos y ecológicos, lo que puede resultar en una asignación incorrecta debido a la plasticidad fenotípica de las cianobacterias, o en el caso de cepas aisladas debido a cambios morfológicos propiciados por las condiciones de cultivo. El uso del gen 16S rRNA es de gran utilidad para la identificación taxonómica, coadyuvando a superar los problemas antes mencionados. En este estudio se aislaron e identificaron, mediante caracteres morfológicos y moleculares, cianobacterias filamentosas presentes en florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México, con el objetivo de reconocer otros géneros de cianobacterias diferentes a *Microcystis*, que pudieran estar presentes en tales florecimientos. Durante marzo de 2007 se colectaron muestras de agua y mediante micromanipulación se obtuvieron cultivos monocianobacteriales que fueron identificados preliminarmente con base en caracteres morfológicos. Por otra parte, se extrajo el DNA total, se amplificó

una región parcial del gen 16S rRNA y se corroboró la identificación taxonómica a través de su posicionamiento filogenético. De esta manera se pudo identificar a la mayoría de los aislados mediante caracteres morfológicos tradicionales, y confirmar su identidad genérica con base en el análisis bioinformático del gen 16S rRNA. Así se identificaron cepas de los géneros *Anabaenopsis*, *Arthrospira*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Geitlerinema*, *Phormidium*, *Planktolyngbya*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena* y *Spirulina*, resultado que muestra la diversidad que se puede registrar en florecimientos de cianobacterias, aun cuando el taxón dominante pudiera ser *Microcystis* spp. A fin de poder determinar de manera más precisa la identidad específica, se recomienda ampliamente el uso de ambas técnicas, ya que de esta forma se podrían evitar errores por variación fenotípica inducida por los estímulos ambientales o por las condiciones de cultivo.

**Palabras clave:** cianobacteria, florecimiento, 16S rRNA, eutroficación, lago urbano.

## ABSTRACT

Cyanobacteria are traditionally classified based on morphological and ecological traits, which can result in incorrect identifications due to phenotypic plasticity, and in the case of isolated strains, due to morphological changes provoked by the culture conditions. The gene 16S rRNA is useful for taxonomic identification, helping to overcome the aforementioned problems. Using morphological and molecular characteristics, we isolated and identified filamentous cyanobacteria present in blooms in three eutrophic urban lakes in Mexico City with the aim of recognizing genera of cyanobacteria other than *Microcystis* that may be present. Water samples were collected during March 2007, and through micromanipulation we obtained monospecific cultures that were preliminarily identified using morphological traits. In addition, total DNA was extracted, and a partial region of the 16S rRNA gene was amplified to corroborate the taxonomic identifications; these were confirmed through their phylogenetic positioning. In this way most of the isolated strains identified by their morphological traits could be confirmed at the generic level. We identified strains of *Anabaenopsis*, *Arthrospira*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Geitlerinema*, *Phormidium*, *Planktolyngbya*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena* and *Spirulina*, showing the diversity of cyanobacteria that could be recorded in blooms even though the dominant taxa could be *Microcystis* spp. To accurately determine taxonomic identity we strongly recommend the use of both techniques in order to avoid errors due to phenotypic variation provoked by environmental factors or culture conditions.

**Key words:** cyanobacteria, bloom, 16S rRNA, eutrophication, urban lake.

## INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos procariotas con una amplia diversidad morfológica, encontrándose formas unicelulares, coloniales y filamentosas (Whitton, 1992; Valerio *et al.*, 2009). Se distribuyen en ambientes terrestres, dulceacuícolas, marinos y algunas especies tiene la capacidad de crecer en ambientes extremos (alcalinos, ácidos y con altas temperaturas) (Whitton y Potts, 2000; Kaebernick y Neilan, 2001, Roset *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, las cianobacterias han sido clasificadas con base en caracteres morfológicos y ecológicos (Casamatta *et al.*, 2005); sin embargo, a pesar de los conocimientos especializados necesarios para la identificación, el juicio subjetivo de los usuarios puede llevar a errores, dando como resultado una asignación incorrecta de los aislamientos (Valerio *et al.*, 2009).

Así mismo, los cambios morfológicos inducidos por las condiciones de cultivo y la plasticidad fenotípica de las cianobacterias también pueden conducir a errores en la identificación taxonómica de las cepas (Rudi *et al.*, 1997; Lyra *et al.*, 2001; Valerio *et al.*, 2009); actualmente el uso de marcadores moleculares como el 16S rRNA resultan ser de gran utilidad para la identificación de cepas, ya que ayuda a superar los problemas antes mencionados.

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar mediante caracteres morfológicos y moleculares a cianobacterias filamentosas presentes en florecimientos de tres lagos ur-

banos eutróficos de la ciudad de México, con el fin de conocer otros géneros diferentes a *Microcystis* que pudieran ser potencialmente toxigénicos, ya que a pesar de que *Microcystis* es el principal productor de microcistinas (Codd *et al.*, 1999; Pflugmacher *et al.*, 1999; Pflugmacher y Wiegand, 2001), no es el único pues otros géneros como: *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Cilindrospermopsis* y *Pseudanabaena* (Hunter, 1998; Sivonen y Jones, 1999; Codd, 2000; De León y Yunes, 2001; Vasconcelos, 2001), que también tienen dicha capacidad, han sido poco estudiados ya que con frecuencia se encuentran en menor cantidad, comparativamente con *Microcystis*.

Esto es importante, ya que en México existen lagos urbanos con florecimientos frecuentes o permanentes, que están destinados a actividades deportivas y/o recreativas y que representan por lo tanto un riesgo latente para la biota residente y circundante. Se sabe que concentraciones altas de nutrientes favorecen el crecimiento acelerado del fitoplancton, siendo las cianobacterias los microorganismos dominantes en los cuerpos de agua eutroficados (Paerl *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2006) ocasionando la formación de cúmulos de biomasa, conocidos como *blooms* o florecimientos (Sivonen y Jones, 1999; Fontúrbel, 2003; Ramírez *et al.*, 2004; Frías *et al.*, 2006; Vela *et al.*, 2007; Briand *et al.*, 2008), que generalmente se asocian con la producción de una serie de metabolitos secundarios que incluyen a estas toxinas (Neilan *et al.*, 1999; Briand *et al.*, 2008; Pope y Patel, 2008).

Algunos de estos metabolitos tienen propiedades terapéuticas (antibacteriana, antifúngica, inhibición de las proteasas o actúan contra el cáncer), otros como la geosmina y

el 2-metilisoborneol son compuestos que le confieren un mal olor o sabor desagradable al agua (Oberholster *et al.*, 2006; Pope y Patel, 2008), o bien pueden actuar como toxinas ocasionando daño a diversos organismos (Carmichael *et al.*, 1988; Jang *et al.*, 2003; Prakash *et al.*, 2009).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Áreas de estudio

Se estudiaron tres lagos urbanos de la ciudad de México ubicados en el bosque de Chapultepec 1ª Sección, el parque ecológico "Alameda Oriente" y en la pista olímpica de remo y canotaje "Virgilio Uribe"- Cuernavaca, Xochimilco. En dichos sitios se tiene el registro de desarrollo de *blooms* de cianobacterias con predominio de *Microcystis* (Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010).

El lago menor se encuentra en la primera sección del bosque de Chapultepec, está ubicado en la delegación Miguel Hidalgo, entre las coordenadas 19°25'25.90"N y 99°11'5.03"W, a una altitud de 2 240 m.s.n.m., tiene una extensión de 8 400 m<sup>2</sup> y una profundidad promedio de 1.65 m. La alimentación del lago proviene del río Hondo, de la planta de tratamiento de aguas residuales de Chapultepec y de agua pluvial (Alcocer *et al.*, 1988).

El parque ecológico Alameda Oriente, antes conocido como Laguna de Xochiaca, está ubicado en la delegación Venustiano Carranza, entre las coordenadas 19°26'13.09"N-19°26'8.36"N y 99°3'15.36"W-99°3'22.19"W, a una altitud de 2 234 m.s.n.m. Construido en 1989, es un parque destinado a actividades recreativas, y cuenta con cinco estanques con área total

de 11 hectáreas. El agua suministrada al lago proviene del Lago de Aragón ubicado en la delegación Gustavo A. Madero (<http://www.alamedaoriental.org.mx>).

La pista olímpica de remo y canotaje “Virgilio Uribe” se sitúa al sur de la ciudad de México, en la delegación Xochimilco, entre las coordenadas 19°16'20.58"N y 99°6'16.72"W; cuenta con dos canales, el principal se utiliza para prácticas de remo y canotaje, tiene 2 200 m de longitud, 125 m de ancho y alrededor de 2 m de profundidad, corre de norte a sur; el canal secundario o canal de retroceso, sirve para entrenamiento en días de pruebas o eliminatorias deportivas. Se llena con aguas tratadas y pluviales (Alva Martínez *et al.*, 2007; [http://mx.geocities.com/lakeside\\_remo/Varios.htm](http://mx.geocities.com/lakeside_remo/Varios.htm)).

#### Colecta de las muestras

Las muestras de agua se colectaron en los tres sitios de estudio en marzo del 2007, haciendo un arrastre con una red para fitoplankton (malla de 25  $\mu\text{m}$ ). Las muestras de agua se filtraron en el laboratorio con membranas Millipore® de 22  $\mu\text{m}$  y en el agua se evaluó la temperatura, oxígeno disuelto (oxímetro, YSI-55), conductividad, salinidad (YSI-30), pH (potenciómetro Thermo-Orion 3 Star), concentración de fosfatos (método 8114, del molibdovanadato) y de nitratos (método 8153, de reducción de cadmio), estas dos últimas en un espectrofotómetro HACH DR/2000, siguiendo las especificaciones del proveedor.

#### Aislamiento de las cepas

Las cepas se aislaron por micromanipulación, seleccionando un solo filamento al mi-

croscopio, éste se colocó en un vial de vidrio de 8 mL de capacidad con 2 mL del medio de cultivo adicionado con  $\text{NaHCO}_3$ . Una vez que fue visible el crecimiento, se sembraron inóculos en placas por estría cruzada hasta obtener cultivos monocianobacteriales. Se utilizó medio mineral BG-11 líquido y solidificado al 1.3% con agar bacteriológico (Rippka, 1988), adicionados ambos con cicloheximida (50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , Sigma) para eliminar a todos los organismos eucariontes (Vaara *et al.*, 1979). Los aislados fueron cultivados en medio mineral BG-11, excepto *Arthrospira* sp., que se propagó en medio Zarrouk (1966). Los cultivos se mantuvieron con aireación constante, iluminación con luz blanca (21.4  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fotoperiodo de 16:8 h (luz: oscuridad), a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , en matraces Erlenmeyer de 500 mL.

#### Identificación taxonómica

Las cepas fueron teñidas con azul de cresil al 1% y observadas con un microscopio óptico Nikon Alphaphot 2 YS2. La identificación taxonómica se hizo con base en las claves de Geitler (1932), Anagnostidis y Komárek (1985, 1988), Komárek y Anagnostidis (1989) y Cronberg y Annadotter (2006). Las características morfológicas de los aislados consideradas para la identificación taxonómica fueron las siguientes: forma y tamaño de las células intercalares y terminales del filamento; grosor del filamento; presencia o ausencia de constricciones en el cruce de la pared; presencia de células necridiales; ausencia o presencia y color de la vaina; número de tricomas por filamentos, presencia, forma y tamaño de los heterocitos. Las medidas fueron registradas usando el software Motic Image Plus 2.0.

### Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA total se hizo por el método del CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) descrito por Allers y Lichten (2000). Para cada cepa se usaron 50 mg de biomasa (de aproximadamente 15 días de crecimiento); las muestras se congelaron y maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino; se adicionaron 2.5 mL de la solución CTAB I (CTAB 2%, EDTA 50 mM, TRIZMA BASE 200 mM pH 8.0, NaCl 2 M y PVP 0.5%) (Sigma); se incubaron durante 30 min y después de centrifugar y separar la fase acuosa, se adicionó 1/10 volumen del CTAB II (CTAB 10% y NaCl 0.7 M). La extracción de proteínas se hizo con una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v); el DNA se precipitó con isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2 h y se recuperó por centrifugación. La pastilla de DNA se lavó con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en agua desionizada estéril. Las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El DNA genómico se separó en geles de agarosa al 1% con TBE 1X (Tris-HCl 45 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, ácido bórico 45 mM), como regulador de corrimiento electroforético, el cual se llevó a cabo a 80 V por 90 min con un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen). Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio ( $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma) y las bandas se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta (Alpha Innotech Imager 2000). Para conocer la pureza y concentración del DNA extraído, se determinó la relación de las absorbancias 260/280 nm (MBA 2000, Perkin Elmer, Waltham, MA).

### Amplificación parcial del gen 16S rRNA

Se amplificó una región parcial de aproximadamente 1 000 pb del gen 16S rRNA con el iniciador delantero CYAF (5'-AGCAGTGGGGAATTTTCCG-3'), que corresponde a las posiciones N315-N337 del gen 16S rRNA de *Anabaena variabilis* (75906225) y dos iniciadores reversos CYAAR (5'-TTCACYGCAGTATGCTGACC-3') y CYACR (5'-TCACYGCCGTATGCTGACC-3') que corresponden a las posiciones N1300-N1320 de *A. variabilis*. Los iniciadores fueron diseñados por la M. en C. Yendi Navarro Noya.

La amplificación se hizo en un termociclador T-personal Biometra® y se usaron 50 ng de DNA total, regulador de la enzima (1x),  $\text{MgCl}_2$  (4.5 mM), dNTP's (200  $\mu\text{M}$ , Invitrogen), 10 pmol de cada iniciador y 0.5 U *Taq* polimerasa (Invitrogen), en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de la reacción fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$  por 10 min, seguido de 35 ciclos, desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min, alineamiento  $53^{\circ}\text{C}$  por 1 min y extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 min; y un ciclo de extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Como testigos positivos se usaron dos cepas de referencia correspondientes a *Anabaena flos-aquae* (LB2358) y *Microcystis aeruginosa* (LB2385), adquiridas de la colección de la Universidad de Texas (UTEX).

### Análisis bioinformático

Las muestras purificadas fueron secuenciadas en ambos sentidos con los iniciadores CYAF y CYACR usados en la amplificación del gen 16S rRNA, en un equipo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosyste-

ms). Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el programa Chromas v. 2.13. Se generaron secuencias consenso con el programa BioEdit v.5.0.6 (Hall, 2001), las cuales se alinearon y compararon con las depositadas en el banco de genes usando el programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Para el análisis del 16S rRNA se incluyeron 30 secuencias de referencia obtenidas del GenBank. Las secuencias problema y aquellas obtenidas del banco de genes se alinearon con el programa Clustal X v.1.83 (Thompson *et al.*, 1997), utilizando los parámetros pre-determinados. Con la finalidad de conocer la identidad entre ellas se calculó el porcentaje de similitud con el programa MatGAT v. 2.01 (tabla 2) (Campanella *et al.*, 2003).

La identificación taxonómica de las cepas analizadas se llevó a cabo a través de su posicionamiento filogenético por medio del método de máxima verosimilitud (ML). Para ello se determinó el modelo de sustitución nucleotídica para el conjunto total de secuencia con el programa MODELTEST v.3.7 (Posada y Crandall, 1998).

La reconstrucción del árbol filogenético se hizo en el programa PhymI v. 2.4.4 (Guindon *et al.*, 2005) usando los siguientes parámetros: modelo evolutivo K80+I+G (Kimura, 1980), I = 0.3540, corrección gamma = 0.3360, ti/tv = 1.5438, -lnL = 5521.5572 y con el soporte bootstrap con 1 000 repeticiones. Por último, el árbol filogenético fue editado con el programa Dendroscope v.1.4. La cianobacteria unicelular *Microcystis aeruginosa* UTEX LB2385 se usó como grupo externo.

Las secuencias de nucleótidos determinadas en este estudio fueron depositadas en la base

de datos del GenBank y se les asignaron los siguientes números de acceso: AA09 (GU903485), AA10 (GU903486), AB02 (GU903487), AC11 (GU903488), AC12 (GU903489), AD13 (GU903490), AD17 (GU903491), AD26 (GU903492), CH04 (GU903493), CH12 (GU903494), CHM1 (GU903496), PO01 (GU903497), PO05 (GU903498) y PO07 (GU903499).

## RESULTADOS

### Descripción de las áreas de estudio

Las variables fisicoquímicas del agua colectada en las tres áreas de estudio se muestran en la tabla 1. En las fechas de muestreo la temperatura del agua osciló entre los 20-21°C, el oxígeno disuelto entre los 4.4 y 8.7 mg L<sup>-1</sup>; en los tres sitios el pH fue mayor a 10, la conductividad fue mayor en las muestras de agua de la Alameda Oriente variando entre 1923-4439  $\mu\text{S cm}^{-2}$ , en el quinto estanque de la Alameda Oriente la salinidad fue mayor (2.4 u.p.s.) con respecto a los otros cuatro estanques; en todas las áreas de estudio se encontró una mayor concentración de fosfatos (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup> que de nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). El estanque núm. 1 de la Alameda Oriente fue excluido de este estudio, debido a que en el momento de la colecta no se encontró crecimiento de cianobacterias.

En los tres lagos urbanos se encontró a *Microcystis* spp. como taxa dominante; sin embargo, otras cianobacterias como *Arthrospira* sp. (para el quinto estanque de la Alameda Oriente) y *Planktothrix agardhii* (para la Pista Olímpica de Remo y Canotaje) también se presentaron en forma abundante.

**Tabla 1.** Variables fisicoquímicas del agua colectada en los tres sitios de colecta.

Fecha de colecta	Localidad	Temperatura (°C)	pH	Conductividad ( $\mu\text{S cm}^{-2}$ )	Oxígeno disuelto ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Salinidad (u.p.s.)	$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mgL}^{-1}$ )	$(\text{PO}_4)^{3-}$ ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Proporción $\text{NO}_3^-/(\text{PO}_4)^{3-}$
08-03-2007	Chapultepec 1 <sup>a</sup> sección	20	10.57	513	7.3	0.2	1.5	1.75	0.857
13-03-2007	2 <sup>o</sup> estanque	20	10.74	1923	5.7	1.0	0.6	4.4	0.136
13-03-2007	Alameda 3 <sup>er</sup> estanque	21	10.56	2413	5.6	1.2	0.9	5.28	0.170
13-03-2007	Oriente 4 <sup>o</sup> estanque	21	10.41	2736	5.3	1.4	0.9	6.03	0.149
13-03-2007	5 <sup>o</sup> estanque	21	10.25	4439	4.4	2.4	1.0	6.12	0.166
15-03-2007	Pista olímpica	20	10.28	914	8.7	0.5	0.7	1.62	0.430



El desarrollo de los *blooms* en los lagos de Chapultepec 1ª Sección y de la Alameda Oriente se observaron como la formación de una nata espesa (“scum”) y espuma en la superficie de ambos lagos, mientras que en la Pista Olímpica de Remo y Canotaje sólo se observó la formación de espuma en las orillas de la pista, ya que la segunda especie dominante fue *P. agardhii* y esta cianobacteria no tiene la capacidad de formar natas debido a que su crecimiento es en forma dispersa (Chorus y Bartram, 1999).

#### Identificación taxonómica de los aislados

Se obtuvo un total de 17 aislados, los cuales fueron identificados primeramente con base en sus características morfológicas hasta género y/o especie y se agruparon en diez géneros distribuidos en dos órdenes. Posteriormente, dicha identificación se complementó con base en el análisis bioinformático de una región parcial del gen 16S rRNA; en la tabla 2 se muestra el número de aislados por localidad y la identificación taxonómica con ambos métodos.

Todas las cianobacterias aisladas en este estudio son planctónicas; en la tabla 3 se presentan las características morfológicas de cada una de las morfoespecies aisladas y en la figura 1 se muestran las fotografías de algunos de los aislados. Cabe mencionar que todos los taxa identificados en las tres áreas de estudio han sido documentados como responsables de la formación de florecimientos cianobacteriales.

#### Análisis filogenético

En la figura 2 se muestra el árbol filogenético reconstruido por el método de máxima verosimilitud a partir de las secuencias parciales

del gen 16S rRNA. El análisis filogenético permitió corroborar la identificación taxonómica de la mayoría de los aislados, de tal forma que éstos se distribuyen en grupos que corresponden con la identificación presuntiva basada en caracteres morfológicos. En la topología del árbol se puede observar la distribución de los aislados en cuatro grupos, conforme al orden que pertenecen, de tal forma que en Nostocales se encuentra el aislado AC12 (*Anabaenopsis*) y la cepa de referencia *Anabaena flos-aquae* UTEX LB2358, el resto de los aislados pertenecen a Oscillatoriales se distribuyen en dos grandes grupos y la cepa de referencia *Microcystis aeruginosa* UTEX LB2385 en el orden Chroococcales. Se pudo confirmar la identificación de los aislados CHM1 (*Leptolyngbya tenerrima*), CH04 (*Geitlerinema carotinosum*), CH12 (*Leptolyngbya boryana*), AC11 (*Spirulina*), AC12 (*Anabaenopsis*), AD17 (*Phormidium pseudopristleyi*), PO01 (*Planktothrix agardhii*) y PO07 (*Limnothrix redekei*) (tabla 2).

Los aislados AA09 y AA10 presentaron una similitud del 90.3 y 90.7%, respectivamente, con *Geitlerinema redekei* (EU196642); sin embargo, con base en sus características morfológicas fueron identificados como *Planktoleptolyngbya* sp. Así mismo, el aislado AB02 fue identificado previamente como *Limnothrix* sp. y presentó un 91.3% de similitud con la cepa *Leptolyngbya foveolarum* (EU196617), por último en el caso de los aislados AD13, AD26 y PO05 se obtuvo un 94.8, 94.1 y 95.1% de similitud, respectivamente, con *Spirulina laxissima* (DQ393278); sin embargo, dicha identificación no corresponde con la morfológica (tabla 1). De los aislados AA07, AD25 y AD13-Z no se obtuvieron productos de amplificación.



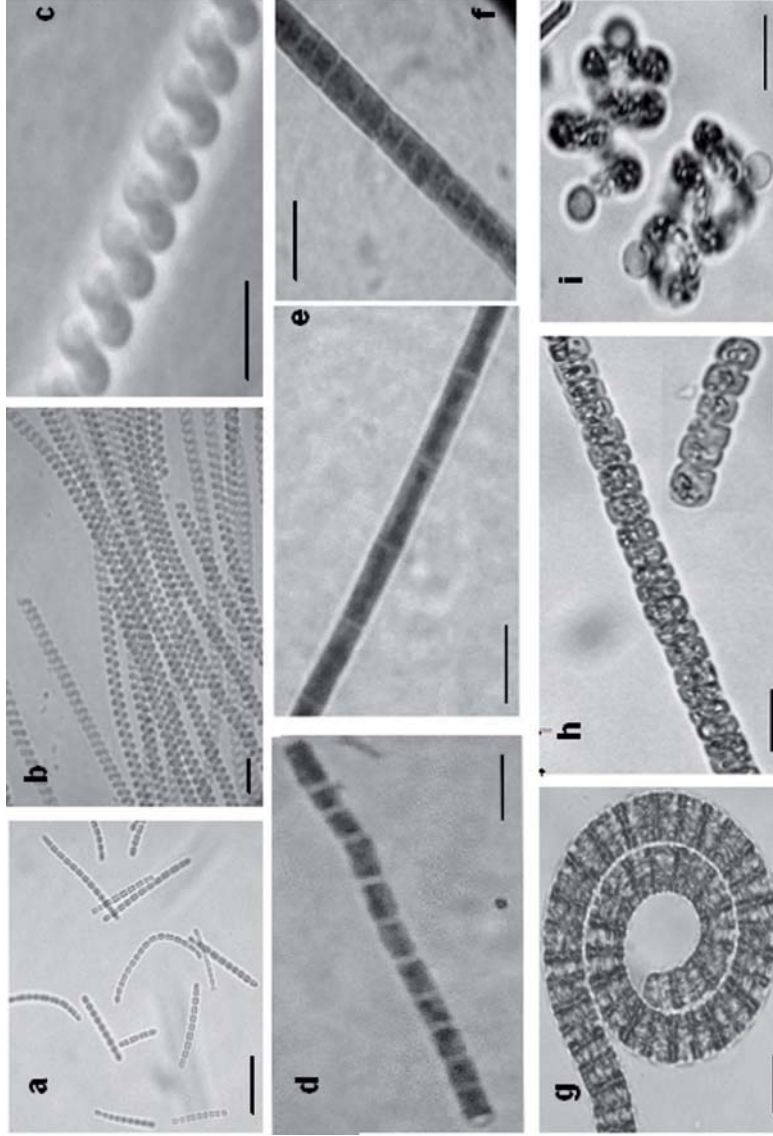
**Tabla 2.** Relación de las cianobacterias aisladas por área de estudio y su identificación taxonómica por caracteres morfológicos y con base en la secuencia nucleotídica parcial del gen 16S rRNA.

Área de estudio	Cepas	Identificación		% de similitud	Subfamilia	
		Morfológica	Molecular (16S rRNA)			
Chapultepec 1 <sup>a</sup> Sección	CHM1	<i>Leptolyngbya</i> sp.	<i>Leptolyngbya tenerima</i>	98.6	Leptolyngbyoideae	
	CH12	<i>Leptolyngbya</i> sp.	<i>Leptolyngbya boryana</i>	98.1	Leptolyngbyoideae	
	CH04	<i>Geitlerinema</i> sp.	<i>Geitlerinema carotinosum</i>	98.6	Pseudanabaenoide	
	AA07	<i>Planktolyngbya</i> sp.	No determinado		Leptolyngbyoideae	
	AA09	<i>Planktolyngbya</i> sp.	<i>Geitlerinema redekei</i>	90.3	Leptolyngbyoideae	
	AA10	<i>Planktolyngbya</i> sp.	<i>Geitlerinema redekei</i>	90.7	Leptolyngbyoideae	
	AB02	<i>Limnothrix</i> sp.	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	91.3	Limnothrichoideae	
	AC11	<i>Spirulina subsalsa</i>	<i>Spirulina subsalsa</i>	96.0	Spirulinoideae	
	AC12	<i>Anabaenopsis</i> sp.	<i>Anabaenopsis elenkini</i>	96.9	Anabenoideae	
	Alameda Oriente	AD17	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Phormidium pseudopristleyi</i>	97.9	Phormidioideae
		AD13	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	<i>Spirulina laxissima</i>	94.8	Pseudanabaenoideae
		AD25	<i>Planktolyngbya</i> sp.	No determinado		Leptolyngbyoideae
AD26		<i>Pseudanabaena mucicola</i>	<i>Spirulina laxissima</i>	94.1	Pseudanabaenoideae	
AD13-Z		<i>Arthrospira</i> sp.	No determinado		Spirulinoideae	
PO01		<i>Planktothrix agardhii</i>	<i>Planktothrix agardhii</i>	98.7	Phormidioideae	
PO05		<i>Pseudanabaena</i> sp.	<i>Spirulina laxissima</i>	95.1	Pseudanabaenoideae	
Pista olímpica de remo y canotaje	PO07	<i>Limnothrix</i> sp.	<i>Limnothrix redekei</i>	98.1	Limnothrichoideae	

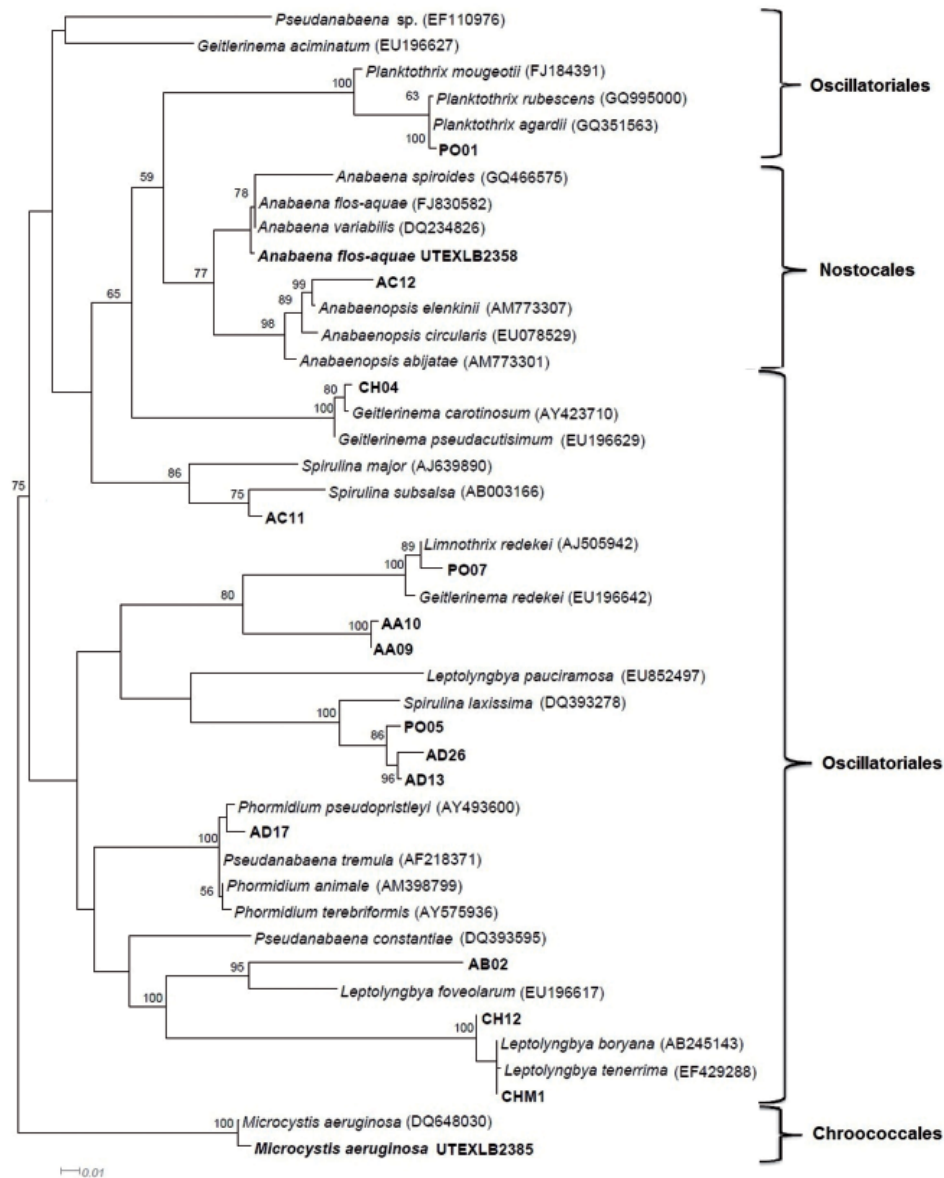
Tabla 3. Características morfológicas de los taxa aislados.

Taxa	Tricoma	Célula		Forma	Células		Observaciones
		Longitud	Ancho		Apicales		
<i>Leptolyngbya</i> sp.	Largos, forman cúmulos macroscópicos	9.18±2.65 (4-13.5)	1.83±0.17 (1.5-2.1)	Isodiamétricas Cilíndricas	Cilíndricas		Con vaina fina, delgada e incolora.
<i>Geitlerinema</i> sp.	58.34±30.97 (18.9-115.3)	2.3±0.432 (1.6-3.1)	1.28±0.20 (0.9-1.7)	Cilíndricas, alargadas	Reducidas ligeramente en los extremos		Células con gránulos prominentes (carotenoides)
<i>Planktolyngbya</i> sp.	255.83±136.82 (53.8-534.1)	6.24±1.66 (2.7-9.0)	1.86±0.22 (1.6-2.3)	Cilíndricas más largas que anchas	Redondeadas		Filamentos solitarios con vaina firme.
<i>Limnothrix</i> sp.	87.03±43.82 (34.9-200.3)	3.56±0.57 (2.2-4.6)	1.43±0.12 (1.2-1.6)	Más largas que anchas	Cilíndricas		Filamentos rectos, con vaina fina e incolora.
<i>Anabaenopsis</i> sp.	Solitarios de flotación libre, arqueados	5.99±1.3 (3.8-8.0)	3.02±0.33 (2.3-3.7)	Con forma de barril, más largas que anchas	Cilíndricos		Heterocito esférico, terminales, 3.63±0.58 (3.0-3.8)
<i>Spirulina subsalsa</i>	En espiral, 63.09±83.04 (41.6-351.1)	—	3.07±0.14 (2.8-3.4)	Cilíndricas, sin división de las paredes	Cilíndricas		Giro de 2.26±0.18 Con intensa movilidad
<i>Phormidium</i> sp.	647.29±254.32 (103.5-1043.0)	3.19±0.69 (2.2-4.1)	3.76±0.42 (2.3-4.2)	Cilíndricas, ± isodiamétricas, atenuada.	Redondeada, atenuada, sin caliptra		Necridio de 2.5 µm; con vaina en forma de tubo, incolora
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	15.53±7.00 (5.3-29.7)	1.25±0.22 (0.9-1.6)	1.25±0.22 (0.9-1.6)	Cilíndricas, con ligeras constricciones en las paredes	Cónica		Filamentos ligeramente arqueados, con ligera movilidad.
<i>Arthrospira</i> sp.	658.11±179.64 (356.50-944.30)	—	11.05±0.95 (9.50-12.5)	Cilíndricas con divisiones visibles	Cilíndricas no atenuada		Filamentos en espiral, móviles. Hormogonios de 209. 8-236.2
<i>Planktothrix agardhii</i>	178.93±64.23 (53.8-277.5)	3.39±0.49 (2.8-4.2)	3.09±0.30 (2.5-3.6)	Ligeramente más cortas que anchas	Redondeada sin caliptra		Con aerotopos en toda la célula

Nota: Medidas dadas en micrómetros (µm).



**Fig. 1.** Fotografías de las cianobacterias aisladas en las tres áreas de estudio. a: *Pseudanabaena mucicola*; b y c: *Spirulina subsalsa*; d: *Leptolyngbya* sp.; e: *Phormidium* sp.; g: *Arthrospira* sp.; f: *Planktothrix agardhii*; i: *Anabaenaopsis* sp.  
Barra = 10  $\mu$ m



**Fig. 2.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las secuencias nucleotídicas parciales del gen 16S rRNA. En negritas se observan los aislados de las cianobacterias obtenidos en este estudio y las cepas de referencia *Microcystis aeruginosa* UTEX LB2385 y *Anabaena flos-aquae* UTEXLB2358. Los valores de bootstrap >50% se indican en las ramas. Los números de acceso de las secuencias de referencias se encuentran entre paréntesis.

## DISCUSIÓN

Tradicionalmente las cianobacterias han sido clasificadas con base en sus caracteres morfológicos, aunque esta forma de identificarlas es compleja debido a que estos microorganismos, pese a que tengan la misma información genética, pueden cambiar su morfología por influencia de diversos factores ambientales (Anagnostidis y Komárek 1985, 1988; Moffitt *et al.*, 2001; Rajaniemi *et al.*, 2005).

Por otra parte, las cianobacterias que se desarrollan como filamentos finos (como es el caso de *Planktolyngbya*, *Leptolyngbya*, *Geitlerinema* y *Limnothrix*) representan un problema taxonómico adicional, debido a que presentan pocas características morfológicas distintivas entre ellas, y aún no se ha podido esclarecer si las pequeñas diferencias que se pueden distinguir con equipo óptico reflejan diferentes genotipos, o más bien son consecuencia de su plasticidad fenotípica. Por lo tanto, estas cianobacterias en forma de hilos delgados a menudo han sido agrupadas por diferentes autores en clasificaciones morfológicas distintas (Zwart *et al.*, 2005).

A este respecto, el análisis bioinformático del gen 16S rRNA permitió en este estudio corroborar la identificación taxonómica hecha con base en caracteres morfológicos en la mayoría de los aislados, descartando cualquier variación fenotípica entre una misma cepa.

Asimismo, el uso de dicho marcador proporcionó un mayor grado de resolución en los taxones de cianobacterias identificados que cualquiera de las características morfológicas observadas, ya que en el caso de los aislados CHM1 (*Leptolyngbya tenerrima*),

CH04 (*Geitlerinema carotinosum*), CH12 (*Leptolyngbya boryana*), AD17 (*Phormidium pseudopristleyi*), PO01 (*Planktothrix agardhii*) y PO07 (*Limnothrix redekei*), se logró identificarlos hasta especie, y éstos se agruparon con las cepas del banco de genes con las que presentaron un mayor porcentaje de similitud (>97.5%). En el caso de los aislados AC11 (*Spirulina*) y AC12 (*Anabaenopsis*) únicamente se lograron identificar hasta género presentando un porcentaje de similitud mayor al 95%.

Estos resultados coinciden con lo determinado por otros autores, quienes mencionan que los estudios filogenéticos de cianobacterias, basados en la secuencia del 16S rRNA, son de gran utilidad para una identificación taxonómica confiable (Wilmotte *et al.*, 1994; Nelissen *et al.*, 1996; Nübel *et al.*, 1997).

Por el contrario, en el caso del aislado AB02, no se pudo relacionar la identificación morfológica con la molecular, e incluso al analizar la topología del árbol se observó que este aislado no se distribuye con las secuencias correspondientes a *Limnothrix* sp., taxón identificado por caracteres morfológicos, sino con las de *Leptolyngbya foveolarum* y *Pseudanabaena* spp. Para este último taxón algunos autores indican que *Pseudanabaena* y *Limnothrix* tienen gran parecido morfológico, lo que dificulta su correcta identificación (Acinas *et al.*, 2009). Cabe mencionar que en el banco de genes hay un número reducido de secuencias de *Pseudanabaena* y *Limnothrix*, siendo un factor limitante para el análisis de dichas secuencias.

En el caso de los aislados AD13, AD26 y PO05, se mantuvo la identificación he-

cha con base en las claves taxonómicas disponibles (basadas en la morfología), descartándose la molecular, ya que el género *Pseudanabaena* presenta características morfológicas inconfundibles que lo diferenciaban claramente de otros aislados, como son las ligeras constricciones en las paredes y su crecimiento como filamentos solitarios y cortos (Komárek, 2003), características que la separan de *Spirulina laxissima* y *Leptolyngbya pauciramosa*, ya que estos taxa no presentan constricciones en las paredes y son filamentos muy largos que forman cúmulos que se observan a simple vista. También, con base en el análisis del árbol filogenético, se pudo verificar que estos tres aislados se distribuyen en un mismo grupo, separándose de los dos taxa antes mencionados; estos resultados confirman la necesidad de combinar la taxonomía basada en caracteres morfológicos y los estudios moleculares para lograr una identificación taxonómica más confiable (Thacker y Paul, 2004), aunque se debe señalar que la caracterización molecular no sustituye del todo a la morfológica.

Asimismo, las secuencias del banco de genes para al género *Pseudanabaena*, tampoco tienen una distribución en una sola rama del árbol, sino que se agrupan con cepas que corresponden a los géneros *Leptolyngbya* spp. y *Geitlerinema* spp., lo cual ponen en relieve la problemática que existe en la identificación del género *Pseudanabaena*, debido principalmente a que existen pocos datos acerca de sus características fenotípicas y genéticas (Acinas *et al.*, 2009).

Por otro lado, los aislados AA09 y AA10, identificados como *Planktolyngbya* sp. con base en su morfología, no se pudieron relacionar con la identificación presuntiva

basada en la secuencia del gene 16S rRNA, ya que no existe registro de secuencias en el banco de genes que correspondan a dicho taxón, por lo que las obtenidas en este trabajo constituyen las primeras aportaciones de información genética para este género.

El uso de ambos métodos es ampliamente recomendable, ya que según Komárek y Anagnostidis (1989) más del 50% de las cepas en las colecciones son identificados erróneamente, debido a que está sujeto al juicio subjetivo del personal que las identifica, teniendo como resultado una asignación incorrecta de los aislamientos (Nübel *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2000).

Además, se tiene que considerar que algunas características de diagnóstico, tales como vacuolas de gas o aquinetos, pueden mostrar variaciones como consecuencia de las condiciones de crecimiento, e incluso pueden llegar a perderse (Lyra *et al.*, 2001; Rajaniemi *et al.*, 2005; Valerio *et al.*, 2009).

Por otra parte, en los tres lagos de estudio se encontró un crecimiento masivo de cianobacterias en el momento de la colecta. Debido a que se ha documentado que en florecimientos desarrollados en lagos de varios países se registró toxicidad en un 75% de todas las muestras que contenían cianobacterias (Sivonen y Jones, 1999), estos florecimientos representan un riesgo potencial para la salud humana y sanidad animal, debido a que los tres lagos están destinados a actividades recreativas, y en el caso de la pista olímpica, también a actividades deportivas. Como parte de estos florecimientos se identificaron las cianobacterias *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Pseudanabaena* y *Phormidium*, siendo estos géneros los principales productores



de microcistinas (Hunter 1998; De León y Yunes, 2001; Roset *et al.*, 2001).

En los tres lagos en estudio se encontraron similitudes en las variables fisicoquímicas, ya que la temperatura fue superior a los 20°C y de acuerdo a otros estudios en los que se compararon las tasas de crecimiento de cianobacterias, diatomeas y clorofíceas a diferentes temperaturas, se comprobó que el crecimiento de las cianobacterias aumenta conforme se incrementa la temperatura, alcanzándose un crecimiento máximo por arriba de los 23°C (Chorus y Bartram, 1999; Roset *et al.*, 2001; Jöhnk *et al.*, 2008).

Por otra parte, el pH en las tres áreas de estudio fue mayor a 10 y corresponde al intervalo óptimo documentado para el crecimiento de estos microorganismos, el cual se ubica entre 7.5 y 10 (Vela *et al.*, 2007). El hecho de que en los tres lagos estudiados se haya registrado un pH alcalino, hace suponer que muy probablemente este factor contribuyó al desarrollo de los *blooms* ya que las cianobacterias tienen preferencia por ambientes neutros y alcalinos debido a su capacidad de asimilar el carbono inorgánico en la forma de bicarbonato (Giraldez-Ruiz *et al.*, 1999).

Como conclusión, se registraron florecimientos de cianobacterias en los tres sitios de estudio y se pudo establecer una correlación con una alta concentración de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), temperatura mayor a los 20°C y pH mayor a 10. Además, se pudo identificar la mayoría de las cepas aisladas mediante caracteres morfológicos tradicionales y confirmar su identidad genérica con base en el análisis bioinformático del gen 16S rRNA. Se debe enfatizar que la presencia de cepas potencialmente toxigénicas pudiera

representar un riesgo para la biota acuática y para el humano, por lo que la correcta identificación de los taxa presentes en un florecimiento puede contribuir a tomar medidas preventivas. Los resultados de este estudio también alertan sobre la diversidad de especies de cianobacterias filamentosas asociadas con florecimientos de *Microcystis*, algunas de las cuales podrían encontrar condiciones ambientales adecuadas para expresar su potencial toxigénico.

### AGRADECIMIENTOS

R. Pineda-Mendoza agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca para realizar estudios de maestría. F. Martínez-Jerónimo y R. Olvera-Ramírez agradecen al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y en particular a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP), al Sistema de Estímulo al Desempeño de los Investigadores (EDI) y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del IPN (COFAA), por los apoyos recibidos para realizar este estudio.

### LITERATURA CITADA

- Acinas, S.G., Haverkamp, T.H.A., Huisman, J. y Stal, L.J., 2009. "Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp. (cyanobacteria)". *ISME J.*, **3**: 31-46.
- Alcocer, J., Ato, E., Bles, E. y Vilaclara, G., 1988. "Estudio preliminar del efecto del dragado sobre el estado trófico del Lago viejo de Chapultepec". *Contam. Ambient.*, **4**: 43-56.
- Allers, T. y Lichten, M., 2000. "A method for preparing genomic DNA that re-

- strains branch migration of holiday junctions". *Nucleic. Acid. Res.*, **15**: 26-28.
- Alva-Martínez, A. F., Sarma, S. S. S. y Nandini, S., 2007. "Effect of mixed diets (Cyanobacteria and green algae) on the population growth of the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*". *Aquat. Ecol.*, **41**: 579-585.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J., 1985. "Modern approach to the classification system of cyanophytes". *1-Introduction. Archiv. Hydrobiol. Suppl.*, **71**: 1-2.
- \_\_\_\_\_, 1988. "Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3- Oscillatoriales". *Archiv. Hydrobiol. Suppl.*, **80**: 1-4.
- Arzate-Cárdenas, M., Olvera-Ramírez, R. y Martínez-Jerónimo, F., 2010. "*Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City". *Ecotoxicology*, **19**: 1157-1165.
- Briand, E., Gugger, M., François, J.C., Bernard, C., Humbert, J. F. y Quiblier, C., 2008. "Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (Cyanobacterium) population". *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**: 3839-3848.
- Campanella, J.J., Bitincka, L. y Smalley, J., 2003. "MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences". *BMC Bioinformatics*, **4**: 4 pp.
- Campos, V., Lisperguer, S., Weckesser, J., Vera, A. y Muñoz, D., 2005. "Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile". *Boletín Micológico*, **20**: 73-81.
- Carmichael, W.W., He, J.W., Carmichael, W.W., Eschendor, J., He, Z.R. y Juan, Y.M., 1988. "Partial structural determination of hepatotoxic peptides from *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) collected in ponds of central China". *Toxicon.*, **26**: 1213-1217.
- Casamatta, D.A., Johansen, J.R., Vis, M.L. y Broadwater, S.T., 2005. "Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the oscillatoriales (cyanobacteria)". *J. Phycol.*, **41**: 421-438.
- Chorus, I. y Bartram, J., 1999. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E y FN Spon, London, 416 pp.
- Codd, G.A., 2000. "Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control". *Ecol. Engng.*, **16**: 51-60.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Kaya, K., Ward, C.J., Beattie, K.A. y Metcalf, J.S., 1999. "Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health". *Eur. J. Phycol.*, **34**: 405-415.
- Cronberg, G. y Annadotter, H., 2006. *Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology*. ISSHA ed., 110 pp.

- De León, L. y Yunes, J.S., 2001. "First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America". *Environ. Toxicol.*, **16**: 110-112.
- Fontúrbel, R.F., 2003. "Algunos criterios biológicos sobre el proceso de eutrofización a orillas de seis localidades del Lago Titikaka". *Ecología Aplicada*, **2**: 75-79.
- Frías, H.V., Mendes, M.A., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Tomazela, D., Colepicolo, P. y Pinto, E., 2006. "Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **344**: 741-746.
- Geitler, L., 1932. "Cyanophyceae". In: Rabenhorst (ed.), *Kryptogamen-Flora*, Leipzig. **14**, 1196 pp.
- Giraldez-Ruiz, N., Bonilla I. y Fernandez-Piñas, F. 1999. "Role of external calcium in homeostasis of intracellular pH in the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120 exposed to low pH". *New Phytol.*, **141**: 225-230.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P. y Gascuel, O., 2005. "PHYML, Online-a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference". *Nucleic Acids Res.*, **1**: 33 (Web Server issue): W557-9.
- Hall, T., 2001. *Bioedit*, version 5.0.6. North Carolina State University, Department of Microbiology, Raleigh, North Carolina, 192 pp.
- Hunter, P.R., 1998. "Cyanobacterial toxins and human health". *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement.*, **84**: 35-40.
- Jang, M.H., Kyng, H., Joo, G.J. y Takamura, N., 2003. "Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton". *Freshw. Biol.*, **48**: 1540-1550.
- Jöhnk, K.D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P.M. y Stroom, J.M., 2008. "Summer heatwaves promote *florações* of harmful cyanobacteria". *Glob. Chang. Biol.*, **14**: 495-512.
- Kaebernick, M. y Neilan, B.A., 2001. "Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production". *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**: 1-9.
- Kimura, M., 1980. "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". *J. Mol. Evol.*, **16**: 111-120.
- Komárek, J., 2003. "Planktic oscillatorial cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects)". *Hydrobiologia*, **502**: 367-382.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K., 1989. "Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4- Nostocales". *Archiv. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.*, **56**: 247-345.

- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L. y Sivonen, K., 2001. "Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 513-526.
- Moffitt, M.C., Blackburn, S.I. y Neilan, B. A., 2001. "rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 505-512.
- Neilan, B.A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, A., Schaub, V., Sivonen, K. y Börner, T., 1999. "Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria". *J. Bacteriol.*, **181**: 4089-4097.
- Nelissen, B., De Baere, R., Wilmotte, A. y De Wachter, R., 1996. "Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis". *J. Mol. Evol.*, **42**: 194-200.
- Nübel, U., García-Pichel, F. y Muyzer, G. 1997. "PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria". *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3327-3332.
- Oberholster, P.J., Botha, A.M. y Cloete, T.E., 2006. "Toxic cyanobacterial blooms in a shallow, artificially mixed urban lake in Colorado, USA". *Lakes Reserv. Res. Manag.*, **11**: 111-123.
- Paerl, H.W., Fulton, R.S. 3rd, Moisaner, P.H. y Dyble, J., 2001. "Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria". *Scientific World Journal.*, **4**: 76-113.
- Pflugmacher, S. y Wiegand, C., 2001. "Metabolism of microcystin-LR in aquatic organism". In Chorus I. (ed.). *Cyanotoxins*. Springer, Berlin, 257-260 pp.
- Pflugmacher, S., Codd, G.A. y Steinberg, C.E.W., 1999. "Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants". *Environ. Toxicol.*, **14**: 111-115.
- Pope, P.B. y Patel, B.K.C., 2008. "Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom". *FEMS Microbiol. Ecol.*, **64**: 9-27.
- Posada, D. y Crandall, K.A., 1998. "MODELTEST: testing the model of DNA substitution". *Bioinformatics*. **14**, 817-818.
- Prakash, S., Lawton, L.A. y Edwards, C., 2009. "Stability of toxigenic *Microcystis* blooms". *Harmful Algae*, **8**: 377-384.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. y Sivonen, K., 2005. "Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria)". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**: 11-26.
- Ramírez, P., Martínez, E., Martínez, M. y Eslava, C., 2004. "Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana". In

- Rosas, I., Cravioto, A., Escurra, E. (compiladores)". *Microbiología ambiental*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología, 83-107 pp.
- Rippka, R., 1988. "Isolation and purification of cyanobacteria". *Methods Enzimol.*, **167**: 3-27.
- Roset, J., Aguayo, S. y Muñoz, M.J., 2001. "Detección de cianobacterias y sus toxinas". Una revisión. *Rev. Toxicol.*, **18**: 65-71.
- Rudi, K., Skulberg, O. M., Larsen, F. y Jakobsen, K.S., 1997. "Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8". *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 2593-2599.
- Sivonen, K. y G. Jones, 1999. "Cyanobacterial toxins". In Chorus, I. y Bartram, J. (eds.). *Toxic Cyanobacteria in water*. WHO, E y F., N. Spoon, London, 41-111 pp.
- Stewart, I., Webb, P.M., Schlute, P.J. y Shaw, G.R., 2006. "Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria-a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment". *Environ. Health.*, **5**: 1-13.
- Thacker, R.W. y Paul, V.J., 2004. "Morphological, chemical, and genetic diversity of cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Symploca* spp. (*Oscillatoriales*)". *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 3305-3312.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G., 1997. "The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acids Res.*, **24**: 4876-4882.
- Vaara T., Vaara, M. y Niemela, S., 1979. "Two improved methods for obtaining axenic cultures of cyanobacteria". *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 1011-1014.
- Valerio, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira P. y Tenreiro, R., 2009. "Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs". *Microbiology*, **155**: 642-656.
- Vasconcelos, V., 2001. "Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects". *Limnetica*, **20**: 45-58.
- Vela, L., Sevilla, E., Martín, B., Pellicer, S., Bes, Ma. T., Fillat, M. F. y Peleato, Ma. L., 2007. "Las microcistinas". *Real Academia de Ciencias. Zaragoza*, **62**. 135-146.
- Whitton, B.A., 1992. "Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria". In: Mann, N.H. y Carr, N.G. (eds.), *Photosynthetic Prokaryotes*. Plenum Press. New York, 51 pp.
- Whitton, B.A. y Potts, M., 2000. "Introduction to the Cyanobacteria". In: *The ecology of Cyanobacteria. Their*

- Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers. 1-11 pp.
- Wilmutte, A., Neefs, J. M. y De Wachter, R., 1994. "Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain NIBB 1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis". *Microbiology*, **140**: 2159-2164.
- Wilson, K. M., Schembri, M. A., Baker, P. D. y Saint, C.P., 2000. "Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR". *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 332-338.
- Zarrouk, C., 1966. "Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch. et Gardner) Geitler". Ph.D. Thesis. Université de Paris.
- Zwart, G., Kamst-van Agterveld, M. P., van der Werff-Staverman, I., Hagen, F., Hoogveld H.L. y Gons, H.J., 2005. "Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake". *Environ. Microbiol.*, **7**: 365-377.

Recibido: 24 febrero 2010. Aceptado: 14 diciembre 2010.