

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Facultad de Ciencias de la Vida**

Herramientas moleculares para la detección de cianobacterias potencialmente tóxicas en ecosistemas acuáticos del Río Daule

**Proyecto Integrador**

Previo la obtención del Título de:

**Licenciatura en Biología**

Presentado por:

Julio Ferdinand Coloma Gavilanes

Ricardo Andrés Labanda Lucero

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

## **Agradecimientos**

---

Agradecemos sinceramente al equipo de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, con una mención especial a nuestro tutor Julio Bonilla y a Byron Briones. De misma forma, apreciamos el compromiso del equipo de Agua y Desarrollo Sostenible por sus aportes de parámetros ambientales.

## Declaración Expresa

---

Nosotros Julio Ferdinand Coloma Gavilanes y Ricardo Andrés Labanda Lucero acordamos y reconocemos que la titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, información no divulgada y cualquier otro derecho o tipo de Propiedad Intelectual que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, incluyendo cualquier derecho de participación de beneficios o de valor sobre titularidad de derechos, pertenecerán de forma total, perpetua, exclusiva e indivisible a LA ESPOL, sin limitación de ningún tipo. Se deja además expresa constancia de que lo aquí establecido constituye un “previo acuerdo”, así como de ser posible bajo la normativa vigente de transferencia o cesión a favor de la ESPOL de todo derecho o porcentaje de titularidad que pueda existir.

Sin perjuicio de lo anterior los alumnos firmantes de la presente declaración reciben en este acto una licencia de uso gratuita e intransferible de plazo indefinido para el uso no comercial de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, sin perjuicio de lo cual deberán contar con una autorización previa expresa de la ESPOL para difundir públicamente el contenido de la investigación, desarrollo tecnológico o invención.

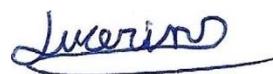
Así también autorizamos expresamente a que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra o invento, por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual.

Guayaquil, 9 de septiembre del 2023.



---

Julio Coloma



---

Ricardo Labanda

## **Evaluadores**

---

**Diego Gallardo**

Profesor de Materia

---

**Julio Bonilla**

Tutor de proyecto

## Resumen

La alerta global de proliferación de cianotoxinas supone un riesgo para países como Ecuador con menor número de investigaciones realizadas y sin un plan de emergencia para la contención y remediación de FANs. Al mismo tiempo, muchos de estos análisis suelen hacerse en cuerpos de agua estáticos limitando la información que se puede encontrar sobre ríos y cuerpos de agua en movimiento. En este proyecto integrador hemos analizado con herramientas moleculares la prevalencia de genes de cianobacterias relacionados a la síntesis de cianotoxinas en 5 cantones del río Daule durante el periodo de septiembre de 2022 y febrero de 2023 para determinar si existe riesgo de contaminación con cianotoxinas, para ello, hemos utilizado primers específicos para la detección de microcistinas, cilindropermopsinas y anatoxinas. Los resultados de nuestra investigación indicaron que en el río Daule existen bacterias asociadas a la producción de microcistinas y cilindropermopsinas las cuales, presentes en los 5 cantones y en todas las fechas de muestreo con algunas variaciones entre sí. Esta información sugeriría que las cianotoxinas podrían estar viajando río abajo desde la represa Daule Peripa sin la necesidad de que se pueda visibilizar los eventos de FAN en el río Daule ya que no los hemos observado durante el desarrollo de nuestro proyecto. La relevancia de este estudio permitirá a Ecuador desarrollar a futuro planes de contingencia y tecnologías vinculadas a la detección y monitoreo de concentración y riesgo biológico de las cianotoxinas en base a la información de ADN que hemos recolectado en el proyecto.

**Palabras Clave:** Río Daule, FANs, cianotoxinas, cianobacterias, agua.

## **Abstract**

The global alert of cyanotoxin proliferation poses a risk to countries such as Ecuador with fewer investigations carried out and without an emergency plan for the containment and remediation of ANFs. At the same time, many of these analyses are often done on static bodies of water limiting the information that can be found about rivers and bodies of water in motion. In this integrative project we have analyzed with molecular tools the prevalence of cyanobacteria genes related to the synthesis of cyanotoxins in 5 cantons of the Daule River during the period of September 2022 and February 2023 to determine if there is a risk of contamination with cyanotoxins, for this, we have used specific primers for the detection of microcystins, cylindricalpermopsins and anatoxins. The results of our research indicated that in the Daule River there are bacteria associated with the production of microcystins and cylindropermopsins which, present in the 5 cantons and in all sampling dates with some variations between them. This information would suggest that cyanotoxins could be traveling downstream from the Daule Peripa dam without the need for FAN events in the Daule River to be visible since we have not observed them during the development of our project. The relevance of this study will allow Ecuador to develop future contingency plans and technologies linked to the detection and monitoring of concentration and biological risk of cyanotoxins based on the DNA information we have collected in the project.

**Key words:** Daule River, FANs, cyanotoxins, cyanobacteria, water.

## Tabla de contenidos

Evaluadores .....	4
Resumen .....	5
Abstract .....	6
Capítulo 1.....	11
1.1 Introducción.....	12
1.4 Objetivos .....	15
1.4.1 Objetivo general.....	15
1.4.2 Objetivos específicos.....	15
1.5 Marco teórico .....	15
1.5.1 Cianobacterias.....	15
1.5.2 Floraciones de cianobacterias .....	16
1.5.3 Cianotoxinas.....	17
Capítulo 2.....	20
2.1 Metodología.....	21
2.1.1 Sitio de estudio .....	21
2.1.2 Toma de muestras de agua .....	22
2.1.4 Extracción de ADN.....	22
2.1.5 PCR.....	23
2.1.6 Amplificación PCR de los fragmentos de genes y electroforesis .....	24
2.1.7 Purificación de los amplicones obtenidos .....	25

2.1.8 Ligación, transformación y cultivo de colonias.....	25
2.1.9 Extracción de ADN plasmídico.....	26
Capítulo 3.....	27
3.1 Resultados y análisis .....	28
3.1.1 Datos ambientales .....	28
3.1.2 Extracción de ADN.....	29
3.1.3 Resultados de PCR.....	29
3.1.4 Relación entre los resultados positivos y parámetros ambientales .....	30
3.1.4 Transformación de amplicones .....	34
3.1.6 Identificación de fragmentos .....	35
3.1.7 Análisis de costos .....	37
Capítulo 4.....	40
4.1 Conclusiones .....	41
4.2 Recomendaciones.....	42

## Tabla de figuras

Figura 1.- Mapa de los sitios de muestreo (Obtenido de: Google Maps).....	21
Figura 2.- Frecuencias de resultados positivos según el sitio de muestreo y el cebador. ....	30
Figura 3.- Variaciones en los parámetros químicos a lo largo del tiempo de muestreo en meses. ....	32
Figura 4.- Variaciones en la temperatura, turbidez y pH del agua a lo largo del tiempo de muestreo. 32	
Figura 5.- Variaciones en la precipitación media y salinidad a lo largo del tiempo de muestreo. ....	33
Figura 6.- NMDS de amplificaciones exitosas según el mes y el sitio de muestreo. ....	34
Figura 7.- Productos amplificados de mcyAcd (a) y mcyB (b) seleccionados para la transformación. 35	
Figura 8.- Productos amplificados de cat (a) y cyrC (b) seleccionados para la transformación.....	35
Figura 9.- Amplicones obtenidos de colonias transformadas con cebador mcyAcd (verde) y mcyB (amarillo). ....	36
Figura 10.- Amplicones obtenidos de colonias transformadas con cebador cat (verde) y cyrC (amarillo). ....	36

## **Abreviaturas**

ATX: Anatoxina

CS: Cilindrospermopsina

FAN: Floraciones Algales Nocivas

MC: Microcistina

NRPS: Péptido sintetasa no ribosomal

PCR: Polymerase Chain Reaction

PKS: Policétido sintasa

PS: Péptido sintetasa

# Capítulo 1

## **1.1 Introducción**

La subcuenca del río Daule corresponde a uno de los sistemas hidrológicos más importantes de la costa ecuatoriana. El Daule, tiene una extensión total de 15.810 km<sup>2</sup> (Villa, Gómez, & Pacheco, 2016); irriga 27 cantones de las provincias de: Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Guayas, Los Ríos y Santa Elena (Abad & De Las Mercedes Álvarez Gutiérrez, 2022) desde la represa Daule-Peripa hasta el sector de la Puntilla de Samborondón donde converge junto al a subcuenca del río Babahoyo en el río Guayas. Su importancia económica reside en los nutrientes y agua que se utilizan para actividades, agrícolas, ganaderas industriales y domésticas (Zurita, y otros, 2022).

## **1.2 Descripción del problema**

América Latina es una región rica en recursos biológicos y minerales con al menos 650 millones de habitantes, en materia hídrica, se estima que posee al menos un 31% de la reserva dulceacuícola mundial. Sin embargo, esta riqueza se opaca con frecuencia debido a las amenazas constantes de contaminación y desplazamiento sobre los ecosistemas locales. En Ecuador, actividades como la agricultura, ganadería, silvicultura, minería y explotación petrolera que sustentan la economía de la región con un 44.5% de PIB en el 2022, son también, labores contaminantes de cuerpos de agua y suelo (Gómez-Olivan, 2019; Prado et al., 2023). Esto se ve reflejado en la baja inversión en el desarrollo de ciencias y tecnología donde las naciones latinoamericanas aportan en promedio, menos del 0,3% de su PIB. Lo que impone múltiples restricciones en cuanto a la capacidad de crear y ejecutar planes de acción para salvaguardar la calidad del agua superficial (Bolaños-Villegas et al., 2020).

Las cianobacterias o algas verdeazuladas son microorganismos fotosintéticos usualmente planctónicos que habitan lagos y otros ecosistemas fóticos. Se estima que algunas especies son capaces de producir sustancias tóxicas y proliferar desmesuradamente

ocasionando floraciones de algas nocivas bajo condiciones ambientales propicias, tales como luz, pH, concentración de nutrientes, cantidad de luz, entre otras. (Svirčev et al., 2019).

En las regiones del Caribe y América del Sur, ya se han reportado floraciones de algas nocivas capaces de recorrer a lo largo de varios cuerpos de agua por cientos de kilómetros. Por consiguiente, implica graves problemas sanitarios en las comunidades que utilizan el agua contaminada (Aguilera et al., 2023; IANAS, 2019). A pesar de que los eventos de florecimientos sean fenómenos naturales ocasionales, resulta cada vez más común que ecosistemas dulceacuícolas tengan eventos de florecimientos debido a la intervención humana (Dörr et al., 2010).

### **1.3 Justificación del problema**

Las floraciones de cianobacterias son una amenaza a la salud pública, su riesgo proviene de la relación entre el aumento de biomasa de las algas y la síntesis de cianotoxinas. De forma particular, el ingreso de estos contaminantes en el ser humano se genera por ingesta oral al consumir mariscos o peces contaminados con cianotoxinas o, al beber agua de fuentes contaminadas (Churro & Valério, 2015). Se estima que, a futuro, la proliferación de cianobacterias nocivas y eventos de floración aumenten dada la acción en conjunto del cambio climático y la influencia humana aumentando el número de envenenamientos y costos sanitarios adicionales (Svirčev et al., 2019).

Por un lado, las recomendaciones y regulaciones podrían alentar un monitoreo más proactivo y periódico de las poblaciones de cianobacterias de agua dulce y cianotoxinas en países altamente desarrollados. Sin embargo, el número de casos de envenenamiento en países menos desarrollados quedaría la especulación al no contar con medidas de regulación y monitoreo. Dada la falta de métodos precisos para cuantificar la concentración de las diferentes cianotoxinas en agua y su origen, así como una comprensión de otros compuestos bacterianos

y su interacción mutua en los ecosistemas, resulta una prioridad el invertir en el desarrollo de futuras investigaciones que retroalimenten información precisa y cuantificable que ayude en la creación de un umbral específico para cada ecosistema que determine en qué momento se presenta un evento de florecimiento (Svirčev et al., 2019).

La gama de estándares analíticos actuales, en contraste a la cantidad de reactivos de desarrollados para identificar y cuantificar cianotoxinas en el medio ambiente ha aumentado en las últimas décadas en respuesta al desarrollo de tecnologías genéticas y moleculares (Cerasino, 2017). Este enfoque molecular al mismo tiempo crea una gran brecha entre el análisis bioquímico y sistemático de las toxinas con los reportes de presencia y ausencia de estos.

Algunas cianotoxinas pertenecientes a la familia de microcistinas, cilindropermopsinas y anatoxinas no solo poseen más de una especie de toxina si no que las mismas, pueden presentar diferentes efectos en los organismos según su configuración espacial de isómeros y enantiómeros, o al mismo tiempo podrían presentar un efecto sinérgico o antagónico con otras toxinas presentes en el agua (Svirčev et al., 2019). Esta situación se puede explicar en parte por la redirección de los esfuerzos de estudio en el desarrollo de protocolos más económicos y sencillos para la detección de toxinas las cuales usualmente son de la familia de microcistinas limitando la información general que se encuentra sobre las cianotoxinas, lo cual, combinado a la falta de cianotoxinas sintéticas comerciales, limita los recursos necesarios para realizar investigaciones adaptadas a las condiciones de cada región (Pinheiro Menescal et al., 2023).

## **1.4 Objetivos**

### ***1.4.1 Objetivo general***

Desarrollar un protocolo de detección de genes relacionados a la producción de cianotoxinas mediante herramientas moleculares basadas en el ADN ambiental para el monitoreo de FANs en el Río Daule.

### ***1.4.2 Objetivos específicos***

Determinar la presencia de cianobacterias y cianotoxinas encontradas en muestras del Río Daule mediante ensayos PCR.

Clonar las secuencias de los genes involucrados en la producción de cianotoxinas a partir de las muestras positivas obtenidas.

Analizar las muestras positivas de genes involucrados a la síntesis de cianotoxinas según parámetros fisicoquímicos, ambientales y meteorológicos para identificar variables relacionadas a la aparición de cianobacterias con potencial de producir cianotoxinas.

## **1.5 Marco teórico**

### ***1.5.1 Cianobacterias***

La ubicua especie de procariotas conocida como cianobacteria es responsable de la fotosíntesis oxigénica que dio lugar a la biosfera en la Tierra (Cardona et al., 2019). Su distribución no solo se limita a las corrientes en suspensión de masas de océanos y ríos o de cuerpos de agua estacionarios como lagos y charcos sino también, al biofilm que se pueda formar en rocas y sustrato. En este sentido, las cianobacterias, tienen una ventaja competitiva sobre otras especies debido a su capacidad de resiliencia que les permite sobrevivir, aunque el medio cambie de forma drástica su salinidad, temperatura, pH, desecación o irradiación (Dantas et al., 2011), dichas capacidades se deben a la flexibilidad de las células procariotas,

la producción de algunos metabolitos secundarios incluidos algunos pigmentos protectores contra los rayos UV como la escitonemina y aminoácidos con propiedades similares a la micosporina (Svirčev et al., 2019).

### ***1.5.2 Floraciones de cianobacterias***

El fenómeno de florecimiento en las cianobacterias se acuña cuando las mismas alcanzan una densidad poblacional mayor a la capacidad de carga de su medio, lo cual, se visibiliza en las aguas superficiales con la formación de espumas, cambio de coloración del agua, aumento de niveles de oxígeno. Si bien no se ha podido determinar la causa por la cual un florecimiento ocurre, si se han medido las condiciones específicas que adquiere el medio durante un florecimiento como la eutrofización, el aumento de biomasa, el aumento de nitrógeno, la disminución de especies competidoras. Estos eventos se desarrollan no solo en aguas superficiales si no también en esteras de baja profundidad y límites costeros en cuerpos de agua de pequeño y gran tamaño (Chorus & Welker, 2021).

Durante los últimos años, el rápido crecimiento de las cianobacterias se ha relacionado con la intervención humana en ecosistemas acuáticos, el cambio climático y la redirección de desechos que aportan nutrientes o disminuyen la diversidad acuática. Debido a esto, la proliferación no regulada de cianobacterias pueda propiciar la difusión de toxinas en las comunidades que posean genes relacionados a la síntesis de cianotoxinas (Bláha et al., 2009; Huisman et al., 2018; Svirčev et al., 2019). Según estudios publicados en la última década, esta alerta mundial amenazaría no solo el sector sanitario si no también las redes de producción alimentarias acuáticas, agrícolas y ganaderas (Heisler et al., 2008). Para ello, es importante reconocer los mecanismos de origen detrás de las floraciones, las diferentes cianotoxinas que se puedan producir y su dinámica en los animales y seres humanos respecto a otras moléculas

que puedan crear un efecto sinérgico y anafiláctico contra el organismo que consume el agua contaminada (Huisman et al., 2018).

Comprender las dinámicas de floración e identificar las especies presentes en sitios de baja escorrentía en el río Daule permitirá predecir los eventos de florecimiento y controlar el tránsito de las toxinas a lo largo del río. Para un plan de prevención sostenible, los organismos de control hídrico deberían de medir los nutrientes disueltos en el agua, temperatura, régimen de mezcla, turbidez, diversidad y pH para controlar la proliferación de las cianobacterias. De igual forma, verificar si el transporte de sedimentos no genera una estratificación en el agua donde las cianobacterias puedan optar por estrategias oportunistas privando de la luz solar a los otros organismos fotosintéticos. En el caso particular de los embalses, la asimetría en sus bordes costeros genera una inconsistencia en la calidad de agua que fluye a través de él generando nichos de florecimiento de algas que luego puedan ser arrastradas por escorrentía a la corriente principal (Chorus & Welker, 2021).

### ***1.5.3 Cianotoxinas***

Aunque la distinción entre lo que es "tóxico" y lo que no lo es no está definido, resulta común categorizar las floraciones como tóxicas o no tóxicas. La toxicidad de una cianobacteria se relaciona a los metabolitos que produce, la capacidad de sintetizar toxinas, sin embargo, depende en la presencia o ausencia de genes relacionadas a ellas provocando así, que no solo diferentes especies en una familia o género se diferencien entre productoras o no de toxinas si no también, que, una especie pueda poseer o no esta característica según la cepa a la que pertenezca (Codd & Metcalf, 2014). Por ello, a veces la identificación taxonómica o el análisis de los genes relacionados a la producción de cianotoxinas no es determinante suficiente para determinar la toxicidad de una especie de cianobacteria o el riesgo de florecimiento alrededor de ella. A veces, estos análisis también se pueden complementar con bioensayos de toxicidad

donde se puede exponer un animal a una exposición intraperitoneal de los metabolitos de las cianobacterias para determinar los efectos en la salud y la presencia de microcistinas, nodularinas, anatoxinas, saxitoxinas y cilindrospermopsinas (Carmichael, 2008; Svirčev et al., 2019).

Las actividades biológicas de los metabolitos secundarios de las cianobacterias son diversas, y algunas de ellas, como las cianotoxinas, se reconocen como las biotoxinas más letales conocidas (Svirčev et al., 2019; Janssen, 2019). Si bien su efecto en los ecosistemas resulta desproporcionado como un mecanismo de defensa frente a depredadores, también cumplen una función estructural en la membrana externa de las células bacterianas (Monteiro et al., 2017). Esta incertidumbre sugiere que, tal vez la función real de la síntesis de cianotoxinas aún no este comprendida, sin embargo, también podría ser el resultado de algún vestigio evolutivo o beneficio inherente a la biología de las cianobacterias (Codd et al., 2005; Svirčev et al., 2019).

La anatoxina-a se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina y funciona como un poderoso agente bloqueador neuromuscular despolarizante postsináptico (Aronstam & Witkop, 1981). En los últimos años del siglo pasado y los primeros del presente, se registraron por primera vez en los genomas de *Oscillatoria* sp. PCC 6506 y *Anabaena* sp. 37 grupos de genes responsables de la biosíntesis de anatoxina-a. De los 8 genes ana identificados (anaA-anaH), tres genes ana (anaE-anaG) corresponden a policétido sintasas. Se ha encontrado que *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Hydrocoleum*, *Arthrospira* y *Microcystis* producen anatoxina-A u homoanatoxina-A (Hodoki et al., 2013; Méjean et al., 2010; Sivonen et al., 1989). Aún no se han identificado las razones detrás de la pérdida de producción de anatoxina-a por varias cepas de *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Microcystis* después del cultivo (Jiang et al., 2015; Rantala-Ylinen et al., 2011).

Las microcistinas se adhieren específicamente al sistema de transporte de aniones orgánicos de la membrana celular del hepatocito e inhiben las fosfatasas eucarióticas de serina/treonina tipo 1 y tipo 2A para dirigirse al hígado (Batista et al., 2003). Un complejo multienzimático formado por péptidos sintetetasas (PS), policétido sintetasas (PKS) y otras enzimas capaces de producir microcistinas no ribosómicas que involucran compuestos tiolados. Tres organismos filogenéticamente lejanos, *Anabaena* sp. 90 (Rouhiainen et al., 2004), *Mycrocystis aeruginosa* PCC7806 (Tillet et al., 2000) y *Planktothrix agardhii* CYA 126 (Christiansen et al., 2003) han sido secuenciados y sus genes involucrados en la síntesis de MC fueron identificados. Entre las cepas venenosas de los diversos géneros, solo la configuración mcyA-C parece mantenerse en su mayor parte (Valério et al., 2010).

Al menos dos episodios epidémicos de intoxicación humana se han relacionado con CS (Carmichael et al., 2001; Griffiths & Saker, 2003), que se ha encontrado en varios embalses que suministran agua potable, como en el sur de China (Lei et al., 2014). Para una evaluación precisa del riesgo y la salvaguardia de la salud humana, son esenciales las investigaciones sobre la vía peligrosa de la acción de CS y el monitoreo rutinario de las aguas superficiales (Rzymiski & Poniedziałek, 2014). Algunos de esos genes en *A. ovalisporum*, originalmente conocido como *aoa* (Kellmann et al., 2006; Shalev-Alon et al., 2002), estaban inequívocamente conectados con la producción de CS. El gen *aoaA* codificaría una amidinotransferasa (AMT), el gen *aoaB* codificaría un complejo NRPS/PKS y el gen *aoaC* codificaría una PKS. Posteriormente, se encontraron ortólogos *aoaA-C* y genes adicionales en el gen del grupo CS (*cyr*) de *C. raciborskii* (Barón-Sola et al., 2012; Mihali et al., 2008).

## **Capítulo 2**

## 2.1 Metodología.

### 2.1.1 Sitio de estudio

Se seleccionaron 8 sitios de muestreo (figura 1) que se visitaron periódicamente para la recolección de muestras de agua, plancton y análisis fisicoquímicos, de los cuáles, 5 sitios pertenecen a los cantones Balzar ( $1^{\circ}21'45.5''\text{S}$   $79^{\circ}54'25.6''\text{W}$ ), Colimes ( $1^{\circ}32'49.6''\text{S}$   $80^{\circ}00'24.6''\text{W}$ ), Nobol ( $1^{\circ}55'04.2''\text{S}$   $80^{\circ}00'32.3''\text{W}$ ), Petrillo ( $1^{\circ}58'30.3''\text{S}$   $80^{\circ}00'15.1''\text{W}$ ) y Santa Lucía ( $1^{\circ}42'46.6''\text{S}$   $79^{\circ}59'18.5''\text{W}$ ) aledaños a la cuenca del río Daule mientras que los otros 3 sitios pertenecen a las lagunas de Segua ( $0^{\circ}42'38.9''\text{S}$   $80^{\circ}11'42.1''\text{W}$ ), Embalse el Azúcar ( $2^{\circ}14'09.1''\text{S}$   $80^{\circ}34'09.3''\text{W}$ ), San Rafael ( $2^{\circ}17'01.7''\text{S}$   $80^{\circ}43'54.1''\text{W}$ ) externas al río Daule para contrastar la información obtenida.

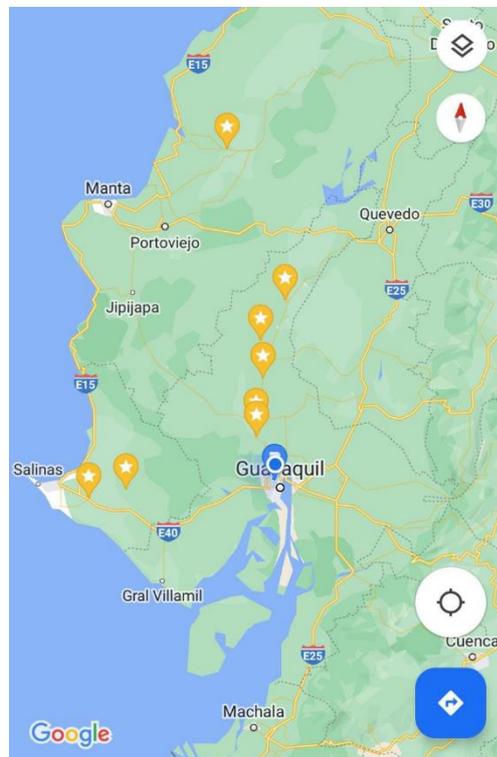


Figura 1.- Mapa de los sitios de muestreo (Obtenido de: Google Maps).

### ***2.1.2 Toma de muestras de agua***

La toma de muestras se realizó desde sitios alejados a la orilla. Se recolectó un litro de agua que se almaceno en botellas plásticas de color ámbar dentro de hieleras para preservar el material genético, las muestras de plancton se extrajeron del agua mediante la metodología de arrastre con una malla de 75 micras y se almacenaron en frascos plásticos de 100 ml y los parámetros fisicoquímicos se midieron usando un multiparámetro modelo HI9829, de la marca HANNA. En total se realizaron 38 muestreos de los cuales 30 pertenecen a los sitios cercanos al río Daule y 8 a las lagunas externas.

### **2.1.3 Toma de parámetros ambientales**

En cada sitio de muestreo se utilizó un equipo multiparámetro para la obtención de variables fisicoquímicas del agua a una profundidad de 15 a 30 cm, los datos de parámetros ambientales por otro lado se descargaron de un portal satelital de la nasa.

### ***2.1.4 Extracción de ADN***

La extracción de ADN se realizó siguiendo la metodología de Riascos et al. (2018) para análisis de ADN ambiental, primero se filtraron 250 ml de cada sitio en un filtro de papel de 44 micras. Previo a la extracción de ADN se dividió el filtro de papel en 2 generando dos muestras iguales, usando el kit “Purificación completa de ADN y ARN” de la marca EPICENTRE se trataron los filtros de papel resultantes para romper el tejido celular y liberar el ADN, precipitar las proteínas, eliminar las DNAsas y RNAsas, después del proceso de purificación, se precipitó el pellet de ADN centrifugándolo a 14 mil rpm a 4°C utilizando isopropanol, cuándo el pellet de ADN se formó se lo enjuagó dos veces con etanol y finalmente se diluyó en 60 microlitros de agua ultrapura. La calidad del ADN se verifico corriendo el ADN ambiental en un gel de agarosa y leyendo su concentración en un Nanodrop.

### 2.1.5 PCR

La presencia de cianobacterias y los genes involucrados en la síntesis de cianotoxinas se determinaron mediante el uso de cebadores (tabla 1) que indican la ausencia o presencia de los genes involucrados. Se utilizaron 10 cebadores de los cuáles 1 detectaba la presencia de cianobacterias en el agua y en base a estos resultados, se utilizaban el set de 9 cebadores que indicaban que tipo de cianotoxinas se podían estar produciendo en el agua donde, 3 cebadores detectaban la presencia de microcistinas, 2 cebadores la presencia de cilindropermopsinas y 4 cebadores la presencia de anatoxinas.

*Tabla 1.- Cebadores seleccionados para ensayos de PCR.*

Nombre de cebador	Gen de origen	Tamaño de amplicon	Cebador Forward	Cebador reverse	Cita
Cyano	16 s ribosomal bacteria	800	AGAGTTT GATCCTG GCTCAG	GACTACT GGGGTAT CTAATCCC TTT	(Jungblut et al., 2005)
mcyAcd	Microcistina A	291	AAAATT AAAAGC CGTATCA AA	AAAAGTG TTTTATTA GCGGCTC AT	(Hisbergues et al., 2003)
mcyB	Microcistina B	973	ATCACTT CAATCTA ACGACT	AGTTGCTG CTGTAAG AAA	Mikalsen et al. (2003)
mcyE	Microcistina E	812	GAAATTT GTGTAG AAGGTG C	AATTCTAA AGCCCAA AGACG	(Rantala et al. 2004; Gobler et al. 2007)
cat	cyrA	325	AATGAT CGAAAA CAGCAG TCGG	TAGAACA ATCATCCC ACAACCT	(Barón-Sola et al., 2012)
cyrC	cyrC	881	AGATGG TGCTTAT TTTGAAC	TCTTCACA GATGACC TTCTT	(Barón-Sola et al., 2012)
Anxgen	anaC	861	ATGGTC AGAGGT TTTACAA G	CGACTCTT AATCATG CGATC	(Rantala-Ylinen et al., 2011b)

Anac	anaC	366	TCTGGTA TTCAGTC CCCTCTA T	CCCAATA GCCTGTCA TCAA	(Rantala-Ylinen et al., 2011b; Sabart et al., 2015)
Antx	anaF	412	CGCAA TCGATGC TCACTTA	CCACTGG CTCCATCT TGATT	(Cadel-Six et al., 2009)
Atxoa	anaF	461	TCGAA GCGCGA TCGCAA ATCG	GCTTCCTG AGAAGGT CCGCTAG	(Ballot et al., 2010)

### ***2.1.6 Amplificación PCR de los fragmentos de genes y electroforesis***

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando GoTaq® Green Master Mix, el cual contiene la polimerasa de ADN Taq, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), dNTPs y soluciones tampón (pH 8.5) en las condiciones adecuadas para la amplificación de los fragmentos deseados. Además, contienen dos tintes (amarillo y azul) que imitan la función de un tinte de carga usado en la electroforesis; mientras que el tinte azul migra a velocidades comparables a fragmentos de ADN de 3-5kb, el tinte amarillo lo hace a la misma velocidad que fragmentos menores a 50 pares de base. En un tubo madre se colocan de manera general GoTaq® Green Master Mix en un volumen del 50% con respecto al total, 20% de albúmina de suero bovino (BSA) en una concentración de 0.5 mg/ml a partir de un tubo de Invitrogen™ UltraPure™ BSA (50 mg/mL), 4% corresponde a MgCl<sub>2</sub> disuelto a 3 mM a partir de un tubo de MgCl<sub>2</sub> de Invitrogen, 3% al cebador directo, 3% al cebador inverso, y 10% a la muestra extraída de ADN (Promega, 2012).

Las amplificaciones fueron realizadas en tubos de 10 µl para revelar y 25 µl para cortar el gel en caso de identificar más de 1 banda. Además, los procesos de amplificación ocurrieron durante 35 ciclos y bajo las siguientes condiciones: la etapa inicial de desnaturalización duró de 4 a 6 minutos a 95°C según la longitud del amplicón, la segunda desnaturalización ocurrió a 95°C por 45 segundos, un siguiente paso de hibridación durante 40 segundos y con temperatura acorde al set de cebadores usado, un paso de extensión a 72°C por 50 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

El revelado de los resultados de PCR se obtuvieron mediante electroforesis con gel de agarosa al 1% m/v para visualizar, y de 2% m/v para cortar en caso de hallar más de una banda. La solución tampón utilizada es TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y 0.4 mM de EDTA para una solución a concentración de 1X) (Sanderson et al., 2014). A continuación, se le añadió naranja de tiazol en una relación de 1 µl por cada 10 ml de gel. Las electroforesis fueron realizadas a 90V, 400 mA por 45 minutos (O'neil et al., 2019).

### ***2.1.7 Purificación de los amplicones obtenidos***

Para la purificación de los productos de PCR obtenidos se realizaron purificaciones siguiendo dos protocolos: Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit para los tubos de PCR y Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System para los geles. Los pasos de las purificaciones se realizaron a temperatura ambiente (Thermo Scientific, 2015; Promega, 2019). Los resultados fueron posteriormente cuantificados utilizando un nanodrop.

### ***2.1.8 Ligación, transformación y cultivo de colonias***

Los amplicones purificados son utilizados para insertarlos en plásmidos de células competentes de alta eficiencia ( $\geq 1 \times 10^8$  cfu/µg de ADN). Para ello, se empleó del kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Los productos transformados fueron inoculados en placas Petri con medio sólido de Agar Luria-Bertani (LB). El medio sólido incluyó ampicilina a una concentración final de 100µg/ml, 0.5 mM de IPTG y X-Gal en una concentración de 80µg/ml para la selección de colonias transformadas. Tras haber dejado las placas a 4°C durante la noche, se seleccionaron las colonias que no demostraron coloración para realizar un ensayo PCR y transferirlos a medios LB líquidos contenidos en tubos Eppendorf de 2ml. Tras haber cultivado por una noche, se transfirieron 1 ml del cultivo a un tubo Falcon de 15 ml junto a 9 ml de medio líquido LB (Promega Corporation, 2021).

### ***2.1.9 Extracción de ADN plasmídico***

La extracción de ADN de las secuencias transformadas exitosamente se realizó mediante ensayos PCR utilizando Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer. Se amplificaron las secuencias transformadas utilizando el cebador de M13/pUC, para la detección rápida de insertos clonados con vectores que contienen secuencias lacZ. El tamaño de los amplicones transformados aumenta en 250 pares de base con respecto al tamaño original. Por este motivo, la selección de colonias transformadas para la selección implicó una visualización mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar el tamaño de las secuencias amplificadas (Invitrogen, 2002; Thermo Scientific, 2018). De esta forma, las extracciones realizadas están preparadas para enviarse a secuenciar.

## **Capítulo 3**

### 3.1 Resultados y análisis

Los resultados positivos podrían indicar la presencia de cianobacterias de las familias Aphanizomenonaceae y Nostocaceae, las cuales contienen genes involucrados en la síntesis de cilindrospermopsinas y microcistinas respectivamente (Gupta, 2009; Vico et al., 2020). Según los reportes en cuerpos de agua en el Río Daule y en cuerpos de agua dulce de Ecuador de la última década, se pueden atribuir las muestras positivas a las especies *Raphidiopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, así también como a especies del género *Oscillatoria* y *Anabaena* (Ballesteros et al., 2022; Instituto Nacional del Ecuador, 2018; Morales et al., 2013; Prado & Bucheli, 2012). Los estudios taxonómicos no publicados por el Centro de Agua y Desarrollo Sostenible confirmaron la presencia de *Planktothrix agardhii* y *Cylindropermopsis raciborskii* en las muestras de agua.

#### 3.1.1 Datos ambientales

En la tabla 2 y 3 están tabulados los promedios de los parámetros químicos y físicos respectivamente de cada mes (los datos en 0 no fueron tanteados). Se puede observar un decrecimiento de los valores entre diciembre y enero y un alza para febrero relacionada a la época de lluvia. La mayoría de los parámetros tienen una relación directa y aumentan al mismo tiempo mientras otros como la temperatura permanecen constantes. En el caso de los sedimentos que presentan un alza anormal para el mes de febrero están relacionados a las fuertes escorrentías y podrían ser una razón por la cual a partir de febrero se dejaron de encontrar cianobacterias por la falta de luz solar y aumento en la turbidez del agua.

*Tabla 2.- Parámetros químicos de los sitios muestreados según el mes.*

<b>Mes</b>	<b>Fluor</b>	<b>Fosfato</b>	<b>Bromo</b>	<b>Cloro</b>	<b>Sulfato</b>
<b>Septiembre</b>	0,015	0	0	0,5	0,02
<b>Octubre</b>	0,03	0,055	0,01	0,85	0,0325
<b>Noviembre</b>	0	0	0,0225	0,99725	0,806
<b>Diciembre</b>	0,0424	0,1024	0	1,2192	1,9242
<b>Enero</b>	0,016	1,994	1,564	1,564	8,206
<b>Febrero</b>	0,0556	3,2484	2,214	2,214	11,9514

*Tabla 3.- Parámetros físicos de los sitios muestreados según el mes.*

<b>Mes</b>	<b>Tm_agua</b>	<b>Turbidez</b>	<b>pH</b>	<b>Precipitación</b>	<b>Salinidad</b>
<b>Septiembre</b>	25,24	5,25	8,2	0,04	0,02
<b>Octubre</b>	25,6	16,075	7,375	0,57	0,035
<b>Noviembre</b>	25,675	18,15	8,2775	0,15	0,035
<b>Diciembre</b>	25,44	8,04	7,5	0,082	0,036
<b>Enero</b>	27,272	18,122	7,54	1,396	0,012
<b>Febrero</b>	27,062	96,96	6,828	2,854	0,09

### **3.1.2 Extracción de ADN**

En las 30 muestras de agua receptadas se obtuvo una concentración de al menos 30 microgramos por microlitro de ADN para la absorbancia de 230 nanómetros y una barra bien formada de ADN ambiental en gel. Las 5 muestras sin ADN pertenecientes a la toma de muestras con sedimentos del 28 de febrero de 2023 en las localidades de Balzar, Colimes, Nobol, Petrillo, Santa Lucia, (Estas muestras se excluyeron del análisis de PCR).

### **3.1.3 Resultados de PCR**

La prevalencia de cianobacterias a lo largo del río Daule es variable en espacio y tiempo mas no determinante para reportar la ausencia de una especie en el río Daule. El gen dominante asociado a la producción de microcistinas es el gen A detectado con el cebador mcyAcd, se detectaron 15 muestras positivas, todas amplificaron dos bandas, una con un tamaño aproximado de 300 pb acorde al fragmento esperado y otra de al menos 500 pb que permanece

indeterminada debido a que no pudo extraerse exitosamente. En el caso del gen B, la muestra Santa Lucía del 7 de diciembre de 2022 reportó un resultado positivo que podría estar asociado al género *Microcystis* (Ballesteros et al., 2018). De una misma forma, el gen E solo tuvo dos resultados positivos provenientes del muestreo en la localidad Balzar y San Rafael del 12 de enero de 2023 el cual también podría estar relacionado con alguna especie de *Microcystis* dada la selectividad del cebador. En el caso de los cebadores cat y cyrC que amplifican regiones de los genes cyrA y cyrC respectivamente obtuvieron 10 y 20 resultados positivos.

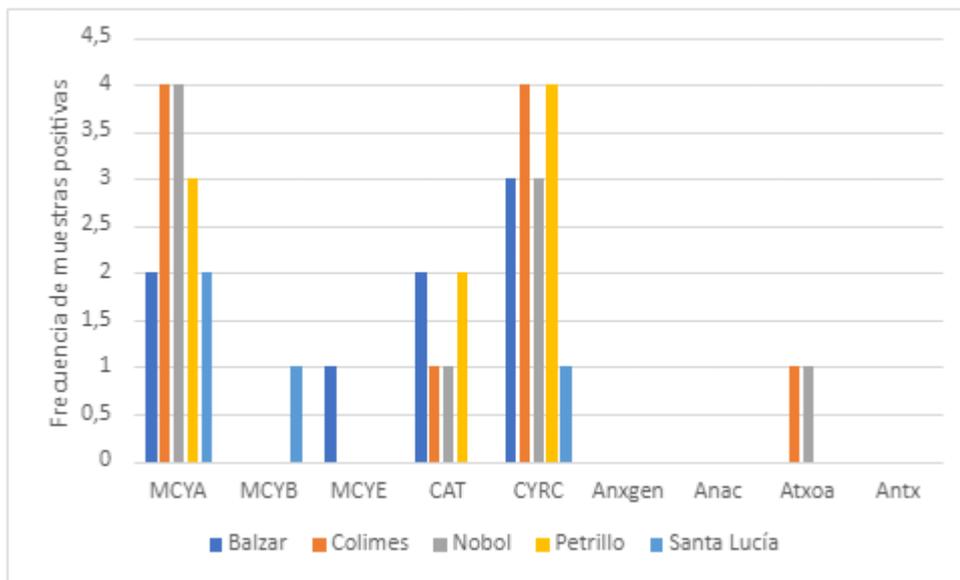


Figura 2.- Frecuencias de resultados positivos según el sitio de muestreo y el cebador.

### 3.1.4 Relación entre los resultados positivos y parámetros ambientales

La variación de los resultados positivos podría tener relación con la variación en los parámetros ambientales, en la figura 3, 4 y 5 vemos la variación de parámetros físicos y químicos de agua en conjunto al a variación de temperatura y precipitación de los sectores.

Exceptuando las variables que se mantienen constantes como la temperatura y pH, todas las variables presentan la misma tendencia al aumento a lo largo de los muestreos entre septiembre y febrero con la excepción del mes de enero en el cuál algunas variables parecen

haber tenido un decrecimiento previo a un alza en febrero mayor a la de los meses anterior. Este fenómeno muy probablemente pudo ocurrir por la inestabilidad metereológica entre diciembre y febrero mientras Ecuador iniciaba su temporada lluviosa. Los registros escritos reportaron fuertes lluvias que sobrepasaron la capacidad de la represa Daule Peripa y provocaron inundaciones y daños a comunas, de modo que, las medidas de emergencia que se tomaron en enero podrían explicar la irregularidad de la información y el alce en picada de las variables fisicoquímicas en febrero.

En la figura 6 se ilustra una gráfica de NMDS de un análisis multidimensional, al momento de medir las distancias entre cada punto de muestreo para cada fecha notamos que ninguna comunidad tenía relación entre sí y, al querer agruparla con los primers que resultaron positivos y las variables ambientales, estas resultaron ser independientes todas entre sí. A modo que, la presencia de genes relacionados a la producción de cianotoxinas es independiente de cualquier variable ambiental y está presente en todas las localidades del río Daule indiferente del momento y lugar. Estos resultados no son concluyentes para determinar cuándo se producirán FANs y la magnitud de los mismos.

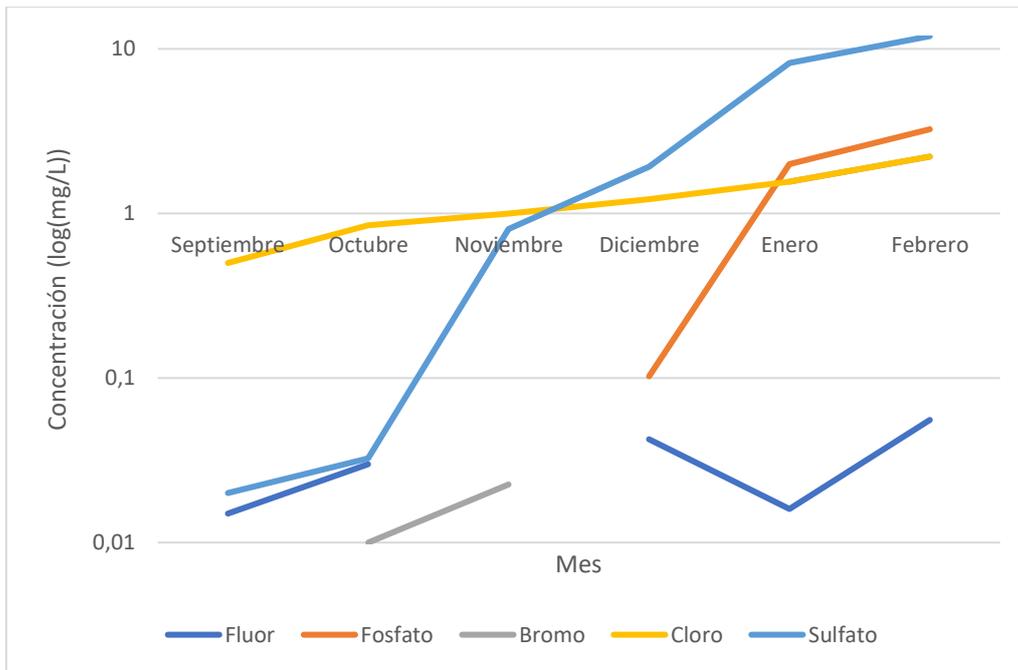


Figura 3.- Variaciones en los parámetros químicos a lo largo del tiempo de muestreo en meses.

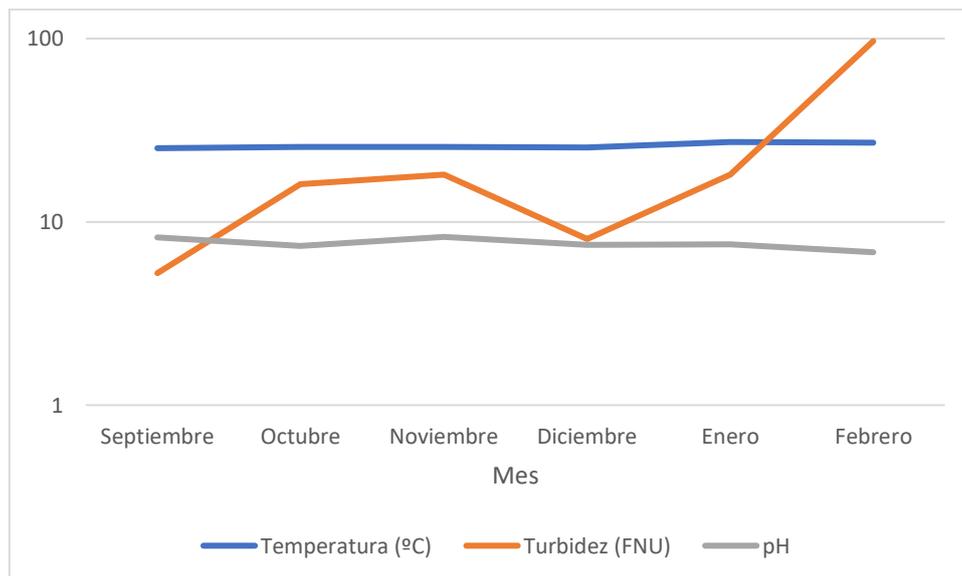
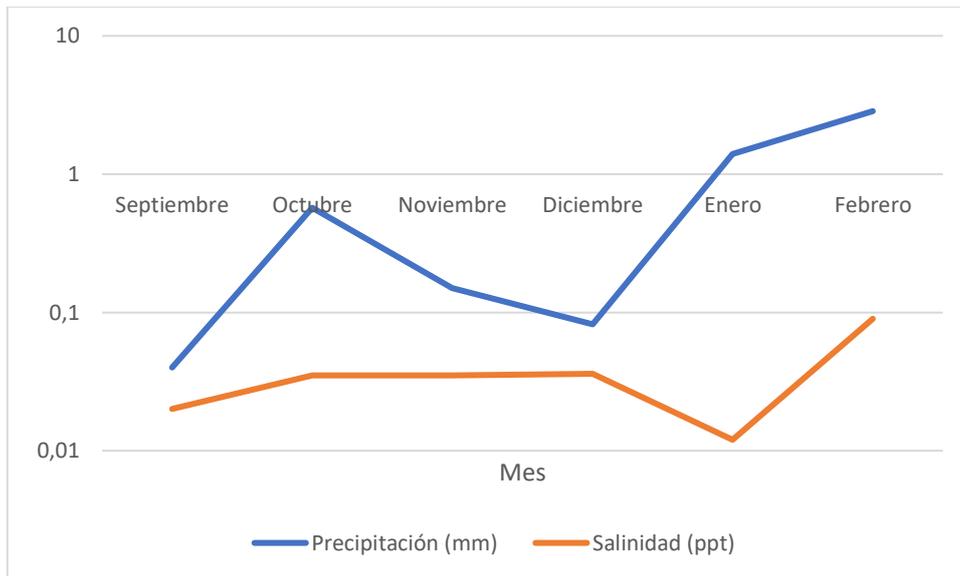


Figura 4.- Variaciones en la temperatura, turbidez y pH del agua a lo largo del tiempo de muestreo.



*Figura 5.- Variaciones en la precipitación media y salinidad a lo largo del tiempo de muestreo.*

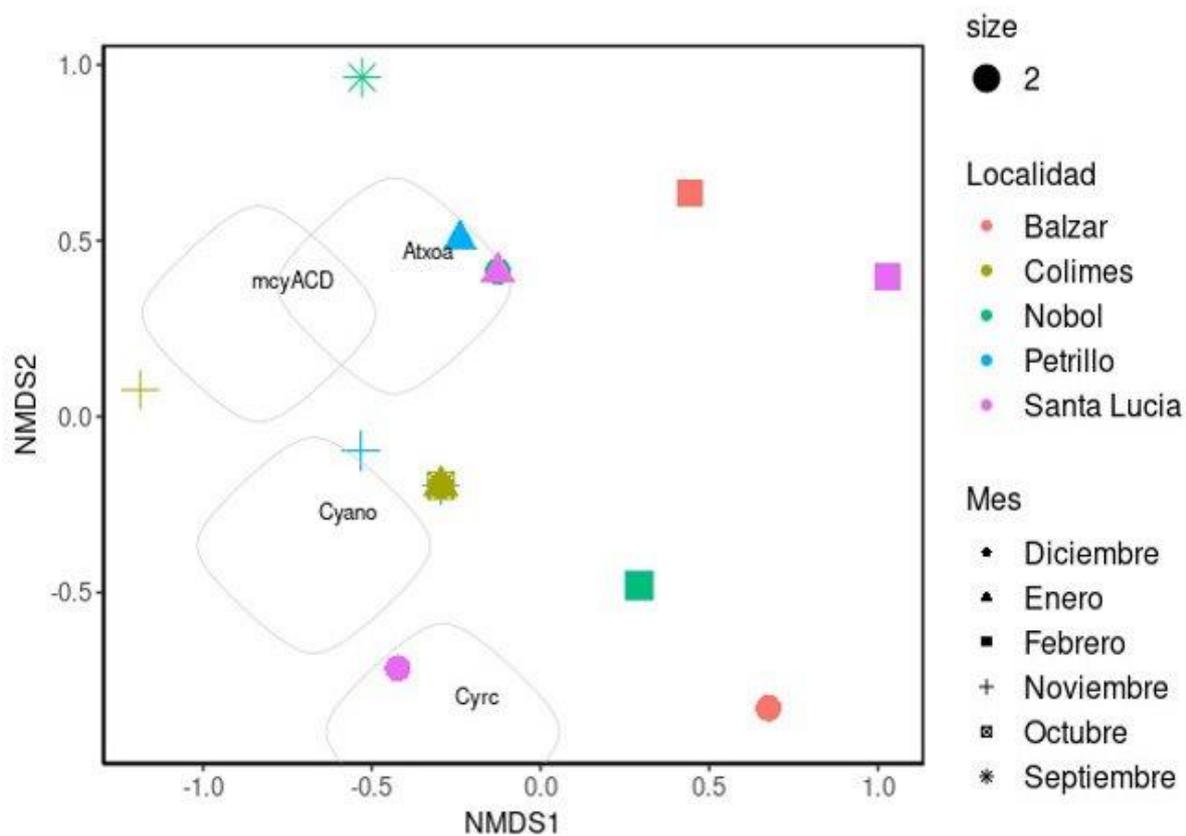


Figura 6.- NMDS de amplificaciones exitosas según el mes y el sitio de muestreo.

### 3.1.4 Transformación de amplicones

De los productos de PCR positivos obtenidos a lo largo de los ensayos, 4 muestras fueron purificadas y transformadas de manera exitosa. Estas muestras corresponden a las tomadas el 7 de diciembre de 2022 en las localidades de Colimes y Santa Lucía para los cebadores de microcistinas *mcyAcd* y *mcyB* respectivamente. Con respecto al grupo de cilindrospermposinas, se purificaron los amplicones correspondientes a los cebadores *cat* y *cyrC* de la muestra obtenida el 12 de enero de 2023 en Santa Elena. Los tamaños de amplicones (*mcyAcd*= 291 pb, *mcyB*= 973 pb, *cat*= 881 pb & *cyrC*= 325 pb) fueron verificados en geles de agarosa mediante electroforesis (véase Figuras 7 y 8).



Figura 7.- Productos amplificados de mcyAcid (a) y mcyB (b) seleccionados para la transformación.

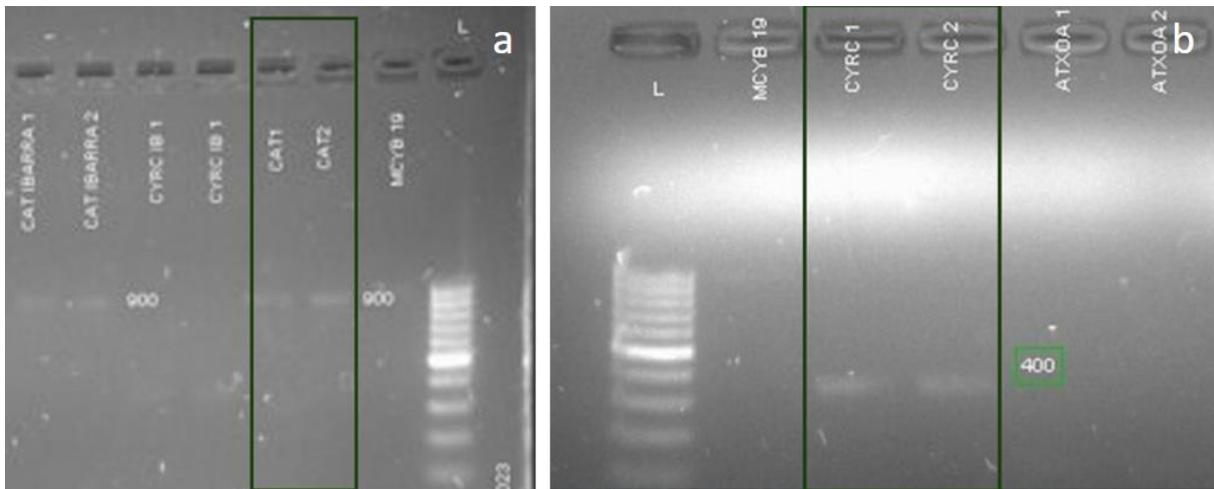


Figura 8.- Productos amplificados de cat (a) y cyrC (b) seleccionados para la transformación.

### 3.1.6 Identificación de fragmentos

La transformación de dichos productos permitió la selección de secuencias individuales del acervo presumiblemente obtenido tras la amplificación inicial de los ensayos de PCR. Cada colonia transformada contiene una secuencia particular, de las cuales se seleccionaron 2 por cada set de cebadores con amplicones purificados (mcyAcid, mcyB, cat y cyrC). De esta forma, se puede obtener por lo menos 1 secuencia única por cada cebador que amplifica regiones de genes asociados a la biosíntesis de cilindrospermopsinas y microcistinas. Se verificaron que

los tamaños de los amplicones fueran los esperados, tomando en cuenta que se usó el primer M13 (mcyA= 541 pb, mcyB= 1223 pb, cyrA= 1131 pb & cyrC= 575 pb). Los amplicones resultantes de los genes mcyA, mcyB, cyrA y cyrC que se introdujeron en plásmidos no han sido secuenciados durante la redacción de este trabajo por lo que no es posible realizar el análisis bioinformático que permita determinar la especie de procedencia. Esto permitiría el desarrollo de ensayos PCR más efectivos al diseñar cebadores a partir de secuencias de cepas locales.

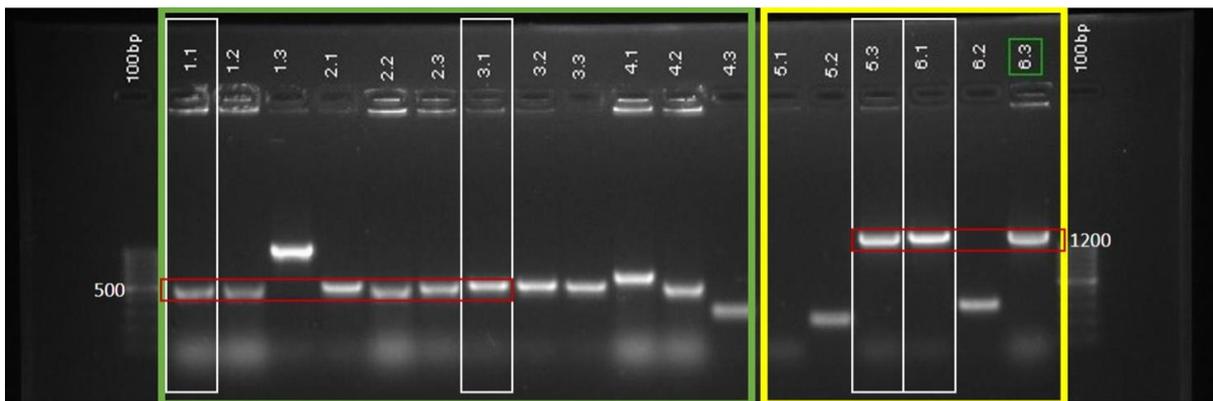


Figura 9.- Amplicones obtenidos de colonias transformadas con cebador mcyAcd (verde) y mcyB (amarillo).

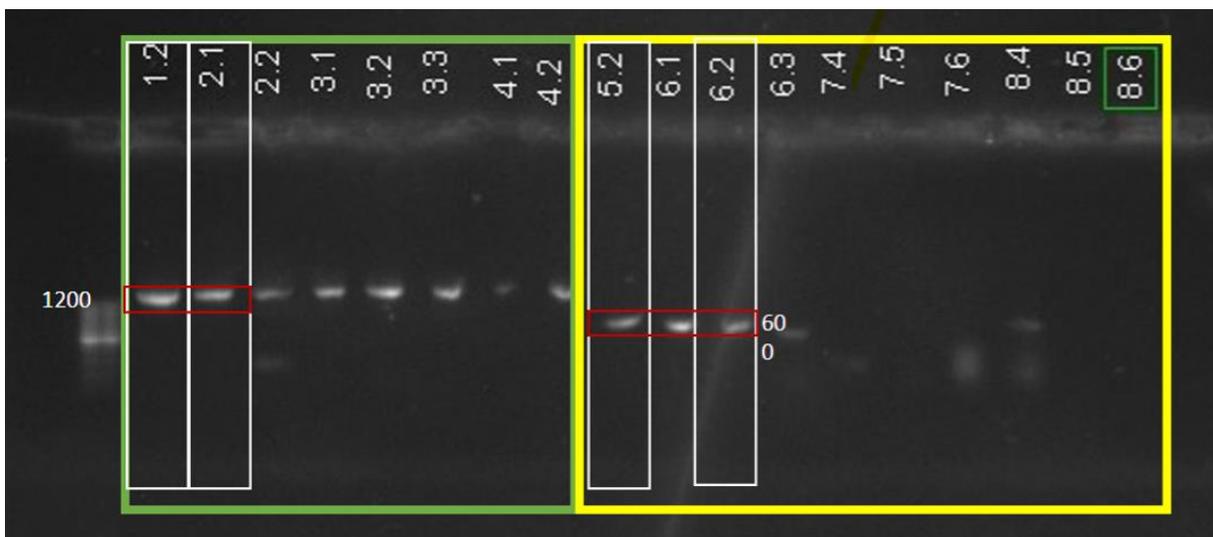


Figura 10.- Amplicones obtenidos de colonias transformadas con cebador cat (verde) y cyrC (amarillo).

### 3.1.7 Análisis de costos

El presente trabajo se realizó en un laboratorio de análisis moleculares en apoyo a un equipo de muestreo externo. En este sentido, la metodología de tecnología molecular para la detección de genes productores de cianotoxinas viene de la mano a los costos fijos de infraestructura y equipo con los que debería contar un laboratorio preestablecido citados en la tabla 4.

Los costos variables del proyecto en cambio incluyen los gastos de movilización, reactivos y procedimientos realizados en el análisis de cada muestra:

*Tabla 4.- Equipo empleado para la ejecución del proyecto.*

Nombre de equipo	Función	Costo (USD)
Bomba de vacío	Filtración de muestras	\$800
Kit de cristalería esmerilada para filtrar al vacío	Filtración de muestras	\$100
Máquina de baño maría	Extracción de ADN y transformación celular	\$3.000
Cámara de flujo laminar	Ensayos PCR	\$5.500
Termociclador	Ensayos PCR	\$8.000
Cámara de electroforesis	Verificación de resultados de extracción, purificación, PCR y transformación celular mediante electroforesis	\$1.100
Fuente de alimentación	Electroforesis	\$1.100
Transiluminador	Visualización del gel	\$1.300
Cámara de fotos	Registro visual de resultados	\$1.100
Multiparámetro de agua	Obtención de parámetros ambientales	\$4.000
Purificadora de agua	Suministro de agua destilada y agua libre de nucleasas	\$10.000
Centrífuga refrigerada	Extracción de ADN, purificación de productos de PCR	\$14.000

*Tabla 5.- Materiales empleados para la ejecución del proyecto.*

Nombre de materiales	Función	Costo (USD)
Envases de vidrio para autoclave	Contenedor de tubos Eppendorf	\$20
Tubos plásticos Eppendorf para centrífuga de 1.5 ml	Contenedor para reacciones PCR (tubos madre) y para almacenar productos de amplificación, extracción, purificación o transformación.	\$250
Tubos plásticos Eppendorf para PCR de 0.5 ml	Contenedor para reacciones PCR	\$250
Placas plásticas multi pocillos para PCR	Contenedor para reacciones PCR	\$250
Film adhesivo	Sellar placa multi pocillos	\$50
(x1000) Micro perlas para centrifugado	Extracción de ADN	\$15 x 1000 unidades
(x100) Hoja de bisturí desechable	Obtención de una réplica de ADN extraído	\$15
(x100) Placa Petri	Contenedor de las colonias transformadas	\$100
(x40) Envases plásticos de 1 L para transportar agua	Contenedor de agua muestreada	\$100

*Tabla 6.- Reactivos empleados para la ejecución del proyecto.*

Nombre de reactivo	Función	Costo (USD)
Etanol	Extracción de ADN	\$350
Isopropanol	Extracción de ADN	\$900
Agua ultra destilada	PCR	-
Buffer TAE 50X	Electroforesis	\$500
Tissue & Cell Lysis Solution - MasterPure Bulk Reagents	Extracción de ADN	\$288.30
Green TAQ polimerasa (promega)	PCR	\$100
Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer	PCR	\$264.00
Ladder de 100 pb (promega)	Electroforesis	\$233.10
Rnasa A	Extracción de ADN	\$250
Proteinasa K	Extracción de ADN	\$288.30
Ladder de 1 kb (promega)	Electroforesis	\$250.43
Medio LB	Cultivo celular	\$90
Medio Agar	Cultivo celular	\$90

Células competentes JM109	Transformación celular	\$200
Kit de purificación de productos PCR	Purificación de productos PCR	\$500
Kit de purificación de productos de PCR en gel de agarosa	Purificación de productos PCR	\$300

## Capítulo 4

## 4.1 Conclusiones

La técnica de PCR en el presente proyecto demostró su capacidad como herramienta molecular de detección de genes involucrados en la síntesis de cianotoxinas. Además, su bajo nivel de esfuerzo y preparación y análisis de muestras en comparación con otras técnicas (p. ej. LC/MS-MS, identificación taxonómica por microscopía o ELISA) le coloca como una alternativa viable para el monitoreo preventivo de eventos de floraciones. El potencial de esta metodología se demuestra como piedra fundadora del desarrollo de herramientas que permitan la caracterización y modelado de tanto eventos de floraciones nocivas como la producción de cianotoxinas en cuerpos de agua de Ecuador.

La obtención de 25 de 30 resultados positivos en la detección del gen 16S de cianobacterias en los sitios de muestreo del Río Daule demuestra que la técnica de PCR utilizando ADN ambiental es adecuada para la determinación de la existencia de cianobacterias en el ecosistema de agua dulce. Por otra parte, la presencia de productos positivos de PCR para los cebadores de microcistinas (mcyAcd= 15, mcyB= 1, mcyE= 1), cilindrospermopsinas (cat= 6, cyrC= 15), y en menor medida anatoxinas (Atxoa= 2), indicaría que el Río Daule es un sitio pertinente para la realización de estudios de tamizaje y caracterización molecular de cianobacterias.

Los procesos de transformación celular realizados a las muestras que pudieron purificarse exitosamente (amplificación de mcyAcd obtenido a partir de la muestra tomada el 7 de diciembre en Colimes, mcyB obtenido de la muestra tomada el 7 de diciembre en Santa Lucía, y cat junto a cyrC obtenidos de la muestra tomada el 12 de enero de 2023) permitirían el diseño de cebadores más específicos para ensayos de PCR una vez se realice la secuenciación. De esta manera, se da paso a una continuidad en futuros estudios orientados al desarrollo de técnicas de monitoreo de cianobacterias en cuerpos de agua.

En conclusión, el río Daule posee las características necesarias para iniciar un evento de FANs, con este estudio, hemos determinado la presencia de cianobacterias capaces de sintetizar microcistinas y cilindropermopsinas en base a los análisis moleculares, de igual forma, consideramos que la acumulación de agua en la represa Daule Peripa podría ser un sitio de proliferación de HABs al igual que otro sitio de retención que se pueda construir a futuro. Si bien nuestro análisis no es determinante para confirmar si han sucedido FANs o no durante el periodo de muestreo, si puede contribuir al desarrollo de tecnologías de qPCR que permitan cuantificar y aportar al desarrollo de futuros análisis de riesgos en el río Daule.

#### **4.2 Recomendaciones**

Si bien es cierto, el proyecto es un modesto paso para futuras investigaciones y estudios en las dinámicas de las cianobacterias y la producción de cianotoxinas a nivel nacional, pero existen aspectos que podrían robustecer la calidad de los resultados y análisis obtenidos. En primer lugar, los sitios de muestreo podrían incluir al embalse Daule-Peripa, cantones de la parte alta del río Daule como Pichincha, y sitios de la parte baja como Guayaquil o La Puntilla. Recordando que el río Daule se trata de una cuenca de hasta 15.000 km<sup>2</sup> de extensión, un mayor número de sitios de muestreo, sobre todo en la parte alta, aseguran datos que pueden incorporarse a un análisis que podría explicar con mayor detalle la dinámica de aparición de cianobacterias potencialmente tóxicas en una escala espacial. También se debe considerar incluir áreas próximas a las rurales y a fábricas para el monitoreo de flujos de contaminantes y nutrientes que podrían aumentar el riesgo de floraciones nocivas.

Por otra parte, debido a las condiciones climáticas considerablemente variables que experimenta Ecuador a lo largo del año, es recomendable que las fechas y horas de muestreo y toma de datos ambientales se realicen en las mismas franjas de tiempo. Adicionalmente, se pueden realizar o consultar con servicios meteorológicos las condiciones climáticas específicas

de los sitios de muestreo para plantear análisis estadísticos multivariados que permitan identificar el grado de relación con respecto a los resultados positivos de la aparición de genes involucrados en la síntesis de cianotoxinas.

Un monitoreo periódico y a largo plazo podría contribuir con información valiosa para el desarrollo de un programa regional de manejo de cianobacterias. Utilizar herramientas bioinformáticas para estudios metagenómicos y filogenéticos procurarían resultados invaluable para el desarrollo del proyecto. También se debe reconocer que la implementación de otras técnicas (p. ej. LC-MS/MS, ELISA, qPCR, identificación por microscopía o fluorimetría) pueden implementarse de manera complementaria para un sistema robusto. Dicho sistema debería involucrar procedimientos para la estimación de un riesgo, la toma de parámetros ambientales y genéticos, y la cuantificación de cianotoxinas y cianobacterias en el cuerpo de agua para la formulación de estrategias adecuadas para combatir o mitigar eventos de floraciones nocivas. Siendo ese el caso, el presente proyecto corresponde a un parámetro de la segunda fase previamente descrita.

Finalmente, el rango del que puede partir el presente proyecto de investigación alcanzaría a integrar a las comunidades aledañas al río Daule, a los municipios, centros de investigación y a las empresas privadas interesadas en la calidad del agua. La educación a las personas que habitan en los sitios colindantes al río Daule podría facilitar el monitoreo con reportes de cambios visuales en el agua, aumentando la agencia y la participación social sobre la problemática. Consecuentemente, es posible el desarrollo de sistemas de alerta temprana que pueden utilizar autoridades de las comunidades y socios inversores para la caracterización oportuna de un potencial evento de floración cianobacteriana. La participación de los municipios y del gobierno permitiría el desarrollo de un programa propio de manejo de cianobacterias en cuerpos de agua a nivel nacional. Con estos aspectos descritos, se plantea un

plan de desarrollo e investigación adaptativo según la información que recaba con el tiempo y que permitiría abordar a la problemática emerge de manera integral.

## Referencias bibliográficas

- Aguilera, A., Almanza, V., Haakonsson, S., Palacio, H., Benitez Rodas, G. A., Barros, M. U. G., Capelo-Neto, J., Urrutia, R., Aubriot, L., & Bonilla, S. (2023). Cyanobacterial bloom monitoring and assessment in Latin America. In *Harmful Algae* (Vol. 125). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102429>
- Aronstam, R. S., & Witkop, B. (1981). Anatoxin-a interactions with cholinergic synaptic molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(7), 4639–4643. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4639><https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4639>
- Ballesteros, I., de la Cruz, S., Rojas, M., Salazar, G., Martínez-Fresneda, M., & Castillejo, P. (2022). Screening of cyanotoxin producing genes in Ecuadorian freshwater systems. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 34. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2122>
- Ballot, A., Fastner, J., Lentz, M., Wiedner, C., 2010. First report of anatoxin-a producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in Northeastern Germany. *Toxicon* 56, 964–971.
- Barón-Sola, Á., Ouahid, Y., & del Campo, F. F. (2012). Detection of potentially producing cylindrospermopsin and microcystin strains in mixed populations of cyanobacteria by simultaneous amplification of cylindrospermopsin and microcystin gene regions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.022>
- Batista, T., De Sousa, G., Suput, J. S., Rahmani, R., & Šuput, D. (2003). Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatic cells. *Aquatic Toxicology*, 65(1), 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00108-5) Bláha, L.,

- Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(2), 36–41.  
<https://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2>
- Bolaños-Villegas, P., Cabrerizo, F., Brown, F., Zancan, P., Barrera, J. F., González-Muñoz, P. A., Grecco, H., Kalergis, A., Paula-Lima, A., & Vargas-Balda, R. (2020). Article title: Latin America: Reduced S&T Investment Puts Sustainable Development at Risk. *ScienceOpen Preprints*. <https://doi.org/10.14293/S2199-1006.1.SOR-.PPBPKUJ.v3>
- Cardona, T., Sánchez-Baracaldo, P., Rutherford, A. W., & Larkum, A. W. (2019). Early Archean origin of Photosystem II. *Geobiology*, 17(2), 127–150.  
<https://doi.org/10.1111/gbi.12322>
- Carmichael, W. (2008). Chapter 4: A world overview-One-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria-Where do we go from here?
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R., & Eaglesham, G. K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109(7), 663–668. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109663>
- Cerasino, Leonardo. (2017). Analysis of Anatoxin-a and Cylindrospermopsin by Ultra High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.  
10.1002/9781119068761.ch51.
- Chorus, I., & Welker, M. (2021). *Toxic Cyanobacteria in Water; A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management; Second Edition*.

- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., & Dittmann, E. (2003). Microcystin Biosynthesis in *Planktothrix* : Genes, Evolution, and Manipulation. *Journal of Bacteriology*, 185(2), 564–572. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.564-572.2003>
- Churro, C., & Valério, E. (2015). Abordagem multidisciplinar na identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas. 4(11). Codd, G. A., Lindsay, J., Young, F. M., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005). Harmful Cyanobacteria. In *Harmful Cyanobacteria* (pp. 1–23). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3_1)
- Codd, G. A., & Metcalf, J. S. (2014). Toxic and non-toxic cyanobacteria: evolving concepts. *Perspectives in Phycology*, 1(1), 3–5. <https://doi.org/10.1127/2198-011x/2014/0004>
- Dantas, Ê. W., Moura, A. N., Do, M., & Bittencourt-Oliveira, C. (2011). Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. 83(4), 1327–1338. [www.scielo.br/aabc](http://www.scielo.br/aabc)
- Devlin, J. P., Edwards, O. E., Gorham, P. R., Hunter, N. R., Pike, R. K., & Stavric, B. (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Canadian Journal of Chemistry*, 55(8), 1367–1371. <https://doi.org/10.1139/v77-189>
- Dörr, F. A., Pinto, E., Soares, R. M., & Feliciano de Oliveira e Azevedo, S. M. (2010). Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. In *Toxicon* (Vol. 56, Issue 7, pp. 1247–1256). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.018>
- Flores Abad, E. R., & Álvarez Gutiérrez, Y. M. (2022). Estimación de los niveles de vulnerabilidad en los asentamientos humanos frente a inundaciones en la cuenca

hidrográfica del Río Daule. Pro Sciences: Revista De Producción, Ciencias E Investigación, 6(43),322-332. <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol6iss43.2022pp322-332>

Gautam, A. (2022). Isolation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis (pp. 55–61). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_6)

Gómez-Oliván, L. M. (2019). Pollution of water bodies in Latin America. In *Springer eBooks*. Springer Nature Switzerland AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-27296-8>

Griffiths, D. J., & Saker, M. L. (2003). The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*, 18(2), 78–93. <https://doi.org/10.1002/tox.10103>

Gupta, R. C. (2009). Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents.

Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W. P., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A., Humphries, E., Lewitus, A. J., Magnien, R. E., Marshall, H. G., Sellner, K. G., Stockwell, D. A., Stoecker, D. K., & Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.006>

Hodoki, Y., Ohbayashi, K., Kobayashi, Y., Takasu, H., Okuda, N., & Nakano, S. (2013).

Anatoxin-a-producing *Raphidiopsis mediterranea* Skuja var. *grandis* Hill is one ecotype of non-heterocytous *Cuspidothrix issatschenkoi* (Usačev) Rajaniemi et al. in Japanese lakes. *Harmful Algae*, 21–22, 44–53.

<https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.11.007>

- Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 8, pp. 471–483). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- IANAS. (2019). *Water Quality in the Americas Risks and Opportunities*. Janssen, E. M. L. (2019). Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. In *Water Research* (Vol. 151, pp. 488–499). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048>
- Invitrogen. (2002). M13/pUC Reverse Amplification Primers.
- Jiang, Y., Song, G., Pan, Q., Yang, Y., & Li, R. (2015). Identification of genes for anatoxin-a biosynthesis in *Cuspidothrix issatschenkoi*. *Harmful Algae*, 46, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.05.005>
- Jungblut, A.-D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D. R., Burns, B. P., & Neilan, B. A. (2005). Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environmental Microbiology*, 7(4), 519–529. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00717.x>
- Kellmann, R., Mills, T., & Neilan, B. A. (2006). Functional Modeling and Phylogenetic Distribution of Putative Cylindrospermopsin Biosynthesis Enzymes. *Journal of Molecular Evolution*, 62(3), 267–280. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0030-6>
- Lei, L., Peng, L., Huang, X., & Han, B.-P. (2014). Occurrence and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* and dissolved cylindrospermopsin in urban reservoirs used for drinking water supply, South China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(5), 3079–3090. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3602-8>

- Méjean, A., Peyraud-Thomas, C., Kerbrat, A. S., Golubic, S., Pauillac, S., Chinain, M., & Laurent, D. (2010). First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia. *Toxicon*, 56(5), 829–835.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.029>
- Menescal, M. T. a. P., Almeida, E. D. S., Sales, E. A., Méjean, A., & Yéprémian, C. (2023). Identification of cyanobacteria and its potential toxins in the Joanes I Reservoir, Bahia, Brazil. *Toxins*, 15(1), 51. <https://doi.org/10.3390/toxins15010051>
- Mihali, T. K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K. D., & Neilan, B. A. (2008). Characterization of the Gene Cluster Responsible for Cylindrospermopsin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 716–722.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01988-07>
- Monteiro, S., Santos, R., Bláha, L., & Codd, G. (2017). Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. In J. Meriluoto, L. Spoof, & G. Codd (Eds.), *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* (pp. i–xxviii). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.fmatter>
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., & Arévalo, A. (2013). *Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos Proyecto PROMETEO-SENESCyT.*
- O'neil, C. S., Beach, J. L., & Gruber, T. D. (2019). DNA Electrophoresis Using Thiazole Orange Instead of Ethidium Bromide or Alternative Dyes. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(145). <https://doi.org/10.3791/59341>

- Prado Lucio-Paredes, J. J., Abdo, A., Vivero Rosero, M. B., Bayas, E., Iza, C., Robayo, M., & Velasco, C. (2023). Informe Mensual. [www.produccion.gob.ec](http://www.produccion.gob.ec)
- Pinheiro Menescal, M. T. A., Almeida, E. dos S., Sales, E. A., Méjean, A., & Yéprémian, C. (2023). Identification of Cyanobacteria and Its Potential Toxins in the Joanes I Reservoir, Bahia, Brazil. *Toxins*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/toxins15010051>
- Promega. (2012). GoTaq® Green Master Mix Product Information 9PIM712. [www.promega.com/biomath/](http://www.promega.com/biomath/)
- Promega. (2019). Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Instructions for Use of Products A9280, A9281, A9282 and A9285. [www.promega.com](http://www.promega.com)
- Promega Corporation. (2021). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. [www.promega.com](http://www.promega.com)
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B. L., Buikema, W. J., Haselkorn, R., & Sivonen, K. (2004). Genes Coding for Hepatotoxic Heptapeptides (Microcystins) in the Cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 686–692. <https://doi.org/10.1128/aem.70.2.686-692.2004>
- Rzymiski, P., & Poniedziałek, B. (2014). In search of environmental role of cylindrospermopsin: A review on global distribution and ecology of its producers. In *Water Research* (Vol. 66, pp. 320–337). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.029><https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.029>
- Sabart, M., Crenn, K., Perrière, F., Abila, A., Lereboure, M., Colombet, J., Jousse, C., Latour, D., 2015. Co-occurrence of microcystin and anatoxin-a in the freshwater lake

Aydat (France): analytical and molecular approaches during a three-year survey.  
*Harmful Algae* 48, 12–20.

Sanderson, B., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 454, 44–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003>

Shalev-Alon, G., Sukenik, A., Livnah, O., Schwarz, R., & Kaplan, A. (2002). A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 209(1), 87–91.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11114.x>

Sivonen, K., Himberg, K., Luukkainen, R., Niemelä, S. I., Poon, G. K., & Codd, G. A. (1989). Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment*, 4(3), 339–352.  
<https://doi.org/10.1002/tox.2540040310>

Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi, N., Drobac Backović, D., Chen, L., Meriluoto, J., & Codd, G. A. (2019). Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. In *Archives of Toxicology* (Vol. 93, Issue 9, pp. 2429–2481). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>

Thermo Scientific. (2015). CERTIFICATE OF ANALYSIS.

Thermo Scientific. (2018). Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR Master Mix #\_ Lot \_ Expiry Date \_ Store at -20 °C Ordering information. [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

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. *Chemistry & Biology*, 7(10), 753–764. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00021-1)

Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., & Tenreiro, R. (2010). Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples.

*Environmental Toxicology*, 25(3), 251–260. <https://doi.org/10.1002/tox.20502>

Vico, P., Bonilla, S., Cremella, B., Aubriot, L., Iriarte, A., & Piccini, C. (2020).

Biogeography of the cyanobacterium *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*:

Integrating genomics, phylogenetic and toxicity data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 148, 106824. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106824>

Ylinen, A., Känä, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K. A.,

Gugger, M., & Sivonen, K. (2011). Anatoxin-a Synthetase Gene Cluster of the

Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 37 and Molecular Methods To Detect Potential Producers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7271–7278.

<https://doi.org/10.1128/aem.06022-11>