



**Facultad de Ciencias Exactas  
Universidad Nacional de La Plata**

**Tesis para optar al Título de Magister en Tecnología e Higiene de  
los Alimentos**

**OCCURRENCIA DE FLORACIONES DE CYANOBACTERIAS  
TOXICAS EN CUERPOS DE AGUA DULCE, ARGENTINA.  
ESTUDIO DE CAMPO Y ANALISIS DE DATOS.**

**Georgina Carvajal**

Director: Dra. Leda Giannuzzi

Co Director: Dr. Dario Andrinolo

**Lugar de Trabajo: Cátedra de Toxicología de la Facultad de Ciencias  
Exactas, Laboratorio Científico de Ficología, Facultad de Ciencias  
Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata.**

**2011**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por su infinita bondad y misericordia, quien me brindo la sabiduría y la salud para presentar este trabajo de graduación.

Me gustaría agradecer la ayuda recibida por parte de mis directores de tesis, la Dra. Leda Giannuzzi y al Dr. Darío Andrinolo, que han orientado y encauzado mis pasos durante este tiempo, así como todas sus aportaciones recibidas, la elaboración de muestreo de campo y el tratamiento de datos para que este trabajo fuese culminado satisfactoriamente.

No quería dejar de mencionar todas las aportaciones del Dr. Ricardo Echenique, gracias a su colaboración y asesoramiento durante el desarrollo de este proyecto en el Laboratorio del Museo de la Facultad de Ciencias Naturales de la UNLP, especialmente en el campo de la identificación y determinación de cianobacterias y otras algas microscópicas, sin las que esta memoria no podría haberse realizado.

Igualmente agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, que de forma completamente desinteresada me facilitaron las instalaciones y equipos del Laboratorio de la Cátedra de Toxicología, para el desarrollo de esta tesis.

Agradezco también a LASPAU-OEA por haberme otorgado la beca para la realización de la Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos y a todo el grupo de CIDCA, mil gracias por su apoyo.....

**Georgina**

## ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	12
2.1. Cianobacterias.....	13
2.2. Generalidades.....	14
2.3. Eutrofización.....	18
2.4. Florecimientos.....	20
2.5. Cianobacterias y su relación con sabor y olor en agua potable.....	23
2.6. Cianotoxinas.....	24
2.7. Tipos de cianotoxinas, modos de acción y efectos.....	25
2.8. Microcistinas.....	29
2.9. Intoxicaciones con cianotoxinas.....	32
2.9.1. Intoxicación en una unidad de hemodiálisis en Carurú, Brasil.....	32
2.9.2. Sintomatología del Síndrome Caruaru.....	33
2.9.3. Otras intoxicaciones agudas informadas en seres humanos.....	33
2.10. Factores que regulan el crecimiento de cianobacterias y la formación de cianotoxinas.....	34
2.10.1. Disponibilidad de luz.....	35
2.10.2. Zona de mezcla.....	36
2.10.3. Zona eufótica y zona de mezcla en la columna de agua.....	36
2.10.4. Temperatura.....	38
2.10.5. Disponibilidad de nutrientes.....	39
2.10.6. Resistencia al pastoreo por zooplancton.....	44
2.10.7. Factores combinados.....	45
2.11. Floraciones de Cianobacterias toxígenas en la República Argentina.....	46
2.12. Impacto de las cianobacterias tóxicas.....	48
2.12.1 Salud humana.....	48

2.12.2. Aguas recreacionales.....	49
2.12.3. Agua de red.....	50
2.12.3. Salud animal.....	51
2.13. Medidas preventivas para reducir riesgo por exposición a cianobacterias.....	52
2.14. Beneficios.....	52
2. 15. Métodos de identificación de cianotoxinas.....	55
2.15. 1. HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución).....	55
2.15.2. Cromatografía Gaseosa.....	56
2.15.3. Ensayo de la Enzima inmunoabsorbente (ELISA).....	57
3. Objetivos.....	59
3.1. Objetivo general.....	61
3.2. Objetivos específicos.....	61
4. Materiales y Métodos.....	62
4.1. Puntos de Muestreo.....	63
4.1.1. Tomas de muestras.....	64
4.1.1 En el Río de la Plata y en las lagunas.....	64
4.1.2. En red de distribución domiciliaria.....	65
4. 2. Análisis fitoplanctónicos.....	65
4. 3. Parámetros fisicoquímicos.....	67
4.3.1. Monitoreo de los parámetros y métodos analíticos utilizados.....	67
4. 4. Determinación de Clorofilal-a.....	69
4.5. Examen bacteriológico.....	70
4. 5. 1. Determinación del número de coliformes totales, fecales y Escherichia coli, mediante la técnica de fermentación de tubos múltiples.....	70
4.6. Aislamiento y cultivo de cianobacterias.....	73
4. 6.1. Preparación del medio de cultivo Z8.....	73
4.6.2. Aislamiento y generación de cultivos de cianobacterias.....	74

4.7. Protocolo para la detección de Microscistinas presentes en florecimientos cianobacterianos...	75
4.7.1. Bioensayos ratón.....	75
4.7.1.1. Preparación de los ratones.....	75
4.7.1.2. Inyección de los ratones.....	75
4.7.2. Protocolo para la extracción detección y cuantificación de las cianotoxinas.....	76
5. Estudio Cual-Cuantitativo de algas fitoplanctonicas en los espacios muestreados.....	78
5. 1. Breve descripción de los espacios muestreados.....	79
5.1.1. Río de La Plata.....	79
5.1.2. Laguna Aeroclub y Laguna Salada.....	81
5.2. Estudio cualitativo de cianobacterias en muestras provenientes diferentes ambientes.....	81
5.2.1. Cianobacterias halladas en muestras provenientes del Río de la Plata.....	82
5.2.2. Estudio cualitativo de cianobacterias en muestras provenientes de las lagunas.....	85
5.2.2.1. Laguna Aeroclub.....	85
5. 2. 2.2. Laguna Salada.....	86
5. 3. Aislamiento y cultivo de cianobacterias en floraciones de los cuerpos de agua estudiados.....	89
5. 4. Estudio cuantitativo de los diferentes taxa hallados en el Río de la Plata.....	90
6. Factores que afectan el desarrollo de cianobacterias y cianotoxinas.....	95
6. 1. Introducción.....	96
6.2. Variación de la temperatura en función del tiempo.....	96
6. 3. Variación del pH en función del tiempo.....	98
6. 4. Variación de la conductividad en función del tiempo.....	100
6. 5. Variación del contenido de hierro en función del tiempo.....	101
6. 6. Nutrientes.....	103
6. 6. 1. Variación del contenido de fósforo total en función del tiempo.....	104
6. 6. 2. Variación del contenido de Nitrato en función del tiempo.....	107
6. 6. 3. Variación del contenido de Nitrito en función del tiempo.....	108
6. 7. Variación del número de Coliformes totales y fecales en función del tiempo.....	110

6. 8. Variación del número de Cianobacteria en función del tiempo.....	112
6. 8. 1. Variación del número de Microcystis aeruginosa en función del tiempo.....	115
6. 9. Variación de los valores de Clorofila a en función del tiempo.....	117
6.10. Variación de los valores de Microcistina-LR.....	118
6. 10.1. En los ambientes estudiados en función del tiempo.....	118
6. 10.2. Variación de los valores de Microcistina-LR en muestras de agua red.....	123
6.10.3. Cuantificación de Microcistinas en extracto de células de Microcystis aeruginosa en cultivo.....	125
7. Analisis estadístico de los datos monitoreados.....	127
7. 1. Introducción.....	128
7.2. Análisis de componentes principales.....	128
7.3. Pretratamiento de los datos.....	129
7.4. Aplicación de Análisis de Componentes Principales a los datos experimentales.....	130
7.4.1. Análisis de componentes principales del punto de muestreo Rotonda.....	131
7. 4. 2. Análisis de componentes principales del punto de muestreo Isla Santiago.....	134
7. 4. 3. Análisis de componentes principales del punto de muestreo Toma de Agua.....	138
8. Conclusiones.....	144
9. Bibliografía.....	151
10. Anexo.....	168

# **1. RESUMEN**

Las cianobacterias constituyen un grupo taxonómico de organismos diversos que colonizan ambientes acuáticos y bajo ciertas condiciones ambientales aumentan exponencialmente su biomasa produciendo toxinas que generan serios problemas sanitarios y medioambientales. *Microcystis aeruginosa*, la cepa causante de la mayoría de estos episodios produce la cianotoxina más ubicua, Microcistina de reconocido efecto hepatotóxico.

En los últimos años se ha informado la aparición de coloración verdosa en la superficie de las aguas así como aparición de peces muertos en las costas del Río de la Plata que es debido al florecimiento cianobacteriano.

Las microcistinas son las únicas toxinas identificadas en La cuenca del Plata. Los análisis de toxinas revelan la existencia de al menos 6 microcistinas

Se puede afirmar que el riesgo relativo que representa la presencia de las cianobacterias y de las Microcistinas en la cuenca del Plata es enorme, dado:

- 1.- La intensidad de las floraciones.
- 2.-La diversidad de cepas de *Microcystis aeruginosa* que crecen en distintos ambientes
- 3.-El área que abarca el fenómeno
- 4.-La toxicidad que presentan las diferentes cepas y el número de microcistinas producidas.
- 5.-La magnitud de su posible impacto sobre la población
- 6.-Que puede afectar fuertemente un recurso tan valioso como las fuentes de agua potable y el agua potable misma.

Los niveles de exposición a las cianotoxinas se desconocen. La epidemiología de las intoxicaciones con hepatotoxinas y de otras cianotoxinas en Argentina es nula.

La imposibilidad de monitorear la presencia de cianobacterias y cianotoxinas en el ambiente y el agua de red por falta de recursos y acceso a las tecnologías adecuadas es sin duda la primera limitante en la detección del fenómeno y en la investigación científica de la problemática en Argentina.

A los efectos de comprender las causas del desarrollo de las floraciones de cianobacterias es necesario entender cuáles son las condiciones particulares que las favorecen en el ecosistema.

El crecimiento de las cianobacterias frente a la disponibilidad de los nutrientes disueltos es otro aspecto que aún requiere investigación.

Para lograr una correcta evaluación de la ocurrencia de floraciones de cianobacterias y sus cianotoxinas se requiere implementar un monitoreo que incluya la observación del sistema a estudiar, la obtención de muestras para analizar los aspectos bióticos (presencia de cianobacterias y toxinas) y el registro de variables abióticas relacionadas con el crecimiento de las cianobacterias.

Por ello, se llevó a cabo un monitoreo mensual de cianobacterias y cianotoxinas y se investigó los factores condicionantes que guardan una relación dinámica con la aparición de los florecimientos cianotoxicos, identificando especies y su toxicidad en estaciones de muestreo en la franja costera del Río La Plata de uso recreacional, pesca deportiva, toma de agua para el consumo humano y dos lagunas cercanas al Río.

En nuestros resultados se determinó que las condiciones del Río de la Plata se están viendo deterioradas por el incremento de factores ligados a la eutrofización de las aguas como la clorofila ( $208\mu\text{g.L}^{-1}$ ), N-  $\text{NO}_3$  ( $2.7\text{ mg.L}^{-1}$ ) y el fósforo total ( $4.8\text{ mg.L}^{-1}$ ) que favorecen el desarrollo de floraciones de cianobacterias.

También, se ha registrado valores de pH (10.2) que no cumplen con los niveles guías de calidad de la Cuenca del Plata y grados de contaminación fecal (2156 NMP/100ml) en los puntos muestreados del Río La Plata que muestran la deficiente calidad de este reservorio en su aspecto sanitario, ya sea para uso recreacional o como fuente de agua para ser potabilizada debido a los elevados niveles encontrados. El 83 % de las muestras analizadas fueron positivas en la tipificación de *Escherichia coli* en todos los meses estudiados a excepción de junio y agosto.

Los niveles de cianobacterias en los diferentes ambientes superan ampliamente los niveles de alerta alta fundamentalmente en períodos de temperaturas elevadas.

Las concentraciones de Microcistina LR registradas en el Río La Plata alcanzaron niveles de  $8.6\mu\text{g.L}^{-1}$ . Una mayor producción de Microcistinas-LR se observó en meses de verano cuando la temperatura incrementa y disminuyen los niveles de hierro a  $0.01\text{ mg.L}^{-1}$ .

El presente trabajo logró aislar y poner en cultivo una cepa toxicogénica identificada como *Microcystis aeruginosa* extraída del ambiente.

La caracterización de la cepa aislada y puesta en cultivo produce dos tipos de Microcistina- LR y YR.

La evaluación de la toxicidad mediante ensayo ratón de los extractos extraídos de las muestras tomadas reveló que los hígados de los ratones tratados mostraron disrupción masiva de la arquitectura lobular y sinusoidal del hígado, dilatación de los vasos hepáticos, pérdida de hepatocitos y displasia indicando la severidad de las cepas analizadas.

El estudio de los niveles de Microcistinas –LR en agua de red de domicilios pertenecientes a la ciudad de Ensenada y La Plata indicó que en determinadas fechas del año los niveles superan los valores propuestos por la OMS (19989) como valor límite de seguridad de Microcistina que es de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  por lo que se considera que el proceso de tratamiento aplicado para el tratamiento es deficiente.

En base a esta información podemos concluir que la exposición a cianotoxinas a través del abastecimiento de agua representa un riesgo real para la salud de la población debiendo evaluarse su impacto.

El Análisis de Componentes Principales aplicado permitió identificar los factores más influyentes en el análisis realizado. Se monitorearon 13 parámetros que indican calidad de agua y mediante el Análisis de Componentes Principales se pudo reducir los parámetros influyentes en los tres puntos de muestreo a siete parámetros: coliformes, cianobacterias totales, *Microcystis aeruginosa*, Microcistina-LR, temperatura, clorofila y fósforo que representan los factores mas relevantes en el componente principal (PC1) lográndose reducir un 46%. Además, en los tres puntos de muestreo los coliformes fueron factores importantes. Ello significa que pudo reducirse los parámetros que influyen en el desarrollo del fenómeno cianobacteriano.

El comportamiento de las variables estudiadas pudo ser también analizado en función de su variación estacional. Para los diferentes puntos de muestreo los datos fueron agrupados en clusters bien definidos, siendo el estival coincidente con florecimientos.

Estos resultados abren nuevos interrogantes referidos a las consecuencias sanitarias ecológicas y económicas de esta problemática. Resulta necesario establecer programas de vigilancia para evitar la

presencia de Microcistina en el agua potable así como evitar la intoxicación en los usos recreativos. Especial atención debe ser dirigida a disminuir el grado de eutrofización de este recurso hídrico.

## **2. INTRODUCCION**

## **2.1. Cianobacterias**

Desde hace unos 3000 a 3.500 millones de años, las cianobacterias aparecieron en las aguas costeras de los primitivos continentes, y dada su actividad fotosintética con liberación de oxígeno, se las reconoce como las originadoras de la atmósfera oxidante que hoy conocemos.

Poseen características comunes con otras bacterias y también con algas eucariotas, lo que las hace únicas en cuanto a su fisiología, tolerancia a condiciones extremas y flexibilidad adaptativa.

Pueden ser unicelulares o filamentosas, miden desde menos de un micrón hasta varios cm de diámetro. Constituyen una parte muy importante del plancton, tanto marino como de ambientes acuáticos continentales. Incluso aún en los mares templados y tropicales, las cianobacterias unicelulares, picoplanctónicas (minúsculas y muy abundantes) son las principales generadoras de materia orgánica. Desde el Arqueozoico hasta nuestros días, en algunas costas de escasa profundidad, se las puede encontrar asociadas a otros microorganismos. Forman una masa compacta, mucilaginosa, la cual en relación con los sedimentos, crean estructuras sedimentarias compactas de grandes dimensiones, llamadas estromatolitos (fósiles y actuales). Estructuras de ese tipo se conservan en diversas partes del mundo, incluso hoy siguen formándose en algunas zonas de Australia, Bahamas, México y otros sitios (Schopf y col., 1982).

Son los únicos organismos fotoautotróficos que presentan mecanismos y adaptaciones para la fijación de nitrógenos atmosférico.

Han colonizado exitosamente los ecosistemas acuáticos y actualmente se encuentran ampliamente distribuidas en las aguas de todo el mundo. Contribuyen significativamente a la producción primaria acuática, ocupando un papel central en el plancton junto con microalgas eucariotas.

El grupo se reconoce por su habilidad para establecerse en ambientes extremos, habitando sistemas hipersalinos, aguas termales (hasta 80°C) e incluso regiones polares, a varios grados bajo cero. Tienen la habilidad de sobrevivir a largos períodos de desecación y algunas especies producen una vaina pigmentaria externa que les permite sobrevivir en ambientes de alta radiación UV (Graham y col., 2000, Fogg y col., 1973, Komárek y col. 1998).

Bajo determinadas condiciones ambientales, algunas cianobacterias tienen la capacidad de originar “floraciones algales”, proliferaciones masivas protagonizadas por una o pocas especies que dominan el fitoplancton (Oliver y col. 2000).

Sin embargo, las cianobacterias planctónicas, también son un tema de preocupación para calidad del agua y la salud humana, especialmente en los ecosistemas límnicos, ya que pueden crecer masivamente (floraciones) y producir peligrosas toxinas para el ser humano y animal.

Todos estos metabolitos secundarios representan un serio riesgo para el hombre y para la biota asociada a los cuerpos de agua afectados (Carmichael, 2008, Sivonen y col., 1999). Además, el desarrollo masivo de las cianobacterias confiere color, olor, sabor y aspecto alterado al agua, generando limitaciones para la potabilización u otros fines Smith y col., 2008).

Por otro lado, este grupo de microalgas recibe una significativa atención dado sus representantes producen una importante cantidad de compuestos que presentan un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas (Rosales y col., 2008).

## **2.2. Generalidades**

Las Cyanophyta constituyen un amplio grupo de procariotas Gram negativas tradicionalmente señaladas como algas, también denominadas cianobacterias, algas verde-azuladas o cianofíceas. Son procariotas, carecen de membrana nuclear, capaces de realizar fotosíntesis por una vía similar a las algas eucariotas y plantas. Algunas especies también son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico.

El nombre científico de las algas verde-azules es Cianofíceas, Cyanophyta, Cyanoprokaryota o también Cyanobacteria. Por la coloración generada por sus pigmentos, se las llama comúnmente "algas verde-azules", son micro a macroscópicas y por su ausencia de membrana nuclear se las asocia con las bacterias. El fitoplancton se compone de microorganismos fotosintéticos que habitan, suspendidos, todas las aguas del planeta y representan el inicio de la cadena alimentaria. Su denominación proviene del prefijo griego "cyanos" que significa azul, aludiendo al color verde oliva, ligeramente azulado que tienen debido a sus pigmentos fotosintéticos (clorofila-a) y a los pigmentos accesorios (ficoeritrinas y ficocianinas).

Las cianobacterias (o cianofíceas) son organismos microscópicos, unicelulares, algunos forman colonias y alcanzan dimensiones macroscópicas. Algunas, pueden encontrarse como “manchas” adheridas a la superficie de las rocas, suelo o árboles y presentarse en forma de almohadillas macroscópicas o en películas mucilaginosas. Se encuentran, prácticamente en todos los cuerpos de agua y en altas densidades, producen una considerable turbiedad (Graham, 2000).

La mayor parte de las especies de cianobacterias se encuentran en los sistemas de aguas continentales (límnicos), habitando en la columna de agua o el bentos de lagos, lagunas, ríos y arroyos de todo el mundo (Whitton y col. 2000).

Debido a sus características fisiológicas y ecológicas resultan competitivamente superiores a otros organismos del fitoplancton.

Varias especies de este grupo suelen desarrollarse en densas poblaciones debido a su capacidad para crecer y reproducirse bajo distintas condiciones de nutrientes y luz; así como a la regulación de su posición en la columna de agua (vesículas de gas), pudiendo distribuirse en la masa de agua o concentrarse en la superficie (floraciones ó blooms). Por otra parte presentan baja palatabilidad por parte del zooplancton. No presentan significativas exigencias nutricionales. Pueden crecer en medios minerales, cuyas sales nitrogenadas inorgánicas y bicarbonato aprovechan para abastecerse de nitrógeno y carbono. También el dióxido de carbono atmosférico, constituye una excelente fuente de carbono (Hoiczky y col., 2000).

Algunas especies de cianobacterias proliferan en aguas costeras salobres, especialmente bajo condiciones serenas. Un gran número de cianobacterias, fijan nitrógeno atmosférico en ausencia de este elemento o en ambientes con exceso de fósforo. Algunas formas filamentosas presentan células vegetativas modificadas, h) heterocistos, célula de gran importancia por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y a) acinetos, célula de almacenamiento de sustancias de reserva. Ambas células son potencialmente capaces, bajo condiciones ambientales favorables, de germinar y reconstituir un nuevo organismo (Madigan y col., 1999).

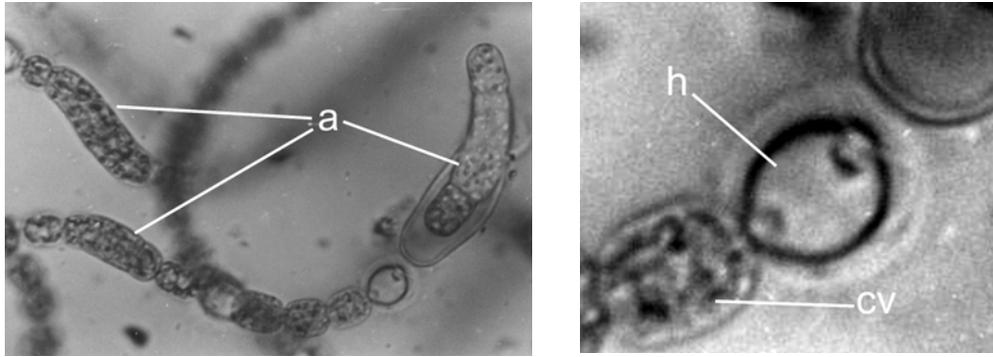


Fig. 1: Células vegetativas modificadas: a ) acinetos y h) heterocistos (Tomada de Echenique y Aguilera 2009).

Las cianobacterias presentan una amplia diversidad morfológica, pueden ser unicelulares aisladas (*Synechocystis*) o agrupadas en colonias (*Microcystis*) o filamentosas, ramificadas (*Scytonema*) o nó (*Anabaena*). Los organismos pueden rodearse de exo-polisacáridos que se aprecian como un mucílago o una vaina firme.

La mayoría de las cianobacterias planctónicas producen vesículas de gas intracelulares, vacuolas gaseosas o aerotopos (<300 nm) que permiten al organismo regular su nivel dentro de la columna de agua en función de ubicarse en los sitios de condiciones óptimas para su desarrollo como ser: el mejoramiento de la exposición a la luz, la reducción de la mortalidad por sedimentación y el acceso temporal a capas profundas con mayor disponibilidad de nutrientes (Oliver & Ganf 2000)

A pesar de esto, la regulación de la capacidad de flote al cambiar la cantidad de gas en las vesículas, es lenta (Bold y col. 1985).

Las células adaptadas a la mezcla turbulenta por medio de vesículas extendidas de gas demorarán unos días en reducir su capacidad de flote a fin de adaptarse a condiciones más calmadas. Cuando el clima cambia de tempestuoso a sereno (es decir, las condiciones mixtas en el agua varían de turbulentas a fuertemente estratificadas), gran cantidad de organismos suelen acumularse en la superficie. Los vientos ligeros las transportan hasta las orillas donde se evidencian produciendo cambios en el color

del agua e incluso forman espumas. En algunos casos, estas aglomeraciones se pueden volver muy densas e incluso adquirir una consistencia gelatinosa, conformada por rayas o finas espumas que lucen como anchas de pintura o gelatina azul verdosas (floración o bloom algal) (Reynolds y col. 1975).

Las cianobacterias tienen clorofila *a*, pigmento universal para realizar la fotosíntesis aeróbica, así como una serie de pigmentos accesorios y protectores. Algunas especies pueden tener también clorofila *b* (grupo antiguamente llamado Proclorofita).

El típico color verde-azul de las cianobacterias se debe a la presencia de las ficobilinas, pigmentos accesorios a la clorofila *a*. La proporción de estos pigmentos puede ser alterada para aumentar la absorción de la luz en el espectro visible.

Asimismo, las cianobacterias poseen carotenoides que se pueden encontrar en las algas eucariotas, pero también poseen otros que son exclusivos de las cianobacterias (carotenoides glicosídicos) (Francis et al. 1970) y cumplen, principalmente, una función de protección para las altas intensidades lumínicas, actuando como antioxidantes al desviar el flujo de electrones en exceso para evitar que dañen los fotosistemas (Edge et al. 1997).

Por otro lado, algunos carotenoides de las cianobacterias pueden cumplir funciones protectoras a bajas temperaturas (Várkonyi et al. 2002) o actuar como pigmentos accesorios de la clorofila *a* (Hischberg & Chamovitz 1994). Se ha demostrado que algunas cianobacterias producen el pigmento scytonemina (solo presente en cianobacterias bentónicas) (García Pichel & Castenholz 1991) u otras sustancias fotoprotectoras de la luz ultravioleta o “pantallas solares”, como los aminoácidos del tipo micospolina (MAA)

En la naturaleza se desarrollan especialmente cuando las condiciones de los ambientes acuáticos se desvían notablemente de lo habitual, siendo de gran importancia los cambios en la relación nitrógeno:fósforo los cuales pueden inducir un avance o retroceso en la población de cianofíceas.

El crecimiento de las cianobacterias frente a la disponibilidad de los nutrientes disueltos se desarrollará mas adelante, sin embargo es un aspecto que aún requiere investigación.

El proceso de eutrofización o enriquecimiento nutricional, también denominado envejecimiento de los reservorios de agua, favorecen el crecimiento abundante de estas algas conduciendo a la formación de floraciones o "blooms".

### **2.3. Eutrofización**

Eutrofización, palabra griega que significa buena alimentación. Provocada por un aporte excesivo de nutrientes en forma de residuos cloacales y desagües de tipo industrial o agrícola, resultante de la actividad de las poblaciones ubicadas cerca las fuentes de aguas. Además, la irracional explotación de embalses con fines recreativos y turísticos, probablemente superior a la capacidad de carga sustentable, resulta otro factor que favorece la contaminación de estas aguas (Margalef, 1991).

El incremento en los nutrimentos, la actividad biológica (productividad) y la acumulación de sedimentos o materia orgánica en las fuentes de agua, se traducen en una alta y fluctuante densidad del fitoplancton y frecuentes cambios en su composición. A nivel cultural (producida por la actividad humana), la eutrofización representa un factor de envejecimiento sobre los cuerpos de agua del mundo y surgen, mayormente, por efecto de las actividades humanas que acelera el proceso de enriquecimiento tanto de las aguas superficiales como subterráneas. Pueden ocasionar problemas estéticos por la presencia de espumas y olores desagradables, que conllevan a la alteración del sabor y olor del agua potabilizada para suministro humano. Otro factor importante es la descomposición de las algas de floraciones algales, las que causan la disminución del oxígeno disuelto en el agua, llegando a la anoxia. Los procesos de descomposición de la materia orgánica provocan problemas colaterales tales como la mortandad de peces y/o la liberación de sustancias tóxicas. Además, los fosfatos del sedimento aceleran el proceso de eutrofización, cerrándose así el ciclo de retroalimentación positivo (Oliver y col, 2000).

El crecimiento de la población mundial a llevado al consecuente desarrollo de desechos orgánicos, tanto cloacales como agrícolas, aunado a esto, el uso indiscriminado de detergentes fosforados no biodegradables y la escasa presencia de plantas de tratamiento de aguas residuales en países en vías de desarrollo, hacen que estos procesos de eutrofización sigan expandiéndose en las aguas continentales. Este fenómeno produce significativos cambios en las comunidades biológicas y de manera particular

en las poblaciones algales. Comúnmente, lo que sucede es un incremento de la frecuencia de aparición de los florecimientos algales, con un predominio de las algas verde-azules (o Cianobacteria) sobre las algas verdes (Chlorophyta), las algas doradas (Chrysophyceae) y las Diatomeas (o Bacillariophyceae) (Abel, 1996). Las posibles causas del predominio de las algas verde-azules son:

Capacidad de formar esporas de resistencia (acinetos) que perduran en condiciones ambientales muy adversas;

la fijación de nitrógeno atmosférico, estrategia que las favorece en ambientes con bajas concentraciones de este elemento;

la acumulación de fósforo, como reserva, en gránulos dentro de la célula (gránulos de polifosfato);

la concentración de dióxido de carbono en orgánulos especiales (los carboxisomas), que permiten la utilización de este gas en el proceso de fotosíntesis aún en condiciones ambientales que otras plantas no pueden;

la posibilidad de usar también bicarbonato como fuente de carbono;

la presencia de unas vacuolas gaseosas o aerotopos, las que les sirven para regular el nivel de flotación, permitiéndoles ubicarse en la zona de intensidad de luz óptima;

la presencia de sustancias mucilaginosas que evitan la desecación y la producción de toxinas que les permitirían eliminar a sus competidores (Alvarez-Cobelas, 1998).

La presencia de cianofíceas en ambientes acuáticos, si se producen floraciones debe ser considerada como un indicio de eutrofización.

Los ambientes acuáticos reciben diferentes denominaciones según la concentración de nutrientes y la producción primaria (densidad y biomasa de algas) que presentan:

- **Oligotrófico:** aguas claras, baja concentración de nutrientes, poco desarrollo planctónico, baja productividad, pocas plantas acuáticas, elevada concentración de oxígeno disuelto.

- **Mesotrófico:** moderado enriquecimiento con nutrientes, moderado crecimiento planctónico, escasa acumulación de sedimentos en la mayor parte del fondo.

- **Eutrófico:** elevado enriquecimiento con nutrientes y crecimiento planctónico, alta productividad en relación a las condiciones naturales, baja transparencia, extensas áreas cubiertas con plantas acuáticas,

gran acumulación de sedimentos en el fondo, bajos niveles de oxígeno disuelto en el fondo, interferencias en los usos múltiples del agua.

- **Hipereutrófico**: cuerpo de agua significativamente afectado por las elevadas concentraciones de materia orgánica y nutrientes, floraciones de algas, mortandad de peces, con limitaciones en sus usos.

Mientras la palabra eutrofización describe el proceso de fertilización del ecosistema acuático, los términos **oligotrófico**, **mesotrófico**, **eutrófico** e **hipertrófico** son utilizados para describir los posibles estados a lo largo del proceso, delineando un gradiente desde aquellos pobres en nutrientes biológicamente disponibles y con escasa biomasa fitoplanctónica o vegetal (oligotrófico), hasta aquellos con alta concentración de nutrientes y elevada biomasa (eutrófico o hipertrófico).

Para describir el **estado trófico** de un ecosistema acuático pueden utilizarse **criterios químicos** (concentración de nutrientes inorgánicos disueltos o totales en el agua), **biológicos** (concentración de clorofila *a*, biomasa de plantas o presencia de especies indicadoras) y/o **físicos** (turbidez del agua). Otros indicadores incluyen la tasa de producción primaria e índices de biodiversidad

**Tabla 1.** Clasificación trófica de lagos, con sus correspondientes concentraciones de fósforo, clorofila y transparencia del agua (Vollenweider y Kerekes., 1982, Wetzel, 2001.)

	Fósforo Total ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )		Clorofila a ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )		Profundidad Secchi (m)	
	Media	Máximo	Media	Máximo	Media	Máximo
Ultra-oligotrófico	<5	<4	<1	<2.5	>12	>6
Oligo – mesotrófico	5-10	4-10	<2.5	<8	>6	>3
Meso –eutrófico	10-30	10-35	2.5-8	8-25	6-3	3-1.5
Eutrófico	30-100	35-100	8-25	27-75	3-1.5	1.5-0.7
Hipereutrófico	>100	>100	>25	>75	1.5	<0.7

#### 2.4. Florecimientos

Las cianobacterias y las algas eucariotas del fitoplancton pueden crecer bruscamente bajo determinadas condiciones ambientales aumentando su biomasa en valores significativos con

respecto a la concentración original. Este fenómeno se llama floración (en inglés: *bloom*) (Smayda 1997).



Fig. 2: Florecimiento en Toma de agua de planta potabilizadora, Punta Lara, Ensenada.

Los factores que desencadenan las floraciones de las cianobacterias planctónicas son diversos y actúan en forma combinada, esto se describirá en detalle en el punto 10 de esta introducción.

Cada floración está formada por una o pocas especies. El fenómeno puede generarse en períodos que van desde pocas horas a varios días y desaparecer en un plazo similar. Sin embargo, algunas floraciones de cianobacterias pueden permanecer por períodos más largos como todo el verano, durante todo el año o incluso en forma permanente. Las floraciones de cianobacterias planctónicas ocurren en los cuerpos de aguas continentales de todo el planeta (Chorus & Bartram 1999). Pueden ser evidentes a simple vista por la coloración generalmente verde y la turbidez que le confieren al agua, o por la presencia de acumulaciones o franjas densas superficiales. Si bien la frecuencia e intensidad de

las floraciones han aumentado en el mundo a consecuencia de las actividades humanas y el cambio climático el fenómeno no es nuevo.

La alta biomasa concentrada en las floraciones sumada a la presencia de las cianotoxinas puede representar un problema para los otros organismos del medio acuático y para el ser humano.

Se considera que existe un florecimiento algal, cuando las concentraciones celulares están en niveles superiores a  $20.000 \text{ células.ml}^{-1}$ , que se correspondería a  $10 \text{ mg.m}^{-3}$  de clorofila a (Oh y col., 2001).

Aproximadamente, el 75 % de las floraciones de Cianobacteria pueden ser tóxicas y a veces puede estar presente más de una toxina (Chorus & Bartram 1999).

Es posible que en una floración se encuentren cepas de cianobacterias tóxicas y no tóxicas al mismo tiempo. No existe un método simple para distinguir las cianobacterias tóxicas de las no tóxicas, factor que aumenta la peligrosidad de las floraciones, haciendo necesario el control de las mismas para evitar situaciones no deseadas (Falconer, 1999). La muerte de las cianobacterias, favorece la liberación de las toxinas, por lisis celular (Shapiro, 1990).

Con relación a la presencia de florecimientos de cianobacterias en fuentes de abastecimiento de agua para consumo humano, se ha informado su presencia en México dentro del lago de Chapala en el estado de Jalisco y en Valle de Bravo en el Estado de México, de esta última se tienen registros de florecimientos desde 1998 y de la presencia de microcistina-LR (toxina producida por especies de *Microcystis*). La presa Valle de Bravo y los diferentes cuerpos de agua que conforman el sistema Cutzamala, proveen cerca del 30% del agua potable a los habitantes (aproximadamente 6.000.000) de la ciudad de México (Ramírez y col., 2001). En estos sitios, durante casi 6 meses al año, se aprecia la presencia de florecimientos de cianobacterias, durante los meses de verano. Se detectó la presencia de microcistina-LR en los meses de junio, septiembre y noviembre de 1999. Las concentraciones más altas se observaron en el mes de junio con valores de  $2551 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peso seco. El valor más bajo se determinó en noviembre, cuando aparentemente el florecimiento estaba desapareciendo, donde el valor máximo fue de  $109 \text{ mg.kg}^{-1}$ , peso seco. En el año 2000, no se registraron florecimientos de cianobacterias, pero en el 2001 las concentraciones de microcistina-LR se incrementaron en los meses de enero a julio y la mayor concentración que se obtuvo fue de  $3761 \mu\text{g}$  de toxina. $\text{g}^{-1}$ . Aunque en

agosto se identificó una disminución en la concentración de microcistina-LR, los niveles observados en julio se alcanzaron en septiembre y octubre, disminuyendo nuevamente en noviembre. Una situación similar podría presentarse en otros cuerpos de agua eutróficos, como es el caso del Lago de Chapala, México (Martínez y col., 2002). Ante las evidencias, surge la necesidad de establecer un programa de vigilancia y monitoreo en los cuerpos de agua, ya que por procesos de eutrofización es posible que se den florecimientos de cianobacterias con niveles de Microcistina-LR mayores al valor recomendado por la OMS para agua potable de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (WHO, 1998).

## **2.5. Cianobacterias y su relación con sabor y olor en agua potable**

La mayoría de los episodios de sabor y olor en agua potable se deben a la generación microbiana de compuestos volátiles, fundamentalmente geosmina y 2-metilisoborneol (2MIB), que tienen olor similar a “tierra mojada” o humedad. Los mismos son producidos por diversos organismos, entre ellos bacterias filamentosas, actinomicetes y cianobacterias.

Los compuestos implicados en problemas de alteraciones del gusto y olor del agua por cianobacterias, tal como el geosmina, en sí mismos no son un riesgo para la salud de seres humanos pero con efectos tóxicos potenciales sobre otras especies (Höckelmann et al. 2009; Mochida 2009).

Las cianobacterias no excretan activamente compuestos tóxicos, sin embargo puede ocurrir que sus toxinas sean liberadas al ambiente acuático por la lisis celular (ruptura celular). Por ejemplo, si a una floración algal se le aplica un algicida, como el sulfato de cobre puede empeorarse la calidad del agua, puesto que se produce la lisis celular y se difunden las toxinas al agua.

A pesar de que el tema ha sido muy estudiado en los últimos años, todavía existen dificultades en la predicción, tratamiento y control de estos compuestos (Jüttner & Watson 2007).

Geosmina y 2MIB son alcoholes terciarios que presentan diversos isómeros con diferente potencia, lo que agrega complejidad a su estudio y al desarrollo de capacidades analíticas. Las cianobacterias son la fuente más frecuente de geosmina y 2MIB en el ambiente (Suikkanen et al. 2005), aunque solo unas 50 especies son productoras significativas de estos y otros compuestos orgánicos volátiles (Jüttner & Watson 2007).

Los umbrales de detección de geosmina y 2MIB en humanos son notablemente bajos (menos de 10 ng.L<sup>-1</sup>) por lo que los seres humanos los podemos percibir muy fácilmente. Se ha propuesto que la detección de sabor y olor podría ser usada como indicador de la presencia de cianotoxinas en agua potable. Sin embargo, no hay evidencia de que exista correlación entre la presencia de toxinas y los compuestos que aportan sabor y olor (Chorus & Bartram 1999). A su vez, la ausencia de sabor y olor no implica en absoluto la presencia o la ausencia de cianobacterias.

## **2.6. Cianotoxinas**

Las cianobacterias producen una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales son tóxicos para animales y el hombre conocidos con el nombre genérico de **cianotoxinas** (Leflaive & Ten-Hage 2007). Estos compuestos pueden afectar la biota acuática y terrestre incluyendo a los seres humanos (Sivonen & Jones 1999). Se dispone de numerosos registros de toxicidad y mortandad de animales como consecuencia de estas toxinas, como por ejemplo aves acuáticas (Alonso-Andicoberry et al. 2002) y ganado vacuno (Thomas et al. 1998; Stewart et al. 2008). Los antecedentes de toxicidad en seres humanos son también abundantes siendo el ejemplo más conocido el trágico caso de un centro de diálisis en Caruaru, Brasil, con más de setenta muertos (Azevedo et al. 2002).

La función que cumplen estas sustancias sigue siendo tema de investigación. Algunos autores han aportado evidencias de que las cianotoxinas están relacionadas con la protección contra los depredadores para evitar la competencia de algas del fitoplancton o plantas (Pflugmacher 2002; Jang et al. 2007). Alternativamente, otros autores proponen que las mismas son metabolitos secundarios sin función específica conocida (Babica et al. 2006). Por otra parte debe mencionarse que las cianobacterias también producen otras moléculas cuyo rol es inhibir alguna función de potenciales competidores (Briand et al. 2004).

La producción de toxinas varía con el ciclo de vida del organismo: poblaciones senescentes (ej.: con 30 días de cultivo) producen entre 8 y 15 veces más toxinas que las poblaciones de un día (Dyble et al. 2006). En muchos casos, condiciones ambientales de estrés pueden estimular su producción (Ross et al. 2006). A su vez, puede suceder que para la misma especie de cianobacteria algunas cepas

produzcan toxinas y otras no (Quesada et al. 2004). Varias cianotoxinas están presentes en el interior de la célula, siendo liberadas al medio en situaciones de lisis o ruptura celular, lo que ocurre en el proceso de senescencia natural o por acción de factores ambientales (Chorus & Bartram 1999). Por ejemplo, las floraciones de cianobacterias pueden tener una duración de pocos días y sobre el final de la floración, cuando las células comienzan a morir, se pueden registrar los máximos de cianotoxinas disueltas en el agua. Por este motivo, los métodos de remoción de cianobacterias que impliquen lisis celular pueden ser contraproducentes ya que favorecen la liberación de las toxinas al medio acuático. Una vez liberadas al ambiente, las cianotoxinas tienen una persistencia variable (pocos días a meses) antes de ser biodegradadas o destruidas mediante fotólisis o biodegradación por bacterias. La destrucción fotoquímica de las microcistinas se acelera por la presencia de pigmentos celulares hidrosolubles (ficobiliproteínas) y de ácidos húmicos, pudiendo alcanzar, en condiciones de alta radiación solar, una destrucción de hasta el 40% en un día (Chorus & Bartram 1999), (Edwards et al. 2008).

## **2.7. Tipos de cianotoxinas, modos de acción y efectos**

Para evaluar el riesgo específico de las toxinas de cianobacterias es necesario comprender sus propiedades químicas y físicas, su ocurrencia en las aguas y los factores que regulan su producción y su desaparición en el ambiente. En términos de estructura química, las cianotoxinas se dividen en: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos. Los mecanismos de toxicidad son muy diversos y varían desde efectos hepatotóxicos, neurotóxicos (**Tabla 2**) y dermatotóxicos hasta la inhibición general de la síntesis proteica (Sivonen & Jones 1999).

Las cianobacterias también producen lipopolisacáridos (LPS), que son componentes de la membrana celular formados por carbohidratos (normalmente hexosas) y lípidos (ácidos grasos). Los LPS son endotoxinas pirogénicas también llamadas dermatoxinas capaces de producir irritaciones en la piel, efectos gastrointestinales y alergias (Kuiper-Goodman et al. 1999; Giannuzzi et al. 2009). Sin embargo, aunque los LPS son ampliamente citados en la literatura como responsables de estos efectos, se reconoce la necesidad de más estudios de investigación para establecer su toxicidad y efectos

biológicos (Stewart et al. 2006). Recientemente, se ha sindicado al aminoácido no proteico  $\beta$ -metil amino alanina (BMAA), producido por gran variedad de cianobacterias, como una nueva cianotoxina neurotóxica (Cox et al. 2005) que podría ser agente causal de algunos trastornos degenerativos en seres humanos incluyendo el síndrome complejo de esclerosis lateral amiotróficademencia parkinsoniana, muy común en poblaciones de Guam (isla del Pacífico occidental).

Tanto en floraciones de cianobacterias de agua dulce como salobre, las cianotoxinas más frecuentes son las microcistinas y las nodularinas.

Las microcistinas (MCs) son una familia de más de 80 heptapéptidos cíclicos, que por su modo de acción (Tabla 2) provocan el colapso de la organización tisular hepática, necrosis y hemorragia intra-hepática (van Apeldoorn et al. 2007). También se ha descrito que la ingestión crónica de pequeñas dosis puede tener efecto promotor de tumores a largo plazo (Svircev et al, 2009). Recientemente se ha informado que el riñón es otro tejido blanco que puede ser atacado por las microcistinas (Humpage 2008; Dias et al. 2009). En el caso de la microcistina LR (MCLR), se ha determinado que concentraciones micromolares (10  $\mu$ M) dañan claramente los procesos celulares básicos en células HaCaT (queratinocitos humanos) y por tanto, esta microcistina es queratinotóxica. Estas toxinas son relativamente estables y resistentes a la hidrólisis y oxidación por lo que pueden perdurar por largos períodos en el cuerpo de agua.

La cylindrospermopsina es un alcaloide inhibidor de la síntesis proteica que produce severas lesiones necróticas en diversos órganos de mamíferos (**Tabla 2**) pudiendo además causar efectos genotóxicos severos (Cox et al. 2005). Esta toxina es muy común en el género *Aphanizomenon* y en *Cylindrospermopsis raciborskii*, de reciente aparición en nuestro país (Vidal & Kruk 2008), aunque no se ha registrado esta toxina en las cepas americanas (Haande et al. 2008). Es estable en el ambiente y pueden ser tolerantes a la biodegradación por bacterias.

Las saxitoxinas son alcaloides de alta toxicidad (**Tabla 2**), que presentan igual estructura química y mecanismo de acción que las provenientes de los dinoflagelados marinos que forman las mareas rojas (Chorus & Bartram 1999). Son compuestos estables que pueden perdurar en el ambiente de dos a tres

meses (Cybis et al. 2006). Las cepas americanas de *Cylindrospermopsis raciborskii* son productoras de saxitoxinas (Castro et al. 2004).

Otras cianotoxinas de la familia de los alcaloides, no tan bien caracterizadas, son las aplisiatoxinas y la lyngbyatoxina-a (encontradas en: *Lyngbya*, *Schizothrix* y *Oscillatoria*) potentes promotores de tumores, activadores de la proteína quinasa C, producidas por cianobacterias bentónicas marinas, en particular *Lyngbya majuscula* (Osborne et al. 2001).

Los seres humanos se exponen a las cianotoxinas por diversas vías. La más relevante es la vía oral, ya sea por ingestión de agua de consumo, alimentos, suplementos dietéticos o por ingestión durante actividades recreativas. Otras vías de exposición pueden ser el contacto directo de partes del cuerpo (ejemplo: en baños de recreación) o por inhalación de agua con toxinas o células de cianobacterias. Debido a su carácter hidrofílico, en general, las cianotoxinas no penetran a través de la piel pero pueden producir irritación de piel y mucosas (Chorus & Bartram 1999). Probablemente muchos casos de enfermedades causadas por las cianotoxinas no son bien documentadas, ya que los pacientes o los médicos no asocian los síntomas con estas sustancias. Algunos de los síntomas más comunes, que pueden deberse a la exposición a una o varias toxinas son muy inespecíficos e incluyen: vómitos, diarreas, irritaciones en la piel y mucosas, dolor abdominal y cefaleas (Chorus & Bartram 1999).

**Tabla 2:** Metabolitos tóxicos que se han identificado hasta la fecha sintetizados por diversos géneros de cianobacteria, junto con sus órgano blanco primarios en seres humanos. Modificado de Chorus and Bartram, 1999.

Grupo de toxinas y toxinas	Principal órgano blanco en mamíferos	Géneros de cianobacteria productoras de toxinas
<b>Péptidos cíclicos</b>		
Microcistinas Heptapéptidos (más de 80 variantes)	Hígado Inhiben las proteína-fosfatasas hepáticas, induciendo la hiperfosforilación de filamentos del citoesqueleto	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> ( <i>Oscillatoria</i> ), <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanocapsa</i>
Nodularina Pentapéptido cíclico	Hígado Similar a Microcistina	<i>Nodularia</i>

(aprox. 8 variantes)		
<b>Alcaloides</b>		
Anatoxina-a  Alcaloides (2 variantes)	Bloquea los receptores nicotínicos y colinérgicos postsinápticos neuromusculares. Mimetizan la acción de la acetilcolina	<i>Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon</i>  <i>Phormidium</i> <i>Raphidiopsis</i>
Anatoxina-a(S) Organofosforado natural	Inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa, mas tóxica que la anatoxina-a	<i>Anabaena</i>
Aplysiatoxins	Piel	<i>Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix (Oscillatoria)</i>
Cylindrospermopsinas Alcaloide guanidínico cíclico (aprox. 3 variantes)	Hígado Inhibe la síntesis proteica. Efecto predominantemente hepatotóxico. Produce severas lesiones necróticas en hígado, riñón, pulmón, bazo e intestino de mamíferos	<i>Cylindrospermopsis,, Aphanizomenon,(Umezakia)</i> <i>Anabaena</i> <i>Raphidiopsis</i> <i>Lyngbya</i>
Lyngbyatoxin-a,	Piel, tracto gastrointestinal	<i>Lyngbya</i>
Saxitoxinas Alcaloides carbamatos no sulfatados (saxitoxinas), monosulfatados (goniautoxinas) o disulfatados (Ctoxinas) (aprox. 20 variantes)	Inhibe la transmisión nerviosa a través del bloqueo de los canales de sodio en las células induciendo parálisis muscular	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i> <i>Raphidiopsis</i>

De todas las toxinas producidas por las cianobacterias toxigenas, las microcistinas son las de mayor relevancia en nuestro medio debido a que sido detectada en aguas recreacionales del Río de la Plata en diferentes oportunidades (Echenique 2008). Por esa razón se describe las microcistinas en detalle en el punto siguiente.

## 2. 8. Microcistinas

Todas las variantes estructurales de microcistinas tóxicas, contienen un único aminoácido hidrofóbico, el ácido 3-amino, 9-metoxi,10-fenil,2,6,3-trimetil-deca-4(E),6(E)-dienoico (ADDA). El compuesto prototipo es la microcistina-LR, que tiene leucina y arginina en las dos posiciones hipervariables de la estructura en anillo.

Estas toxinas, son producidas por una amplia variedad de cianobacterias platónicas incluyendo *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. ichthyoblabe*, *M. botrys*, *Planktothrix argardhii*, *P. rubescens*, *P. Mougeotii*, *Anabaena flos-aquae*, *A. Circinalis*, *A. Lemmermannii*, *Nostoc sp.* y *Snowella lacustris*. Las especies mas frecuentemente citadas como productoras de toxinas son *M. aeruginosa* y especies de *Planktothix*. La producción de microcistinas, ha sido ligada también a algunas especies bénticas: *Haphalosiphon hibernicus* y *Oscillatoria limnosa*.

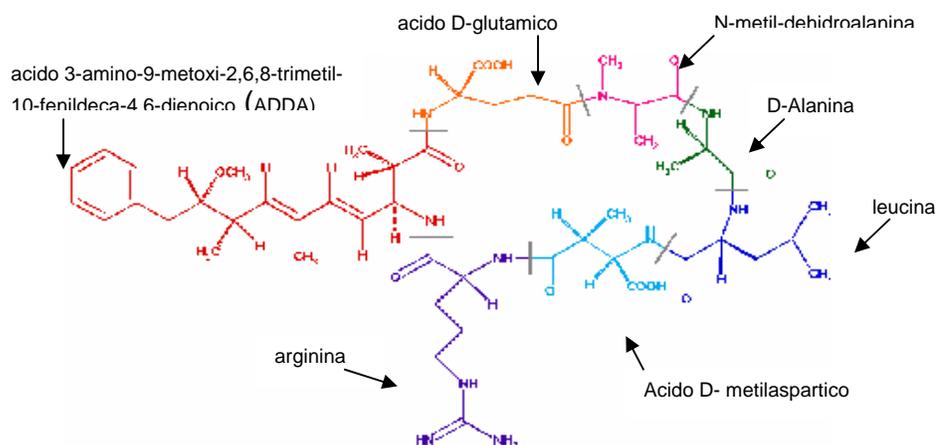


Fig.3: Molécula de Microcistina-LR

La intoxicación aguda con MCs se caracteriza por un importante daño al hígado, debido a las alteraciones del citoesqueleto, apoptosis y amplias necrosis de hepatocitos causadas por la toxina, que derivan en hemorragias intrahepáticas seguida de muerte debida a congestión hepática y shock hipovolémico. La hepatitis tóxica aguda asociada con los fenómenos de floraciones cianobacterianas

es ahora reconocida como una Toxicosis Cianobacteriana a raíz de la intoxicación de mas 150 personas y la muerte de 56 de ellas registrada en Caruarú, Brasil, en 1996.

Sin embargo, debemos tener en cuenta de manera especial la exposición de tipo crónico, la cual hasta el momento no ha sido suficientemente estudiada.

Esto resulta particularmente importante debido a que la intoxicación crónica sería la forma más probable de exposición para la población, teniendo en cuenta las situaciones antes expuestas en las cuales se produce el contacto población-toxina. La exposición crónica se caracteriza por una amplia gama de daños hepáticos, entre los que destacan, vacuolización citosólica, necrosis celular puntual y promoción de tumores.

Las microcistinas son reconocidas como sustrato por proteínas transportadoras de aniones orgánicos y por proteínas transportadoras de ácidos biliares. En consecuencia, son absorbidas eficientemente en el intestino y ejercen un organotropismo predominantemente hepático aunque también se han informado efectos tóxicos en intestino y riñón. El estudio de la distribución en los tejidos, usando toxinas radio-marcadas, ha confirmado al hígado como principal sitio de la acumulación de toxinas y que el nivel de toxinas en este órgano permanece constante por mas de 6 días postratamiento. Los ácidos biliares, y los compuestos que bloquean la entrada de ácidos biliares, inhiben el ingreso y toxicidad de la microcistina en el hígado. Ha sido demostrada la formación de metabolitos de glutation de MC-LR y MC-RR. La toxina es liberada nuevamente al torrente sanguíneo unida covalentemente a cisteína y así es eliminada en la orina. Una pequeña proporción es eliminada vía heces.

El efecto primario agudo de la inhibición de la proteína fosfatasa es la hiperfosforilación de muchas proteínas celulares incluyendo el citoesqueleto hepatocelular, lo que causa pérdida de contacto célula-célula y hemorragia intrahepática. La muerte se debe al un shock hipovolémico. Otros efectos incluyen alteraciones de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, generación de especies reactivas al oxígeno (ROS), inducción de la apoptosis, probablemente debida a una perdida del control de la fosforilación regulatoria y desarrollo de neoplasias.

En base a estudios con animales, se determinó el Nivel de Efectos Adversos No Observables (NOAEL según sus siglas en inglés) de  $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Para determinar la IDT (Ingesta Diaria Tolerable) al NOAEL

se le aplica un factor de seguridad (FS) de 1000. Considerando que la ingesta de estas toxinas por consumo de agua sería el 80 % del total se aplica un factor P de 0.8 y se estima un peso promedio de 60 kg y un consumo promedio de 2 litros.día<sup>-1</sup> de agua por persona. La ecuación que utilizó la OMS para determinar la concentración de microcistinas recomendada en agua potable es:

$$\text{IDT vía agua potable} = (\text{NOAEL} * \text{P} * \text{peso corporal}) / \text{FS} * \text{L}$$

La IDT así calculada es 0.96 µg.L<sup>-1</sup> que se redondea en el Valor Guía de 1 µg.L<sup>-1</sup> de microcistina-LR o su equivalente en otras variantes. Sin duda que más estudios son necesarios para confirmar los niveles propuestos por la OMS de hecho varios países proponen en su legislación valores de 0.5 µg.L<sup>-1</sup>. Además de dilucidar su posible acción cancerígena, que de confirmarse significaría entre otras cosas que no hay posible Valor Guía y que las Microcistinas deberían estar completamente ausentes en el agua potable.

Las neurotoxinas menos frecuentes en ecosistemas acuáticos, no presentan el mismo riesgo a la exposición crónica que las microcistinas. Las neurotoxinas tales como las anatoxina-a, anatoxina-a(s) y saxitoxinas son altamente tóxicas. Afectan al sistema nervioso interrumpiendo las transmisiones eléctricas vitales del nervio y la función cerebral, mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa. Pueden producir parálisis cardíaco-respiratoria cuando se concentran y tienen un corto tiempo medio de vida. La anatoxina-a(s) es el único organofosfato natural que se conoce, produce salivación excesiva, calambres, temblores, diarrea, vómitos y una muerte sumamente rápida. En algunas floraciones alcanzan niveles neurotóxicos agudos para un ser humano que tan sólo ingiere un sorbo. Sin embargo, existe creciente evidencia de que su presencia en lagos y ríos, en general, no es tan frecuente como el caso de las microcistinas. Luego de ingerir una dosis subletal de estas neurotoxinas, la recuperación es total y hasta la fecha, no se ha observado ningún efecto crónico (Carrasco y col., 2006). Por lo tanto, en base a la evidencia se consideran menos peligrosas que las microcistinas o la cylindrospermopsina, las que pueden provocar un daño permanente. Exposiciones a dosis agudas de neurotoxinas, causan la

muerte en pocos minutos u horas, dependiendo de la especie, cantidad de toxina ingerida y la cantidad de alimento en el estómago.

## **2. 9. Intoxicaciones con cianotoxinas**

### **2.9.1. Intoxicación en una unidad de hemodiálisis en Carurú, Brasil**

En 1996 ocurrió la tragedia en un centro de diálisis brasileño donde murieron más de 50 pacientes a causa de agua contaminada con cianotoxinas. Básicamente, este centro era el más grande de dos clínicas de diálisis en la Ciudad de Carurú, capital del estado brasileño de (Pernambuco, Brasil), el cual se abastecía de agua desde un embalse situado a 40km de distancia. Después del tratamiento de diálisis practicado a pacientes del principal centro la mayoría de ellos experimentaron signos y síntomas de neurotoxicidad y hepatotoxicidad aguda (Carmichael, 1996). Las muertes alcanzaron a un total de 52. Los estudios llevados a cabo por las Autoridades Médicas en Pernambuco y del Centro para el Control de Enfermedad en Atlanta, Georgia, permitieron describir los patrones de la enfermedad, como “**Síndrome de Carurú**” (Carmichael y col., 2001; Jochimsen y col., 1998).

La falla característica del hígado indicaba que los pacientes habían sido expuestos a una hepatotoxina durante la diálisis. La semejanza de los síntomas y la patología de las víctimas condujeron a la conclusión, que el principal factor que contribuyó con la muerte de los pacientes fue debido a la exposición intravenosa de microcistinas, específicamente la microcistina-LR y -AR, grupo de toxinas producidas por especies del género *Microcystis* sp., ya que, la exposición por vía oral no da lugar a respuestas agudas (Pouria y col., 1998).

A pesar, de no haber realizado un conteo de algas a la hora del incidente, bajos números de *Microcystis* sp. y *Cylindrospermopsis* sp. estaban presentes a la hora de la investigación. También, en el estudio se pone en evidencia la presencia de microcistinas en el agua del depósito, el vehículo de entrega, el tanque de almacenaje de agua, en el equipo de tratamiento de la centro y en muestras de hígado de pacientes fallecidos a concentraciones de microcistinas  $0.18 \text{ g.Kg}^{-1}$  de hígado, con volúmenes de exposición que llegaban a  $19.5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de Microcistinas de agua usada para tratamientos de diálisis (hasta 150 litros de agua se utilizan para el tratamiento de diálisis y el mismo se puede dar

hasta 3 veces por semana) (Carmichael, 1996). Ésta concentración resulta 19.5 veces mayor que el nivel sugerido por la Organización Mundial de la Salud, como agua potable segura ( $1\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

El tratamiento de hemodiálisis representa una ruta de exposición de riesgo elevado, debido que las cianotoxinas, al entrar directamente al sistema circulatorio, pueden conducir a síndromes clínicos fatales. Éste incidente, fue el primer reporte de exposición a toxinas cianobacteriales en seres humanos y representa el número más grande de muertes documentadas del envenenamiento por cianotoxinas.

### **2.9.2. Sintomatología del Síndrome Caruaru**

El síndrome de Carurú se caracteriza por la hepatomegalía, ictericia y diátesis de la sangre, que es manifestada por la equimosis, la epistaxis y hemorragia; elevados niveles de transaminasas, hiperbilirrubinemia variable, prolongados tiempos de la protrombina e hipertrigliceridemia severa. Asimismo, se expresa en la modificación de las células del hígado, necrosis, apoptosis, colestasis, vacuolización citoplásmica, hepatocitos multinucleados y edema intracelular, cambios a nivel mitocondrial, lesiones ásperas y lisas del retículo endoplasmático que se observan con microscopia electrónica (Konst y col., 1965).

### **2.9.3. Otras intoxicaciones agudas informadas en seres humanos**

En 1931 un florecimiento masivo en EEUU de *Microcystis* sp, en los ríos Ohio y Potomac afectó a unas 8.000 personas que consumían agua potable procedente de estos ríos, ya que el tratamiento de potabilización (precipitación, filtración y cloración) no resultó suficiente para remover las cianotoxinas. Por otro lado, numerosos casos de afecciones gastrointestinales fueron informados, luego de la exposición masiva a toxinas de cianobacterias (Schwimmer y col., 1968). En Washington DC, un florecimiento de cianobacterias en un reservorio utilizado como fuente de abastecimiento de agua potable, produjo el ataque endotóxico de 23 pacientes de diálisis. Carmichael (1994) estudio casos de náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, infecciones al ojo, oído y garganta por exposición masiva de cianotoxinas, también en los EEUU.

En Palm Island (Australia) debido al tratamiento con sulfato de cobre de un embalse empleado como fuente de abastecimiento de agua potable, que presentaba un florecimiento de *Cylindrospermopsis raciborskii*, se produjo la liberación de toxinas al agua, afectando gravemente la salud (incluida hospitalización) a 141 personas que se abastecían de este cuerpo de agua (Bourke y col, 1968). Otro caso aconteció en la ciudad de Armidale, en donde los niveles de enzimas hepáticas eran elevadas en la sangre de la población que se abastecía de agua desde un ambiente donde se encontraba un desarrollo masivo de *Microcystis* sp.

En China la incidencia de cáncer de hígado, fue claramente relacionada con fuentes de agua, siendo considerablemente mayor en poblaciones que usaban fuente de aguas superficiales afectadas con floraciones de cianobacterias, que aquellas que utilizaban, para su abastecimiento, aguas subterráneas (Ueno y col., 1996).

Cerca de Malmö en Suecia, el uso ilegal de aguas no tratadas de un río próximo a una fábrica azucarera, ocasionó la alteración en el suministro de agua potable durante algunas horas. El agua del río estaba densamente poblada con *Planktothrix agardhii*. Las muestras tomadas poco antes y después del incidente mostraron que estas cianobacterias contenían microcistinas. De los 304 habitantes del pueblo, 121 personas (así como algunos perros y gatos) experimentaron vómitos, diarrea, calambres musculares y náuseas (Cronberg y col., 1997).

En el presente trabajo de tesis se focalizarán los estudios a las cianobacterias y cianotoxinas como es *Microcystis* sp y a microcistina, debido a que resultan de interés toxicológico en aguas en nuestro medio (Río de la Plata) siendo detectadas por primera vez por el grupo de investigación que desarrolla la presente tesis en el año 2004.

## **2.10. Factores que regulan el crecimiento de cianobacterias y la formación de cianotoxinas**

La dinámica poblacional de las cianobacterias está influenciada por factores físicos, químicos y biológicos del agua (Watanabe y col., 1995). Resultado de la óptima conjunción de estos factores, suelen ocurrir desarrollos masivos de especies de cianobacterias, los que en ocasiones suelen estar asociados a la presencia de cianotoxinas (hepatotoxinas y/o neurotoxinas) (Sivonen, 1996).

### 2.10.1. Disponibilidad de luz

En algunas situaciones, las cianobacterias tienen la facultad de dominar el fitoplancton gracias a su capacidad para explotar intensidades de luz muy bajas o altas, optimizar la fotosíntesis mediante la flotación en la columna de agua, soportar amplios rangos de temperatura, crecer en ambientes crónicamente deficientes en nutrientes y resistir la depredación debido a su capacidad de sintetizar toxinas y a su plasticidad morfológica (Fig. 4). Esta flexibilidad fisiológica y morfológica generalmente incide en la modificación de su ambiente y en el establecimiento de las poblaciones. A continuación evaluaremos las principales características fisiológicas y ecológicas que facilitan la dominancia de las cianobacterias en los ecosistemas acuáticos.

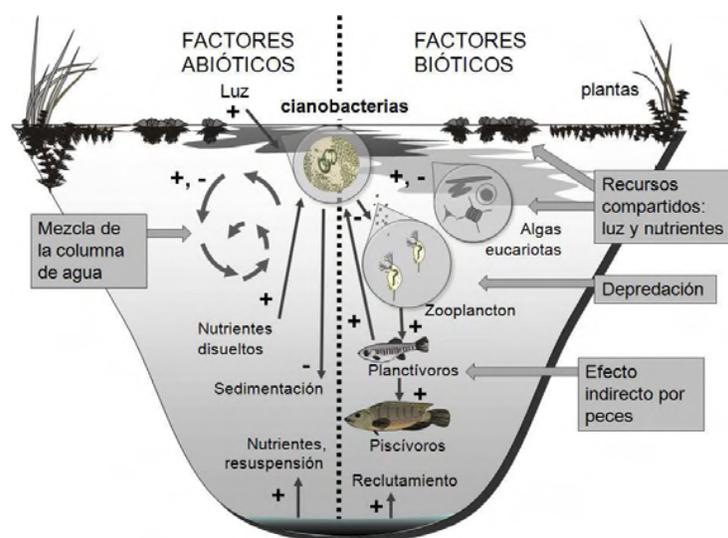


Fig 4. Efecto de los factores abióticos y bióticos, simplificados como positivos (+) y negativos (-), en el crecimiento de las cianobacterias planctónicas de los ecosistemas limnéticos (Aubriot, 2009).

La intensidad de la luz resulta un factor importante en la dinámica de *Microcystis aeruginosa*.

La toxicidad de esta especie se incrementa, con un leve incremento de la intensidad de la luz, en 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ , por lo tanto, la toxicidad decrece cuanto más profunda se encuentre la

cianobacteria en la columna de agua. Cada especie en particular, presenta condiciones de luz óptimas para el crecimiento (Utkilen, y col., 1992).

En respuesta a esto, muchas especies de cianobacterias regulan la flotabilidad, para adaptarse a las condiciones de luz más adecuadas. La flotabilidad es controlada principalmente por la producción de carbohidratos a partir de la fotosíntesis. Este mecanismo de control deja de funcionar cuando la concentración de dióxido de carbono es muy baja. A pesar que la flotabilidad no puede ser controlada por la noche, estos organismos flotan en la superficie debido a su reducido contenido en carbohidratos como resultado de la respiración nocturna (De León, 2002).

### **2.10.2. Zona de mezcla**

La luz que recibe el fitoplancton (microalgas y cianobacterias) en un cuerpo de agua depende de la profundidad de la zona iluminada, pero también de la profundidad hasta donde se produce la mezcla hidrológica de la columna de agua (Fig. 5).

### **2.10.3. Zona eufótica y zona de mezcla en la columna de agua**

La capa superior iluminada de la columna de agua se conoce como **zona eufótica** y su límite ( $Z_{eu}$ ) está definido como la profundidad a la que llega el 1% de la luz subsuperficial (Kirk 1994). El 1% de la luz subsuperficial es un valor convencional y de referencia, en el cual se espera que la producción primaria neta sea igual a cero (**punto de compensación**).

La profundidad de la **zona de mezcla** ( $Z_m$ ) es la capa de agua por arriba de la termoclina que puede ser mezclada por la acción del viento. En los lagos que no están estratificados, la zona de mezcla abarca toda la columna de agua ( $Z_m = Z$ ).

La relación entre la zona eufótica ( $Z_{eu}$ ) y la zona de mezcla de la columna de agua ( $Z_m$ ) es un indicador del régimen de luz experimentado por los organismos sometidos al movimiento del agua.

Basándose en el cociente  $Z_{eu}/Z_m$ , es posible separar ambientes en los que  $Z_{eu} \approx Z_m$  y aquellos con  $Z_{eu} > Z_m$  o  $Z_{eu} < Z_m$ . En el primer caso, si bien la luz no alcanza toda la columna de agua, no llega a limitar significativamente el crecimiento (diagrama 1). Este es el caso de lagos someros productivos,

frecuentemente mezclados, en los que generalmente dominan organismos filamentosos no agregados como *Planktothrix agardhii*.

En el caso que ocurran estratificaciones por períodos más prolongados, lo que coincide con una mayor profundidad de los sistemas, pueden verse favorecidas las formas coloniales mucilaginosas de gran tamaño (ej. *Microcystis aeruginosa*).

En lagos más profundos y menos productivos, la luz alcanza toda la zona de mezcla y suele ocurrir una fuerte estratificación estacional. En estos lagos pueden desarrollarse poblaciones de cianobacterias metalimnéticas (concentradas en un rango estrecho de profundidad sobre la termoclina) como los géneros *Planktothrix*, *Anabaena* o *Aphanizomenon* (Oliver & Ganf 2000)

Si el cociente  $Z_{eu}/Z_m$  es  $\geq 1$  (Fig. 5 diagrama 1 y 2), los organismos estarán circulando en la zona iluminada del lago, mientras que los valores menores a 1 son indicadores de condiciones de luz potencialmente limitantes para el crecimiento (Fig. 5 diagrama 3) (Kirk 1994).

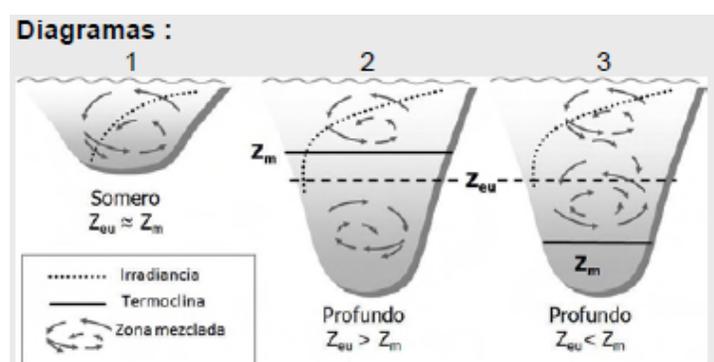


Fig. 5. Zona eufótica y zona de mezcla en la columna de agua

Como la intensidad de la luz disminuye exponencialmente en la columna de agua y su calidad espectral cambia, las cianobacterias pueden utilizar parte de esta energía lumínica en rangos del espectro que no son utilizados por otros grupos (Jeffrey et al. 1997).

En el otro extremo, algunas cianobacterias (ej: *Microcystis* sp.) pueden tolerar la radiación solar prácticamente directa y crecen y se acumulan próximas a la superficie del agua

Esta tolerancia se basa en su capacidad de alcanzar la saturación de la fotosíntesis a valores de irradiancia altos ( $I > 200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y a la síntesis de sustancias fotoprotectoras como los aminoácidos del tipo micosporina (MAA) y los carotenoides que desvían el exceso de energía (Sommaruga et al. 2008).

Las plantas sumergidas pueden ser los productores primarios dominantes en sistemas eutróficos someros en determinadas condiciones en donde el cuerpo de agua se mantendrá transparente y con escaso fitoplancton y cianobacterias (Scheffer 2007). Por otro lado, las plantas flotantes pueden colonizar exitosamente ambientes eutróficos en algunas condiciones particulares, cubriendo parcial o totalmente la superficie del cuerpo de agua provocando el sombreamiento sobre las cianobacterias y microalgas del fitoplancton (Fig. 4).

El desarrollo de estas macrófitas ocurre mayormente en ecosistemas tropicales y subtropicales de aguas con escasa turbulencia (Moss 1998; Meerhoff et al. 2007a). Además, estas plantas pueden producir sustancias alelopáticas que inhiban el desarrollo del fitoplancton. En estos casos, puede existir una fuerte limitación lumínica que impida el desarrollo de las cianobacterias.

#### **2.10.4. Temperatura**

El rango de temperatura a la que generalmente se produce la tasa máxima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30°C, según resultados experimentales con cultivos de cianobacterias (Reynolds 2006). Entre el 0°C y el valor óptimo para cada organismo, se produce un incremento de la tasa de crecimiento en función de la temperatura. Por encima del rango de temperatura óptima ocurre una disminución abrupta de la tasa de crecimiento. Generalmente se considera que las cianobacterias prefieren temperaturas más altas que las algas eucariotas (Dokulil & Teubner 2000). Sin embargo, los rangos óptimos de temperatura de las cianobacterias no termofílicas serían similares a los rangos de las algas eucariotas, por lo que no habría diferencias en cuanto a la preferencia de la temperatura.

Por otro lado, las cianobacterias son dominantes en numerosos ecosistemas acuáticos polares, tanto en el bentos formando gruesas matas, como en el fitoplancton, debido a su tolerancia a un amplio rango de temperatura (Vincent 2000).

La alta temperatura, además, no sería la causa *per se* de una floración, sino que las altas temperaturas estarían asociadas con otros fenómenos como la estratificación térmica y cambios en la profundidad de la zona de mezcla, lo que puede favorecer el desarrollo de cianobacterias con vesículas de gas (Oliver & Ganf 2000; Paerl & Huisman 2009). Estos efectos se podrían ver potenciados en el contexto del cambio climático global.

El aumento de la temperatura y los cambios en los patrones de precipitación pueden tener efectos sinérgicos significativos sobre los procesos de eutrofización en los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, las evidencias no son definitivas, y mientras algunos estudios informan un posible aumento de la biomasa algal como consecuencia del aumento de la temperatura, otros datos apoyan la posibilidad de que las plantas acuáticas sean favorecidas bajo este escenario.

Estudios en campo en períodos prolongados de tiempo indican que algunas cianobacterias podrían ser beneficiadas por el aumento de la temperatura (Regnols, 2006), si bien esto sigue siendo controversial. Otra evidencia indica que, en zonas templadas, el aumento estival de la estabilidad de la columna de agua por el incremento de la temperatura también resultaría en un factor de fomento de la dominancia de cianobacterias.

Según Parra y col. (1986), la temperatura óptima para la producción de toxinas se encuentra entre los 20 y 25°C, lo que indicaría que las cianobacterias serían más tóxicas durante períodos de temperaturas cálidas y en áreas tropicales.

#### **2.10.5. Disponibilidad de nutrientes.**

El protoplasma celular de las algas eucariotas y las cianobacterias, requiere de aproximadamente 20 elementos químicos para la formación de la nueva biomasa, algunos de ellos necesarios en grandes cantidades (H, C, O y N) y otros en cantidades pequeñas (P, S, K, Na, Ca, Mg y Cl). Un conjunto de nutrientes que intervienen en el metabolismo (como por ejemplo la estructura de enzimas) son requeridos en concentraciones traza (Si, Fe, Mn, Mo, Cu, Co, Zn, etc.). Los elementos que generalmente limitan el crecimiento del fitoplancton pueden ser N, P, Fe, (Si, en el caso de las diatomeas) o algún micronutriente.

Los distintos factores ambientales intervienen continuamente en el desarrollo de un ecosistema, tanto sea en las poblaciones, el número de individuos como también a nivel celular, en donde ocurre una dependencia cualitativa y/o cuantitativa de la ultraestructura de las cianobacterias.

El metabolismo de las microalgas lleva en determinados casos de disponibilidad de nutrientes, a que se observen inclusiones intracelulares de gránulos de polifosfato (depósitos intercelulares de fósforo), gránulos de glicógeno, glóbulos de lípidos, carboxisomas y gránulos de cianoficinas.

El carbono no es el factor limitante para el fitoplancton debido a los aportes de  $\text{CO}_2$  atmosféricos y del sedimento aportado por la mayoría de las microalgas que poseen sistemas de transporte activo. Sin embargo, las altas tasas fotosintéticas pueden disminuir la concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto con lo que el pH aumenta debido a que disminuye el ácido carbónico disuelto. Este aumento de pH genera bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) constituya la forma más abundante de carbono inorgánico. En estos casos puede ocurrir la limitación del crecimiento de las cianobacterias que solo puedan asimilar  $\text{CO}_2$  y no otra forma de carbono. Sin embargo, muchas de las cianobacterias y algunas algas eucariotas contienen la enzima anhidrasa carbónica y pueden recurrir al  $\text{HCO}_3^-$  como fuente alterativa de carbono inorgánico (Graham y col., 2009). Es así que pueden competir muy bien en lagos eutrofizados donde el pH alto es característico.

Otros factores que contribuyen a un incremento del pH pueden estar dados por las características naturales del sistema (aguas duras) o por los efectos del crecimiento de la comunidad fitoplanctónica. En este sentido, la incorporación de  $\text{CO}_2$  disuelto en el agua mediante la fotosíntesis por fijación en los carboxisomas y a través de la enzima RuBisCo, determina un cambio en la concentración de iones debido a la disminución del carbono disponible.

**RuBisCo** es la forma abreviada con que normalmente se designa a la enzima cuyo nombre completo es **ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa**. Esta enzima tiene un doble comportamiento que justifica su nombre, catalizando dos procesos opuestos. Primero la fijación del  $\text{CO}_2$  a una forma orgánica, lo que justifica su clasificación como carboxilasa. Segundo, la fotorespiración, en la que actúa como oxigenasa del mismo sustrato. La RuBisCO es la proteína más abundante en la biosfera.

Las cianobacterias fueron las especies dominantes sobre otras especies al reducir las concentraciones de  $\text{CO}_2$  a niveles por debajo de lo que podían utilizar los otros organismos (Hyenstrand y col. 1998).

El nitrógeno es un elemento esencial en la composición de aminoácidos, de bases nitrogenadas y de las reservas celulares que se restringen a proteínas ricas en nitrógeno. También es necesario para la síntesis de las vesículas de gas, lo que no es una dificultad para las especies de cianobacterias que pueden fijar  $\text{N}_2$  atmosférico. El nitrógeno puede ser obtenido del agua a través de la incorporación activa como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  (o nitrógeno inorgánico disuelto, NID). Dependiendo de la fuente de N, la fijación o asimilación puede requerir de varias etapas para reducirlo y es por ello que el  $\text{NH}_4^+$  es la fuente de nitrógeno energéticamente menos costosa de metabolizar. El nitrógeno puede escapar del ecosistema hacia la atmósfera como gas (óxido nitroso  $\text{N}_2\text{O}$  o  $\text{N}_2$ ), resultado de la desnitrificación bacteriana producida en ambientes con zonas anóxicas. Como consecuencia el nitrógeno puede ser un limitante del crecimiento fitoplanctónico (Arrigo, 2005). Además, las cianobacterias tienen un rol crucial como componentes significativos en el ciclo del nitrógeno y productos primarios en muchas áreas de los océanos.

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico es generalmente considerada como una ventaja de las cianobacterias que utilizan esta fuente por sobre las algas eucariotas para crecer en ambientes pobres en nitrógeno. Para la fijación de  $\text{N}_2$  se requiere del complejo enzimático nitrogenasa que reduce a  $\text{NH}_4^+$  con la incorporación de un grupo amino a la glutamina, y esta localizado en los heterocitos aunque hay algunas especies filamentosas no heterocíticas que también tienen la enzima y podrían fijar  $\text{N}_2$ .

Debido a que la enzima nitrogenasa es rica en Fe (Karl, 2002), la fijación de nitrógeno estaría asociada a la disponibilidad de este micronutriente. Por lo tanto, este proceso implica un alto costo energético y la posibilidad de una co-limitación por Fe y fósforo.

Basándose en el desarrollo de experimentos, (Blomqvist 1994) se ha propuesto la hipótesis que la fuente de nitrógeno puede explicar la dominancia de las cianobacterias. De este modo las cianobacterias no fijadoras son favorecidas por el  $\text{NH}_4^+$  como es para el caso de *Oscillatoria*

(*Planktothrix*), en cambio cuando la fuente de nitrógeno es  $\text{NO}_3^-$  ocurre el desarrollo de fitoplancton eucariótico. Finalmente cuando hay escasez de nitrógeno predomina el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

**El fósforo** es un componente esencial del metabolismo celular que forma enlaces de alta energía, se libera en reacciones enzimáticas y es un elemento en la estructura de moléculas de ácidos nucleicos y las membranas celulares. Las cianobacterias poseen una gran capacidad de almacenamiento de fósforo, elemento limitante de la producción en sistemas acuáticos continentales. En algunos casos el fósforo almacenado les permite llevar a cabo de 2 a 4 divisiones celulares (Long 2001), es por ello que resultan ser enormemente competitivos en estos ambientes.

Los altos requerimientos de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) del fitoplancton, combinado con un suministro ambiental restringido en relación a los otros nutrientes, determina que el fósforo sea el principal elemento limitante del crecimiento fitoplanctónico en ambientes límnicos. El fosfato disponible es rápidamente incorporado y utilizado por los organismos. Como resultado, la concentración de fosfato ambiental decrece hasta un nivel estacionario, llamado valor umbral.

La incorporación del fosfato a las células y el crecimiento poblacional posterior es posible solo si la concentración ambiental de fosfato excede este valor umbral, el cual se encuentra usualmente en rangos nanomolares, debajo de los límites de detección de los métodos analíticos convencionales.

Cuando el fosfato se incorpora de forma activa, es almacenado mediante su agregación en gránulos de polifosfato. En los períodos de ausencia de fuentes del nutriente, los gránulos formados son la fuente de fósforo intracelular para el crecimiento celular. Al igual que las cianobacterias, las algas eucarióticas tienen la capacidad de acumular polifosfato con rangos parecidos de velocidad de incorporación. Esta capacidad permite que las poblaciones puedan crecer a expensas de bajos o esporádicos aportes del nutriente (Aubriot 2008).

Se ha establecido que además de las cantidades de nitrógeno y fósforo presentes en el ambiente, Existen distintas consideraciones referidas a la relación Nitrógeno/Fósforo (N/P) dependiendo del autor.

Relaciones bajas con  $N/P < 10$  indican limitación potencial por nitrógeno, mientras que las relaciones altas de  $N/P > 20$  indican limitación potencial por fósforo.

Para Mc Queen y Lean (1987) la relación es de 5/1 de N/P por debajo de ella no es probable el desarrollo de floraciones masivos de cianobacterias.

Otro posible cociente es de 10-16/1 de N/P que en relación a las algas eucarióticas de 16-23/1 N/P, muestra que para las primeras las condiciones respecto de los nutrientes son menos exigentes y por ende más favorables (Scheurs 1992).

Según Redfield (1998), existe una proporción dada por la relación de elementos mayoritarios, carbono, nitrógeno, fósforo que cuando los nutrientes no son limitantes, la relación molar de los elementos C/N/P en la mayoría de fitoplancton es 106/16/1.

Por lo tanto, cuando el suministro de nutrientes desde el ambiente se desvía de esta proporción se produce la deficiencia y posterior limitación del crecimiento celular.

También se ha informado que el crecimiento *Microcystis aeruginosa* y la producción de Microcistina se incrementa con el aumento de la concentraciones de nitrato y fosfato, especialmente cuando la relación de N/P esta en el rango entre 16 a 64 (Vezie, 2002). Una excelente revisión respecto de los factores que regulan el crecimiento de las cianobacterias puede encontrarse en la recopilación realizada por colegas uruguayos que sufren igualmente este problema (Aubriot y col. 2009).

Un parámetro interesante a la hora de valorar riesgos de proliferaciones tóxicas es la concentración de **hierro** en el fitoplancton (Forsgren y col., 1992). En muchos medios naturales, el crecimiento del fitoplancton está limitado por la disponibilidad de hierro y organismos que han desarrollado mecanismos eficaces para competir en la adquisición de hierro, que presentan ventajas competitivas. En el tratamiento de aguas es muy frecuente la utilización de cloruro férrico para eliminar sólidos coloides. El aporte de esta sal puede eliminar las limitaciones de crecimiento del fitoplancton y provocar proliferaciones incontroladas o florecimiento algales. Así mismo, las aguas residuales domésticas y las procedentes de industrias, pueden aportar abundantes nutrientes, entre ellos el hierro que normalmente estaría limitando. Las repercusiones de estas floraciones de fitoplancton debido al

aporte de hierro son innumerables, fundamentalmente por los aspectos económicos y sociales, ya que algunas de estas cianobacterias pueden producir ciantoxinas. Las cianobacterias han desarrollado mecanismos de incorporación de hierro muy eficaces y son normalmente mayoritarias en este tipo de proliferaciones. Las cianobacterias y muchas bacterias heterótrofas sintetizan unas moléculas llamadas sideróforos que actúan como quelantes extracelulares para incorporar hierro (Hallegraeff, 1992).

Entre las medidas preventivas a realizar tras la depuración con cloruro férrico, su valoración permite estimar su acción como factor limitante del crecimiento fitoplanctónico. El molibdeno es de importancia en la fijación de nitrógeno ya que las enzimas nitrogenasa y nitrato reductasa necesitan este metal.

Aunque se desconoce el papel de las microcistinas, se ha observado que la capacidad de sobrevivir en deficiencia de hierro es mucho mayor en las cepas tóxicas de *Microcystis* que en las no tóxicas. Las aguas procedentes de depuradoras son aguas muy ricas en nutrientes y si se ha utilizado cloruro férrico, las aguas pueden contener hasta un máximo de 6  $\mu\text{M}$ . Esta concentración de hierro no limita el desarrollo de cianobacterias y por consiguiente, es muy probable que puedan desencadenar proliferaciones indeseadas.

La formación de espuma en la superficie de los cuerpos de agua, suele generarse bajo condiciones de alta presión barométrica, luz y vientos moderados, acompañados por una baja circulación del agua, en donde un gran número de individuos mantendrán su posición tomando ventajas de estas condiciones. Las espumas se separan rápidamente por el oleaje, redispersándose por efecto del viento y en bahías poco profundas, toman tiempo en difundirse, ya sea, por el oleaje o la desintegración. Si el viento cesa y la circulación disminuye, las cianobacterias incrementan su flotabilidad positiva. Si no pueden ajustar su nivel en la columna de agua, las células flotarán en las capas superficiales, formando espuma (Zohary y col., 1990).

#### **2.10.6. Resistencia al pastoreo por zooplancton.**

El pastoreo por parte de especies del zooplancton permite aportar al mantenimiento del equilibrio ecológico de las distintas comunidades del fitoplancton que componen el cuerpo de agua. Sin embargo

se ha informado que las cianobacterias no son un alimento adecuado para el zooplancton, por lo que la depredación no afectaría negativamente al desarrollo de las floraciones. Estudios más recientes fortalecen esta idea y proponen un mecanismo por el cual las cianobacterias no son una comida atractiva para el zooplancton. La condición de presa es dependiente del tipo de depredador al que se enfrenta, por ello el menor tamaño de las partículas alimenticias está determinado por la capacidad que el depredador tenga de incorporarla. Por ejemplo para *Daphnia*, importante especie del zooplancton, el pastoreo no es eficiente cuando el tamaño de su presa (cianobacterias) es mayor de 50  $\mu\text{m}$ .

No ha sido demostrado que el zooplancton contribuya efectivamente al control del desarrollo de grandes colonias de *Aphanizomenon*, *Anabaena* y *Microcystis*, aunque las cianobacterias individualmente por sus dimensiones sí servirían de alimento. En teoría, las microalgas podrían defenderse a través de la producción de toxinas, las que podrían generar efectos tóxicos sobre el zooplancton. Sin embargo, cepas de *Microcystis aeruginosa* productoras de microcistinas, no inhiben su ingesta por parte de los integrantes del zooplancton (Rohrlack y col. 1999).

La interrelación entre las poblaciones de los distintos grupos del fitoplancton y zooplancton lleva a una gran presión de consumo sobre los organismos que son palatables para los depredadores, que dejan a las cianobacterias desahucadas y entonces libradas a otros factores que sí son favorables y permiten un crecimiento masivo en biomasa y la formación de floraciones.

Varios zooflagelados, ameboides y ciliados pueden actuar como depredadores de las cianobacterias, sin embargo el valor nutricional para estas células en general es bajo y algunas pueden producir compuestos tóxicos o inhibidores de la reproducción de zooplancton. Finalmente las cianobacterias también pueden inhibir directamente el crecimiento de otras algas posiblemente por la excreción de compuestos inhibitorios o la liberación de estos compuestos al agua circundante al producirse la muerte y descomposición celular.

#### **2.10.7. Factores combinados**

Estudios de laboratorios han confirmado que tanto el pH, como la concentración de fósforo y dióxido de carbono pueden influenciar el desarrollo de la toxina. La presencia de seis diferentes tipos de

*Microcystis* en espumas flotantes fue monitoreada durante dos años en Hartbeespoort Dam, Sudáfrica. Las toxinas no eran detectadas durante el invierno y alcanzaban una máxima concentración en verano. La concentración total de 4 de las 6 microcistinas estaba directamente relacionada con la radiación solar, la temperatura de la superficie del agua, el pH y el porcentaje de saturación de oxígeno (Hee-Mock y col. 2000). Otros estudios, en Canadá, demostraron que la concentración de microcistinas tenía fuertes variaciones de una temporada a otra o, de un lago a otro durante una misma temporada. Las microcistinas se degradan en el agua, pero existe un período importante hasta que este proceso tenga lugar.

Los factores ambientales en que una cianobacteria expresa toxinas es uno de los aspectos mas estudiados por los especialistas, pero dista mucho de estar claro. Parece ser que altas temperaturas, alta luminosidad, poco viento (es decir, aguas tranquilas y no aireadas), además de disponibilidad de nitrógeno y fósforo podrían ser los factores implicados en que una determinada especie se transforme en toxica. También un pH del agua alcalino se ha asociado a la aparición de toxicidad. Se da la paradoja de que en muchos casos resulta bastante difícil hacer expresar la toxicidad en el laboratorio a determinadas cepas, mientras que en condiciones naturales la producción ha sido muy elevada.

### **2.11. Floraciones de Cianobacteria toxígenas en la República Argentina.**

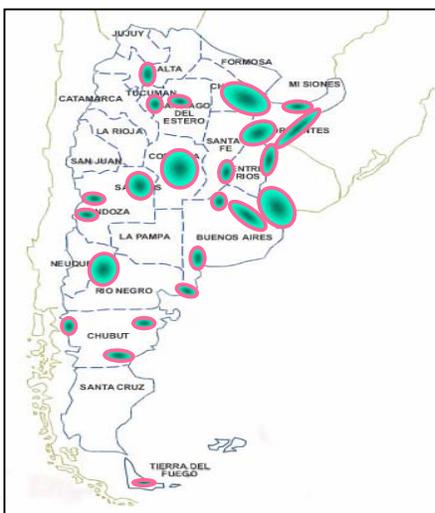
En Argentina, el primer evento cianotóxico se remonta a 1944 en la laguna Bedetti (Santo Tomé, Santa Fe). En esa oportunidad Mullor (1945), dio a conocer un suceso en el cual, tras la ingesta de agua en la que se estaba desarrollando una floración de una especie del género *Anabaena*, murieron aproximadamente 1000 patos de granja y una serie de animales silvestres (reptiles, anfibios, aves, etc.).

Posteriormente, en 1954 se analizó una mortandad de peces en la laguna del Monte (provincia de Buenos Aires) que se asoció a una proliferación masiva de varias especies de Cianobacteria entre las que se encontraban *Polycystis (Microcystis) flos-aquae*, *Anabaena circinalis* y *A. inaequalis*. (Ringuelet et al., 1955)

En 1984, Odriozola y colaboradores evaluaron la mortandad de 72 vacas ocurrida en un campo de la localidad de Goyena (Buenos Aires). Se realizaron ensayos de toxicidad aguda, sobre el contenido ruminal y estomacal de las vacas y se determinó que las muertes habían ocurrido como consecuencia de la ingesta de agua de un charco presente en un potrero. En ese cuerpo de agua se desarrollaba un florecimiento de *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae* y *Nodularia spumigena*.

A partir de la década del 90, los estudios relacionados con los aspectos nocivos de las Cianobacteria se incrementaron significativamente en la República Argentina. En distintos centros de investigación del país se han realizado estudios sobre la presencia de cianobacterias toxígenas, desde aquellos meramente taxonómicos, en los que se describen las especies nocivas a los relacionados con la dinámica poblacional de las especies de riesgo. Asimismo, se desarrollaron estudios toxicológicos: ensayos de toxicidad, análisis de toxinas e incluso de evaluación de los efectos que éstas producen en la fauna de ambientes acuáticos continentales.

Durante el 2004 se organizó la red global “CYANONET” en el marco del *Programa de Hidrología Internacional* (UNESCO), con el objetivo de nuclear los antecedentes disponibles a nivel mundial relacionados con la presencia de floraciones nocivas de Cianobacteria y evaluar los posibles planes de manejo de situaciones de riesgo. Dentro de esta recopilación, se incluyeron los antecedentes de la



**Fig. 6:** Principales áreas estudiadas con registro de floraciones de cianobacterias nocivas en la República Argentina (Echenique y Aguilera, 2009).

Argentina que permitieron establecer el estado de situación de esta problemática en nuestro país hasta la fecha. De la información recopilada en esa oportunidad, se destaca el hecho que los casos de desarrollos masivos de Cianobacteria toxígenas, son frecuentes en diferentes cuerpos de agua continentales de casi todo nuestro país (Fig. 6). La información general se encuentra disponible en la página web: [www.cyanonet.org](http://www.cyanonet.org).

Más recientemente, en nuestro país, se han ampliado tanto la lista de taxa nocivos, como los ambientes en situación de riesgo toxicológico. Por otra parte, se han llevado a cabo estudios de evaluación de presencia de cianobacteria y cianotoxinas en sistemas de abastecimiento de agua potable, así como de caracterización y análisis filogenético mediante estudios moleculares de poblaciones naturales y/o de cultivos.

En cuanto a los fenómenos relacionados con los cambios de características organolépticas, los más destacados en nuestro país son los ocurridos en San Luis (Silva et al. 1995) y en Bahía Blanca (Echenique et al. 2003; 2006). En ambas oportunidades, el estudio estuvo relacionado a los trastornos generados por la presencia de geosmina (compuesto volátil oloroso), en el agua de red domiciliaria.

## **2.12. Impacto de las cianobacterias tóxicas**

### **2.12.1 Salud humana**

Con relación a las cianobacterias, la preocupación por la salud pública se ha centrado en la capacidad que dichas especies y/o cepas poseen para producir toxinas. La exposición a cianotoxinas, puede ocasionar problemas de salud (dermatitis, afecciones gastrointestinales, etc causan una amplia gama de síntomas en seres humanos siendo los más notables: el dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarreas (gastroenteritis epidémica) (Lam y col., 1995).

Uno de los primeros síntomas por envenenamiento agudo con microcistina, (15 a 30 min.) es la elevación en la concentración de ácidos biliares, fofafasa alcalina, gama-glutamyl-transferasa y la aspartato amino-transferasa (Gorham y col., 1988). El número de glóbulos blancos se incrementa (leucocitosis), se activan factores que promueven la formación de coágulos y puede exhibirse diarrea acuosa y/o con sangre. La muerte puede producirse en algunas horas (4 a 24 h) o días, dependiendo del

individuo afectado y generalmente es precedida por una respuesta neuro-muscular (Carmichael, 1994). En los casos de ingestión los síntomas informados abarcan dolor abdominal, náusea, vómito, diarrea, dolor faríngeo, tos seca, dolor de cabeza, úlceras en la boca, neumonía atípica y elevación de las enzimas hepáticas en el suero (especialmente en la gama-glutamil transferasa). Otros de los síntomas observados en personas que han sufrido intoxicación con microcistinas incluyen la irritación de la piel y ojos, síntomas parecidos a los producidos por la fiebre del heno, disnea, fatiga y gastroenteritis aguda (Codd, 1994). En 1990, dos reclutas militares que participaban en ejercicios de canotaje, luego de su inmersión al agua (ingirieron agua) donde estaba presente una floración de *Microcystis aeruginosa*, presentaron dolores de garganta y abdominal (con diarrea), tos seca, ampollas alrededor de la boca y malestar general. Todos los síntomas desaparecieron en el plazo de una semana (Turner y col., 1990).

### **2.12.2. Aguas recreacionales**

Las intoxicaciones por cianotoxinas en humanos, se relaciona en parte, al uso de aguas recreacionales afectadas por floraciones, entre otras, de especies de *Anabaena* y *Microcystis*, en Norteamérica, Rusia, los Países Bajos y Australia, sin embargo, no se ha divulgado ningún caso fatal. En Canadá, a pesar del fallecimiento del ganado en Saskatchewan (Oeste de Canada) y las advertencias realizadas sobre su uso recreacional, varias personas se bañaron en este lago donde se desarrollaba una floración de cianobacterias. En este incidente trece personas se enfermaron y los síntomas fueron los siguientes: calambres en el estómago, vómitos, diarrea, fiebre, dolores de cabeza y musculares, así como irritación cutánea y ocular, garganta dolorida y reacciones alérgicas (Dillenberg y col., 1960). Del análisis del contenido intestinal de un paciente que había ingerido accidentalmente agua del cuerpo de agua, se pudo identificar claramente varias células de *Microcystis spp* y algunos tricomas de *Anabaena circinalis*.

En el Reino Unido, diez de veinte soldados se enfermaron después de nadar y practicar canotaje en aguas con un fuerte florecimiento de *Microcystis spp* sufrieron dolores abdominales, náuseas, vómitos, diarreas, garganta dolorida, tos seca, ampollas en la boca y dolor de cabeza. Dos de ellos desarrollaron

una neumonía severa atribuida a la inhalación de toxinas producidas por *Microcystis* y tuvieron que ser hospitalizados e ingresar a la unidad de cuidados intensivos. La natación y la cantidad de agua ingerida parecen estar relacionadas con la gravedad de la enfermedad y según estudios, las enzimas del suero, el daño hepático fue elevado y en la floración se identificó microcistina-LR (Turner y col., 1990).

En Australia, evidencia epidemiológica obtenida de un estudio sobre 852 personas, mostró una elevada incidencia de diarreas, vómitos, síntomas de gripe, erupciones en la piel, úlceras en la boca, fiebre, irritación ocular después de 2 a 7 días de expuesto al agua. Los síntomas aumentaron significativamente por la duración del contacto con el agua y densidad de células cianobacterianas (Pilotto y col., 1997).

De los casos documentados en personas que habían sido afectadas por cianotoxinas, en su mayoría enfermaban (en algunos casos gravemente) debido a la ingestión o aspiración de agua conteniendo cianotoxinas.

### **2.12.3. Agua de red**

En Estados Unidos y Australia, diversas toxinas de cianobacterias han sido implicadas en enfermedades humanas, después que floraciones de algas en ciertos abastecimientos de agua municipales se hubieran tratado con sulfato de cobre. Aunque no fue establecida una relación directa de la causa y efecto en la mayor parte de los brotes, hubo una fuerte evidencia que floraciones de cianobacterias estaban presentes en el área de depósito de agua (Tisdale, 1931).

Una floración presente en la Isla de La Palma (Australia), en 1979 demostró que las toxinas generadas por *Cylindrospermopsis raciborskii*, pudieron ser el agente causante, del mal gusto y olor presentes en el agua de red, atribuidas a compuestos liberados desde una floración de esa especie, por lo las autoridades trataron el depósito con sulfato de cobre. Posibles daños hepáticos, se detectaron por aumentos significativos en la glutamil transferasa, después del tratamiento del agua. En el plazo de una semana, 140 niños desarrollaron hepatoenteritis severa y 10 adultos requirieron tratamiento hospitalario sin registrarse ningún caso fatal. (Falconer, 1993, 1994).

Hasta la fecha, el caso más severo se atribuyó a la exposición de cianotoxinas en agua de red en Brasil, donde se desarrollaba floración de cianobacterias en un embalse, dando lugar a más de 2000 casos de gastroenteritis, con 88 muertes pronunciadas (sobre todo en niños) en un período de 42 días. Parece que la proliferación de cianobacterias resultó de la biomasa en descomposición y otras condiciones que prevalecieron en el área inundada del depósito (Teixeira y col., 1993).

#### **2.12.4. Salud animal**

Desde hace más de 100 años las cianobacteria toxígenas, son responsables de intoxicaciones en animales y humanos por ingesta de agua proveniente de cuerpos de agua, con desarrollos masivos de estas algas. En animales los casos de intoxicación letal se han dado por beber agua conteniendo floraciones de cianobacterias. El primer caso registrado de muerte de animales silvestres y domésticos, data de 1878, cuando en las proximidades de un lago del sur de Australia, un gran número de animales murió como consecuencia de haber ingerido agua conteniendo cianobacterias toxicas (Gorham y col., 1980). Desde entonces se han documentaron casos similares en ovejas, ganado vacuno, caballos, cerdos, perros, peces, roedores, anfibios, aves acuáticas, murciélagos, cebras y rinocerontes. También se hallaron casos donde perros han muerto luego de lamer su propio pelo con cianobacterias o a partir de ingerir cianobacterias bentónicas (Neehring, 1993).

Las cianobacteria sintetizarían toxinas como estrategia de competencia frente a otros componentes del fitoplancton y/o de defensa, frente a organismos fitófagos Las hepatotoxinas y neurotoxinas no sólo son extremadamente nocivas para los vertebrados, sino también para invertebrados diminutos que viven en lagos y charcas. Las toxinas (sobretudo las neurotóxicas), pueden producir la muerte de estos organismos, que usualmente son predadores de las cianobacteria, o bien reducir el número y tamaño de su descendencia. Aunque los envenenamientos se presentan, por lo general, en animales terrestres después de ingerir agua de suministros afectados con desarrollos masivos de cianobacterias, animales marinos y particularmente peces en cultivo, también pueden verse afectados al exponerse a estos fenómenos (Falconer, 1993). La muerte por hepatotoxinas, suele ocasionarse por shock hipovolémico secundario o hemorragia hepática. En estudios *post-mortem* se observa un incremento en el peso del

hígado, concentración de hemoglobina hepática y de hierro. En animales que resisten y no mueren rápidamente se observa hipercalcemia y/o hipoglucemia, insuficiencia hepática y muerte a los pocos días (Codd, 1994).

### **2.13. Medidas preventivas para reducir riesgo por exposición a cianobacterias**

- Evitar la exposición al agua cuando son fácilmente visibles las cianobacterias.
- Evitar el contacto con las algas a menos que se tomen las precauciones para prevenir el contacto directo.
- Evitar que el ganado o animales domésticos beban agua conteniendo altas concentraciones de cianobacterias.
- Evitar beber agua proveniente de cuerpos de agua no tratados, principalmente si hay floraciones en la cercanía.
- Debido al potencial de irritar la piel por contacto directo, se debe diluir y quitar los residuos del alga.
- Comunicarse con el departamento de salud regional y/o la institución que evalúa la calidad de agua, frente a un desarrollo masivo de cianobacteria a fin de proponer la identificación de la especie predominante, y el riesgo sanitario.
- En presencia de animales muertos alrededor de un lago, comunicarse con el departamento de salud y/o a la sección de control de animales, regional.
- Prohibir el uso recreacional de la fuente de agua.

### **2.14. Beneficios**

Además de los efectos perjudiciales en el ambiente y sobre animales y el hombre, ciertos tipos de algas verde-azules presentan impacto positivo en la agricultura. Entre estos podemos mencionar su uso como biofertilizantes dado que mejoran las condiciones del suelo y regulan el crecimiento de las plantas. Estas algas constituyen una fuente de nitrógeno para los ecosistemas naturales y cultivados, porque poseen la capacidad fisiológica de utilizar el nitrógeno atmosférico, para la producción de sus

proteínas y otros compuestos nitrogenados. En los arrozales se han detectado gran diversidad de especies de cianobacterias, estando algunas de ellas, mejor adaptadas a las condiciones del medio (luz, temperatura, concentración de fósforo y nitrógeno).

Numerosos estudios han indicado que la siembra con estas algas en los cultivos de arroz puede incrementar la producción de granos a un valor de 300 a 400 Kg/ha y por cosecha. En los países de bajos recursos, como la India y el Sudeste Asiático, donde el arroz es el principal componente de la alimentación y donde no se puede invertir en fertilizantes industriales por los altos costos, la utilización de las algas como fertilizantes naturales representa un método interesante. Asimismo, estas algas también están siendo usadas en algunos países europeos, para reducir los efectos nocivos en el ambiente, causados por el exceso de agroquímicos (Subrahmanyam y col. 1966).

Después del carbono, el nitrógeno es el elemento que contribuye con la producción de la biomasa y composición bioquímica de las células microalgales. A pesar de su abundancia en la atmósfera, las plantas no lo pueden asimilar de él, sino que deben satisfacer su necesidad de compuestos nitrogenados que se encuentren en el suelo. Estos son añadidos al mismo por la mineralización microbiana de los restos orgánicos o vía biológica por fijación del nitrógeno del aire, cualidad de un número restringido de bacterias incluyendo las cianofíceas o cianobacterias (Herrero y col., 2001). También puede ser añadido como fertilizante sintético rico en nitrógeno, produciéndose residuos nitrogenados como el amonio. Este elemento, disuelto en agua, es tóxico y el aprovechamiento y precio de estos fertilizantes está condicionado al costo de la energía que se requiere para su síntesis industrial. Varios resultados muestran que se produce gran variabilidad tanto en el crecimiento como en la composición bioquímica debido a las variaciones en la concentración de nitrógeno. Así mismo, las fuentes nitrogenadas varían en cuanto a la influencia que pueden ejercer sobre la fisiología microalgal. Las cianobacterias sufren cambios en la estructura, metabolismo celular y la expresión de genes en respuesta a la limitación de nitrógeno. Los primeros cambios implican la degradación de las ficobiliproteínas, los cuales constituyen fuente importante de nitrógeno.

Existe un interés creciente por el desarrollo de técnicas eficientes en el cultivo de microalgas y cianobacterias, debido a que son una fuente de sustancias de uso industrial y farmacológico de gran

valor económico; tales como clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas, proteínas, exopolisacáridos y otros metabolitos biológicamente activos (Rosales-Loaiza, 2008).

Muchos de los compuestos obtenidos a partir de las cianobacterias tienen propiedades antibióticas y actividad microbiana. Algunas especies contienen proteínas como la cyanovirina-N. Este compuesto se encuentra bajo investigación dada su potencial aplicación como agente antiviral ya que muestra actividad contra el HIV (Torres-Ariño 2004).

Las cianobacterias constituyen una fuente excelente de aminoácidos, vitaminas, enzimas y ácidos grasos polinsaturados, por lo que son utilizadas como suplemento dietario. **Arthospira** (Spirulina) es colectada y consumida por poblaciones en la vecindad del lago Chad (Africa), así como por antiguos pobladores del valle de México cercanos al lago Texcoco. Los análisis bioquímicos de **Spirulina** revelan que más del 50% del peso está constituido por proteínas que contienen altos niveles de la mayoría de los aminoácidos esenciales (Basurto Peña, 2009, Arenas 2009, Garbisu y col. 1999). **Nostoc** es un suplemento dietario común en comunidades nativas de Tailandia, Perú, Bolivia, China, Ecuador, Fiji, Java, Japón, Mongolia y Siberia, donde se aprecian sus grandes propiedades nutricionales y su alto contenido proteico. Asimismo, la biomasa cianobacteriana se emplea para la alimentación de peces, crustáceos, aves de corral y ganado (Rosales y col., 2008, Potts , 2000, Garbisu y col. 1999).

Cepas de especies pertenecientes al género **Aphanizomenon**, utilizadas como alimento y suplemento dietario, resultan un importante riesgo ya que podría contener alguna cepa toxigénica, tal como ya fue registrado en el lago Klamath, Canadá (Carmichael, 2003, 2004, Arenas 2004).

Asimismo, la crisis energética-ambiental actual demanda la búsqueda y desarrollo de fuentes de energía alternativas al uso de combustibles fósiles. Una de las alternativas es la obtención de biodiesel; combustible producido a partir de aceites provenientes de plantas oleaginosas. En contraste con el petrodiesel, el biodiesel es una fuente de energía renovable y biodegradable que además produce menos emisiones indeseables durante su combustión. El cultivo de cianobacterias para la producción de este combustible es una alternativa ventajosa ya que poseen un elevado contenido de lípidos, presentan una

alta tasa de crecimiento y prosperan en aguas marinas, dulces, salobres y residuales. La utilización de microalgas en lugar de oleaginosas reduce significativamente el uso de enormes extensiones de terreno fértil y es posible, además, obtener subproductos (proteína, carbohidratos, biopolímeros, pigmentos, biogás, etc.) a partir de la biomasa microalgal residual (Garibay Hernández y col., 2009). Por otro lado, se ha logrado fotoproducir combustibles como el hidrógeno ( $H_2$ ) y compuestos químicos reducidos, como el  $NADPH_2$ , a partir de cianobacterias heterocisténeas, como *Anabaena azollae*. La fotoproducción de  $H_2$  es posible ya que la enzima nitrogenasa presente en los heterocistos tiene actividad hidrogenasa, además de reducir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ) (Garbisu y col. 1999).

Sin embargo, algunas cianobacterias son conocidas por sus aspectos perjudiciales, destacándose su potencial capacidad de generar cianotoxinas y de ocasionar alteraciones de las características organolépticas del agua por liberación de metabolitos volátiles.

## **2.15. Métodos de identificación de cianotoxinas**

Los ensayos con ratones han sido métodos tradicionales para determinar presencia de cianotoxinas, pero factores tales como sensibilidad y la dificultad para obtener resultados cuantitativos, han llevado a la implementación de otros métodos para monitorear rutinariamente muestras de agua.

### **2.15.1. HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)**

El método más común de análisis instrumental para la determinación de presencia de cianotoxinas, se realiza usando el HPLC (cromatógrafo líquido de alta resolución). Las toxinas son separadas unas de otras usando como fase estacionaria una columna de fase reversa C18 o de superficie interna e incluso de intercambio iónico y como fase móvil metanol o acetonitrilo, pudiendo determinar el tipo de microcistinas presente. Una vez separada las toxinas, la próxima etapa es la detección. Los límites de detección dependen de la concentración de la toxina así como del volumen de la muestra. Algunos

ensayos han establecido un límite de detección de alrededor de  $0.02 \mu\text{g.L}^{-1}$  para microcistinas en una muestra de 5 L de agua (Lawton y col., 1994).

La detección puede también realizarse mediante detector de Foto diodo (PDA). Un detector PDA no sólo responde ante la absorción del UV sino al espectro típico de las toxinas. Las microcistinas tienen un espectro de absorción máxima de 238 nm (222 nm en caso de que contengan aminoácidos aromáticos) provee un mayor grado de confiabilidad en presencia de microcistinas. Este método es especialmente confiable a altas concentraciones de microcistinas debido a que dan un espectro bien definido. Los límites de detección en este método son inferiores a  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  en altas concentraciones de microcistinas (Edwards y col., 1991).

Adicionalmente, puede utilizarse detección con Espectrómetro de masa (LC/MS). Este método se utiliza luego de la separación en HPLC y provee una mejor solución al problema de la identificación de los diferentes tipos de microcistinas debido a que cada una de ellas produce iones característicos en su espectro de masa. Con una muestra de 5 L de agua este método provee un límite de detección de alrededor de  $0.02 \mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistinas (Ott y col., 2006).

Es otra técnica de separación y cuantificación de hepatotoxinas es la Electroforesis capilar (CE) que no tiene aún el alcance necesario para realizar monitoreos rutinarios de agua, a diferencia del HPLC. La ventaja que aporta este método es el aumento de la sensibilidad en respuesta a la presencia de microcistinas (Gago-Martínez et al, 2003).

### **2.15.2. Cromatografía Gaseosa**

Un método de aparición reciente es la GC (Cromatografía Gaseosa), basada en la oxidación de microcistinas produciendo ácido 3-metoxi-2-metil- fenilbutanoico. Mediante esta técnica es posible alcanzar un límite de detección de 0.43 ng, dependiendo de la concentración del tóxico. Este método ha sido empleado en el monitoreo de lagos japoneses y en sedimentos (Palmetier y col., 1998).

### 2.15.3. Ensayo de la Enzima inmunoabsorbente (ELISA)

Este tipo de ensayo se ha llevado a cabo durante años para determinar contaminantes ambientales, incluyendo toxinas. La inmunodetección es posible debido a que los anticuerpos pueden reconocer específicamente cualquier estructura química. La técnica **ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) se basa en este principio y contempla la detección de un antígeno en una fase sólida mediante anticuerpos que reaccionan dando un producto coloreado que es posible medir por espectrofotometría. Se trata de métodos muy adecuados para screening recomendándose su validación y comparación con otros métodos.

Algunas investigaciones han demostrado que los anticuerpos son muy eficientes frente a algunas cistinas, como microcistina-RR. Sin embargo, su respuesta es muy pobre frente a otras, como microcistina-LA. A pesar de esta falta de sensibilidad frente a algunas microcistinas, este método es muy utilizado en la determinación estas toxinas en muestras ambientales, obteniéndose buenos resultados en muchos países del mundo (Ann y col., 1994). En China, debido al gran número de casos informados con cáncer de hígado, este método se utiliza para monitorear la presencia de microcistinas en agua potable.

Es el método más difundido para la identificación de microcistinas. Existen kits comerciales para determinar el nivel de microcistinas en agua los cuales tienen un límite de identificación de  $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ , mientras que en los más sofisticados el límite es de entre  $50\text{--}250 \text{ ng.L}^{-1}$ . Como no detectan microcistinas en bajas concentraciones, producen sólo resultados semicuantitativos.

Existen distintos kits de ELISA comerciales (ejemplos: EnviroLogix Inc., Portland, Me, USA; Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE, USA; Wako Chemicals, Osaka, Japon). Los resultados son generalmente expresados como  $\text{mg.ml}^{-1}$  de MC-LR que constituye el estandar del kit. Operan con una sensibilidad que permite estimar la concentración de microcistinas por debajo del límite recomendado por la OMS

Para lograr una correcta evaluación de la ocurrencia de floraciones de cianobacterias y sus cianotoxinas se requiere implementar un monitoreo que incluya la observación del sistema a estudiar,

la obtención de muestras para analizar los aspectos bióticos (presencia de cianobacterias y toxinas) y el registro de variables abióticas relacionadas con el crecimiento de las cianobacterias (temperatura, nutrientes, etc). En este sentido se desarrolla el presente trabajo de tesis que contempla estas determinaciones y sus correlaciones así como la generación de cultivos de cianobacterias aisladas del reservorio para comprender en profundidad en fenómeno cianobacteriano.

### **3. OBJETIVOS**

Se puede afirmar que el riesgo relativo que representa la presencia de estirpes tóxicas de *Microcystis* spp. productoras de Microcistinas en la cuenca del Plata es enorme, debido a diversos factores:

- 1.- La intensidad de las floraciones
- 2.-La diversidad de cepas de *Microcystis aeruginosa* que crecen en distintos ambientes
- 3.-El área que abarca el fenómeno
- 4.-La toxicidad que presentan las diferentes cepas y el número de microcistinas producidas.
- 5.-La magnitud de su posible impacto sobre la población
- 6.-Posibilidad de afectar fuertemente un recurso tan valioso como las fuentes de agua potable y el agua potable misma.

Asimismo, existe un vacío de conocimiento respecto a los niveles de exposición a las cianotoxinas por la población. La epidemiología de las intoxicaciones con hepatotoxinas y de otras cianotoxinas en Argentina es nula. Las causas que contribuyen a estos florecimientos son desconocidas por los responsables de la gestión del riesgo que deberían aplicarlas en los casos de floraciones cianobacterianas.

Existe desconocimiento por parte de los médicos referidas a las toxicosis cianobacterianas, y su diagnóstico en personas expuestas así como asociar su presencia en el ambiente con la expresión clínica de la intoxicación.

Hasta el presente las toxinas en agua de red no han sido investigadas en nuestro medio ni en fluidos biológicos o el ambiente.

En este trabajo de tesis se focalizó la atención en los efectos nocivos de presencia de *Microcystis* spp y Microcistinas en el recurso hídrico del Río de la Plata.

### **3.1 Objetivo general**

El objetivo de este trabajo de tesis es avanzar en el conocimiento de las cianobacterias y las cianotoxinas en diferentes cuerpos de agua dulce en la zona de La Plata

### **3.2. Objetivos específicos**

Detectar e identificar las especies de cianobacterias potencialmente tóxicas presentes en el Río de La Plata.

Detectar e identificar toxinas cianobacterianas presentes en el Río de La Plata

Aislar cianobacterias del reservorio de agua del Río de la Plata

Generación de una colección de cultivos de cianobacterias

Realizar un monitoreo de parámetros físicos, químicos, biológicos y de cianobacterias y cianotoxinas en el Río de La Plata

Buscar correlaciones entre los florecimientos y los factores físicos y químicos del ambiente

Analizar la presencia de microcistinas en el agua de red.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

#### 4. 1. Puntos de muestreo

El estudio del monitoreo se efectuó en una zona costera del Río de la Plata y en dos lagunas dentro del Municipio de Ensenada, Provincia de Bs. As. Para tal fin se dispusieron cinco estaciones de muestreo, correspondientes a lugares de uso recreacional, pesca deportiva, toma de agua de la planta de tratamiento de aguas. Los puntos de muestreo fueron dos lagunas: laguna Aeroclub ( $34^{\circ}52'48''\text{S}$ ,  $57^{\circ}57'37''\text{O}$ ), laguna Salada ( $34^{\circ}50'46''\text{S}$ ,  $57^{\circ}57'23''\text{O}$ ) (Fig. 1).



Fig. 1. Ubicación de la Laguna Aeroclub y Laguna salada

Se muestrearon también tres puntos sobre el Río de la Plata: dos de ellos de uso recreacional y otro correspondiente a la entrada de toma de agua de la planta potabilizadora (Fig. 2).

Estos tres puntos fueron: 1) Rotonda de acceso ( $34^{\circ}50'04''\text{S}$  y  $57^{\circ}52'41''\text{O}$ ) es un punto recreacional de entrada al río; 2) Toma de Agua de la planta potabilizadora Donato Gerardi (Ensenada, Argentina) ( $34^{\circ}49'13''\text{S}$  y  $57^{\circ}57'49''\text{O}$ ) que representa la calidad del agua sin tratar y 3) Isla Santiago ubicada cerca del puerto de acceso a la La Plata ( $34^{\circ}49'51''\text{S}$  y  $57^{\circ}56'50''\text{O}$ ), a 10 km de los puntos anteriores. La Fig. 2 se muestran esos puntos.

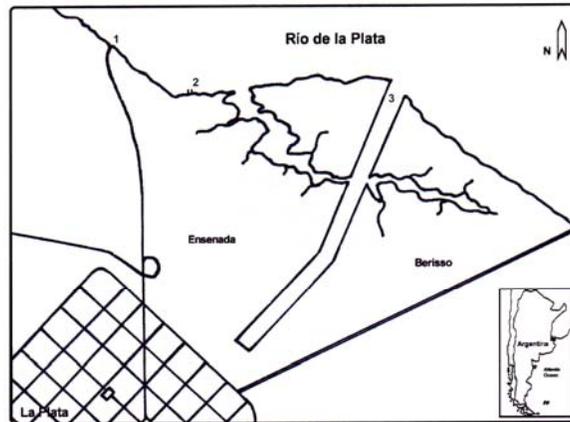


Fig. 2: Sitios de muestreo sobre el estuario del Río de la Plata. 1) Rotonda, punto recreacional sobre el Río de la Plata. 2) Toma de agua de la planta de tratamiento de aguas y 3) puerto de acceso al puerto (Isla Santiago).

#### **4.1.1. Tomas de muestras**

##### **4.1.1 En el Río de la Plata y en las lagunas**

Las muestras se colectaron, superficial o sub-superficialmente, en cada uno de los puntos de muestreo detallados anteriormente con frecuencia mensual o mayor durante los meses de verano (periodo de mayor desarrollo de floraciones algales), desde enero hasta diciembre de 2005.

Las tomas de muestras no se realizaron en días lluviosos. Se tomaron muestras luego de 72 hs de finalizada la lluvia con el objeto de permitir que el reservorio de agua retorne a su condición regular. Adicionalmente se colectaron muestras dos días después de dos episodios de muerte de peces en la región (enero 2005 y febrero 2006).

En todos los casos se colectaron muestras por duplicado.

Para los análisis bacteriológicos las muestras se tomaron en botellas de vidrio estériles de 1 litro de capacidad. Se trasladaron rápidamente al laboratorio en forma refrigerada.

Para los estudios de fitoplancton se tomaron con red de plancton (para los estudios cualitativos) y con botella de tipo Van Dorn (para los estudios cuantitativos).

Para la detección de toxina Microcistina se tomaron 5 litros de muestra en recipientes plásticos. La conservación de la muestra se realizó bajo congelación (-20 °C).

Para el estudio de los parámetros físico-químico (nitrógeno, fósforo, hierro, clorofila y fosfato) se tomaron 1 litro de muestra en recipientes plásticos.

Para cada sitio de muestreo se registraron, “*in situ*”, los siguientes parámetros físico-químicos (temperatura, pH y conductividad).

Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas a efectos de realizar los estudios bacteriológicos, físico-químicos, la detección de toxina y el aislamiento y cultivo celular de cianobacterias (*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp.). La determinación de clorofila se realizó lo más rápido posible luego de la toma de muestra.

Otra parte de las muestras recolectadas se trasladaron al Laboratorio Científico de Ficología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la UNPL y se dispusieron en heladera hasta efectuar los análisis cuali - cuantitativo de fitoplancton.

#### **4.1.2. En red de distribución domiciliaria**

Debido a la potencial presencia de cianotoxinas en el Río de la Plata que abastece de agua a la red domiciliaria de la ciudad de Ensenada y La Plata, se establecieron puntos de muestreo domiciliarios en ambas ciudades. Las tomas de muestra de en estos puntos domiciliarios (5 L) se realizaron en fechas de verano y cercanas a los florecimientos detectados en el Río de la Plata. En la Tabla 1 presenta la distribución de estos puntos de muestreo en la ciudad de Ensenada y La Plata tomados a efectos de evaluar la concentración de microcistinas en agua de red en enero 2005.

### **4. 2. Análisis fitoplanctónicos**

#### **a.- Estudios taxonómicos:**

Para al reconocimiento cualitativo de fitoplancton, las muestras se colectaron con red de plancton de malla de 30 µm de poro (Fig. 3). El material se obtuvo mediante arrastre horizontal en las capas superficiales. El material obtenido fue estudiado “*in vivo*” y posteriormente conservado con solución

Transeau (50:50). El estudio se llevó a cabo utilizando un microscopio WILD M20, provisto de cámaras fotográficas y de dibujo.

Tabla 1: Puntos de muestreo para la detección de Microcistinas en red domiciliaria correspondiente a enero 2005.

<b>Localidad</b>	<b>Punto de muestreo</b>	<b>Ubicación</b>
Punta Lara (Ensenada)	(1)	Club de Pesca
Villa del Plata (Ensenada)	(2)	11 N° 4351
El Dique (Ensenada)	(3)	124 y 43
La Plata	(4)	18 y 33
La Plata	(5)	1 y 48
La Plata	(6)	4 y 33
La Plata	(7)	60 y 2

La identificación cianobacterias se realiza considerando la presencia, forma y tamaño de atributos morfológicos utilizando claves según Komárek y Anagnostidis, 1989, 1998 y 2005) y Anagnostidis y Komárek (1985).

El análisis microscópico del material incluye la observación general del organismo al microscopio y luego de las células vegetativas y diferenciadas. La muestra fresca es importante porque en ella se observan características que facilitan la identificación como la existencia de motilidad, coloración y tamaños originales. Para la obtención de las medidas de los organismos se utiliza la regilla del ocular (que debe ser calibrada).



Fig. 3. Red de fitoplancton

**b.- Estudios cuantitativos.**

Para el estudio cuantitativo de la taxocenosis fitoplanctónica, las muestras se obtuvieron en superficie con botella tipo Van Dorn (Fig. 4) y fueron fijadas “*in situ*” con solución de lugol 1%. El material fue estudiado con microscopio invertido, siguiendo el método de Utermöhl (1958) empleando cámaras de sedimentación (Fig. 5).

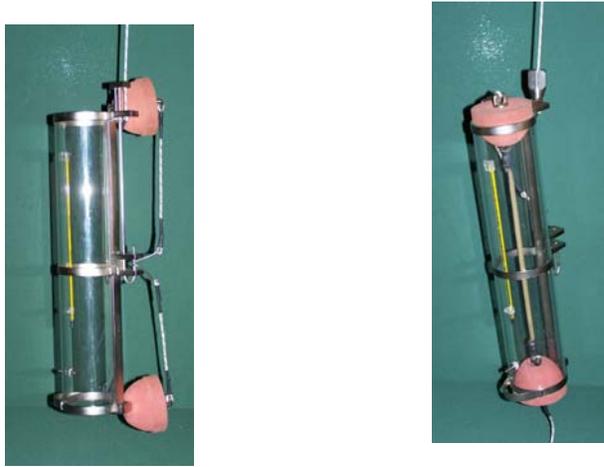


Fig. 4. Botella de Van Dorn abierta y cerrada

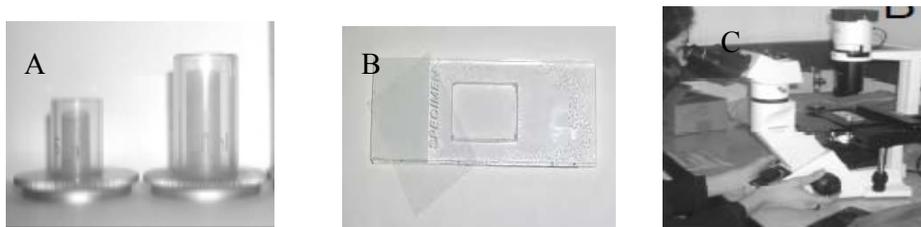


Fig. 5: A) Cámaras de sedimentación para microscopio invertido de izquierda a derecha de 5, 20 ml  
B) Cámaras de conteo tipo Sedwick-Rafter en acrílico y C) Microscopio invertido.

**4. 3. Parámetros fisicoquímicos**

**4.3.1. Monitoreo de los parámetros y métodos analíticos utilizados.**

La selección de los parámetros monitoreados se basaron en los recomendados por GEMS/WATER (WHO, 1987). Los métodos analíticos empleados fueron los correspondientes a los métodos

estandarizados APHA (1992). Los métodos correspondientes se indican entre paréntesis. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Se determinaron parámetros en el lugar como ser: pH, conductividad y temperatura. El pH se determinó empleando el Método 4500-H, APHA (1992); la temperatura mediante el método APHA 2550-B y la conductividad según método 2510 APHA (1992); estas determinaciones se realizaron utilizando zonda Sper Scientific Water Quality Meter 850081.

Muestras de agua colectadas con ayuda de una botella tipo Van Dorn fueron filtradas previo al análisis físico-químico con el fin de eliminar el material particulado y poder determinar por espectrofotometría el contenido de nutrientes. En algunos casos se hizo necesaria la dilución de las muestras debido que sobrepasaban los límites de detección y cada una se proceso siguiendo los pasos del método empleado.

Se determinó la concentración de hierro, nitratos y nitritos empleando reactivos analíticos.

Se utilizaron los siguientes procedimientos

<i>Método APHA</i>	<i>Formas determinadas</i>	<i>Límites de detección</i>
Hierro (3500-Fe D)	Fe	0 a 1.300 mg.L <sup>-1</sup> Fe
Nitratos (4500-NO <sub>3</sub> E), (Reducción del Cadmio)	NO <sub>3</sub> -N, NO <sub>3</sub>	0 a 30.0 mg.L <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub> -N
Nitritos (4500- NO <sub>2</sub> _ B)	NaNO <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub> -N, NO <sub>2</sub>	0 a 0.300 mg.L <sup>-1</sup> NO <sub>2</sub> -N

Para la determinación de Fósforo se utilizó método colorimétrico del ácido vanadomolibdofosfórico (Método 4500-PC, APHA, 1992) Para ello, primeramente se ajustó el pH de la muestra a la fenoftaleína. Seguidamente, se colocaron 35 ml de la muestra en un matraz aforado de 50 ml. Se Añadió 10 ml del reactivo vanatomolibdato y se enrasó con agua destilada. Paralelamente se preparó un blanco con 35ml de agua destilada en lugar de la muestra. Al cabo, de 10 minutos se midió la absorbancia de la muestra frente a un blanco a longitud de onda de 490nm. El color fue estable durante días y su intensidad no se vio afectada por variaciones de la temperatura ambiente.

Se preparó una curva de calibración utilizando volúmenes adecuados de la solución patrón de fosfato de sodio. Para el cálculo del contenido de fósforo en la muestra se leyó la absorbancia de la muestra y se calculó mediante la curva de calibración el valor de fósforo. Para el cálculo del valor de fósforo ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Cálculo mg Fosforo.L}^{-1} = \frac{\text{mg P (en 50 ml volumen final)} \times 1.000}{\text{ml de muestra}}$$

#### **4. 4. Determinación de Clorofilal-a (Método espectrofotométrico 10200-H, APHA, 1992)**

La extracción se basa en la transferencia del pigmento (Clorofila *a*) a un solvente orgánico sin provocar cambios químicos en la molécula. La concentración de Clorofila *a* se cuantifica por absorbancia en un espectrofotómetro.

La evaluación de la concentración de clorofila en un volumen determinado de agua puede utilizarse como indicador de la biomasa algal en el mismo. La clorofila es soluble en solventes orgánicos, suele usarse acetona o metanol para su extracción, ya que rompen los puentes entre el pigmento y las proteínas solubilizando las clorofilas.

Se realizó la determinación espectrofotométrica de la clorofila-a, ésta determinación depende de la Ley de Lambert-Beer. Se miden las densidades ópticas a diferentes longitudes de onda. Deben conocerse los coeficientes de absorción específica de los pigmentos puros a cada longitud de onda. La extracción de la clorofila debe realizarse en la oscuridad y a baja temperatura para reducir al mínimo la fotooxidación. Luego de filtrar un volumen conocido de muestra (10 a 50 ml) se coloca el filtro en freezer para facilitar la ruptura de las paredes celulares y la liberación del pigmento y se agrega del solvente de extracción, se deja reposar en la oscuridad una noche, se procede a leer en el espectrofotómetro a la absorbancia a 664 y 647 nm.

En la misma cubeta se agrega una gota de HCl 1N y luego de 1 minuto se vuelve a leer la absorbancia a ambas longitudes de onda. Cuando se obtiene un registro de absorbancias a diferentes longitudes de onda se está determinando una sumatoria de todos los pigmentos que absorben a esas longitudes de

onda. De los distintos tipos de clorofila, la clorofila-a se encuentra en todas las algas, ya que es esencial para la fotosíntesis.

#### Procedimiento

Muestras de 500 ml se filtraron empleando una bomba de vacío y filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (0.7 $\mu$  de poro). Los filtros se colocaron en tubos de centrifuga a los cuales, se adiciono 3ml de acetona 90% y luego, se cerraron herméticamente. El extracto contenido en los tubos se almaceno a 4°C por 20horas. Después de este tiempo, se filtro el extracto a través de un filtro Whatman GF/F para eliminar los residuos del papel y evitar interferencias en la lectura. La solución extraída se transfirió a tubos perfectamente limpios y enjuagados con acetona 90%.

Una alícuota de la solución extraída, se transfirió a una celda y se midió la absorbancia a longitudes de onda a 750, 664 y 647nm.

Para determinar la concentración de la clorofila “a”, se utilizaron la siguiente ecuación.

$$\text{CLO-A } (\mu\text{g.L}^{-1}) = (11.93 \cdot A_{664}) - (1.93 \cdot A_{647}) \times \text{Vol de extracto (ml)} / \text{Vol Filtrado (L)}$$

Todas las absorbancias se corrigieron por 750nm ( $A_x - A_{750\text{nm}}$ ) antes de ingresar a la formula.

#### 4. 5. Examen bacteriológico:

##### 4. 5. 1. Determinación del número de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, mediante la técnica de fermentación de tubos múltiples (*Método* (9221 E y 9221B) *APHA, 1992*)

**a. Prueba Presuntiva:** se utilizó 9 tubos de Caldo Mc Conkey simple concentración conteniendo en su interior campanitas de Durham (tubos de vidrio pequeños invertidos a efectos de capturar el volumen de gas generado), inoculado con 1ml, 0.1ml y 0.01ml de muestra por cada estación monitoreada. Estos se incubaron a 37°C y luego de 24-48h, se efectuó la lectura (APHA, 1992).

**b. Prueba Confirmativa:** los tubos positivos de la prueba anterior se inocularon en tubos con caldo Verde Bilis Brillante simple concentración con campanita de Durhan, los cuales se incubaron a 37°C

por 24h. Los presuntos coliformes se sembraron en tubos caldo EC simple concentración y se incubaron a 44°C durante 24h.

<b>Caldo</b>	<b>Principio</b>	<b>Reacción Positiva</b>
<b>Caldo McConkey</b>	Contiene lactosa y un indicador de pH (rojo neutro) que vira hacia rojo a pH ácido cuando la lactosa es fermentada. Además, contiene sales biliares que inhiben el crecimiento de muchas bacterias, especialmente Gram positivas.	Gas en la campana de Durham y el viraje al amarillo
<b>Caldo Verde Brillante</b>	Contiene lactosa, sacarosa, una elevada concentración de aminoácidos, verde brillante como inhibidor de crecimiento de muchos fermentadores, es decir que inhibe o reduce al mínimo el desarrollo de las bacterias no pertenecientes al grupo coliformes	Gas y turbidez en el caldo
<b>Caldo EC</b>	Las sales minerales inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas, así como de los microorganismos no adaptados al medio ambiente intestinal.	Gas y crecimiento en el caldo

**c. Prueba completa:** A partir de los tubos positivos de caldo EC, una alícuota de cultivo se aisló en agar EMB y se incubó de 44°C por 24h, observando luego las características de las colonias presentes.

<b>Agar</b>	<b>Principio</b>
Eosina-Azul de metileno (EMB)	Medio rico lactosado con dos colorantes, eosina y azul de metileno, que también funcionan como inhibidores del crecimiento de Gram positivos.

<b><i>Bacterias comunes del medio EMB</i></b>	<b><i>Características</i></b>
<i>Escherichia coli</i>	Colonias de 2 o 3 mm de diámetro, separado, de superficie plana o cóncavos, de centros oscuros casi negros, de apariencia metálica.
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Colonias de mayor tamaño, convexidad pronunciada, de centro no tan oscuro y sin apariencia metálica.

Una colonia típica (apariencia metálica) de las bacterias crecidas en medio EMB se aisló y sembró en agar nutritivo y se incubó a 37°C por 24h. Este procedimiento permite aislar colonias típicas de *Escherichia coli*.

**d. Test de IMVIC** (A partir de cultivos puros).

**1.- Prueba de Indol:**

Se inocularon cultivos puros en tubos de agua triptona. Luego, se incubó a 37°C por 24-48h. A cada tubo se le añadió 0.2-0.3ml del reactivo de Kovacs (p-dimetil amino-benzaldehído) y se esperó unos minutos para proceder con la lectura.

**2.- Prueba de Rojo de Metilo y Voges Proskauer:**

A partir de cultivos puros se siembra en tubos de Clark y Lups y se incubó a 37°C durante 3-5 días. Luego de ese periodo, el cultivo se separó en 2 alícuotas. En una de ellas se realizó la reacción de rojo de metilo; para ello, se añadió 5 gotas de la solución rojo metilo al 0.04%. Si el color es rojo la prueba es positiva. Para la prueba de Voges Proskauer, a la otra alícuota se añadió 0.6 gotas de alfa naftol 6% en alcohol de 60° y 0.2ml de hidróxido de potasio y se observa el color.

**3.- Prueba de Citrato:**

Con ayuda de un ansa recta se inoculó el cultivo puro aislado en agar nutritivo en agar citrato de Simmons. Posteriormente, se incubó a 37° por 24-48h.

<i>Test de IMVIC</i>	<i>Principio</i>	<i>Reacción Positiva</i>	<i>Reacción Negativa</i>
<b>Indol</b>	Investiga la capacidad de un microorganismo de obtener indol a partir de una moléculas de triptófano	Anillo rosado en la superficie	No hay cambio de color (amarillo)
<b>Rojo Metilo</b>	Investiga la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables lo productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa	Coloración roja en la superficie del medio.	Coloración amarilla en la superficie de medio
<b>Voges Proskauer</b>	Investiga la capacidad de un microorganismo de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoina), a partir de la fermentación de la glucosa.	Disco rosado en la superficie	Color amarillo en la superficie
<b>Citrato</b>	Determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono.	Viraje del medio de verde a azul, producto de la alcalinización del medio (pH: 7.6)	No hay viraje del medio (verde)

#### 4. 6. Aislamiento y cultivo de cianobacterias

##### 4. 6.1. Preparación del medio de cultivo Z8

Inicialmente, se preparo las soluciones stock:

<b>Solución stock A:</b>	47.6g de $\text{NaNO}_3$ + 5.9g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 2.5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1L de agua destilada.
--------------------------	--

<b>Solución stock B:</b>	3.1g de $K_2HPO_4$ + 2.1g de $Na_2CO_3$ en 1L de agua destilada.			
<b>Solución Fe-EDTA:</b>	10ml $FeCl_3$ (2.8 de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ disueltos en 100ml de HCl 0.1M) con 9.5 ml de una solución de EDTA (3.9g de EDTA- $Na_2$ disueltos en 100ml de NaOH 0.1M). Llevar a 1000ml con agua destilada.			
<b>Solución MN</b>  100 ml de cada una de estas soluciones	1	0.330g/L	$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	
	2	0.880g/L	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	
	3	1.20g/L	KBr	
	4	0.830g/L	KI	
	5	2.87g/L	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	
	6	1.55g/L	$Cd(NO_3)_2 \cdot 24H_2O$	
	7	1.46g/L	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	
	8	1.25g/L	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	
	9	1.98g/L	$NiSO(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	
	10	0.410g/L	$Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	
	11	0.089g/L	$V_2O_5$	
	12	4.74g/L	$Al_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4 \cdot 4H_2O$	
	□3a	3.10g/l	$H_3BO_3$	
	13b	2.23g/L	$MnSO_4$	

Se mezcló 10ml de cada una de estas soluciones de la 1 -12 en 100ml de la solución de partes iguales de 13 a y 13b en una probeta y se enrasó a 1L con agua biodestilada. Se esterilizó cada una de las 4 soluciones stock, las cuales fueron conservadas a 4°C. El medio Z8 se preparó en cámara de flujo laminar mezclando 10 ml de A, 10 ml de B, 10 ml de Fe-EDTA y 10 ml de MN y se enrasó a 1 L con agua destilada. El medio preparado se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

#### **4.6.2. Aislamiento y generación de cultivos de cianobacterias**

En el aislamiento y cultivo de cepas de Cianobacteria se utilizó medio de cultivo Z8.

Para el aislamiento de estirpes de cianobacterias, con una pipeta Pasteur se tomó un conjunto de células de cianobacterias tomadas con red de fitoplancton acompañada de una pequeña cantidad de agua y se colocó en una depresión de una placa de porcelana estéril. En la depresión continua de la placa se colocó de 3-4 gotas de medio Z8 de modo que sean lavadas las células y logre la separación de contaminantes arrastrados. El procedimiento de lavado se realizó varias veces empleando sucesivas depresiones de la placa estéril. Se transfirió las células lavadas (aisladas) a un Erlenmeyer de 50ml con 15-25 ml de medio Z8. Luego el cultivo tapado con tapón de algodón se colocó en una cámara de cultivo a temperatura controlada de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  con iluminación proveniente de paneles de tubos fluorescentes ubicados en forma lateral y con intensidad luminosa promedio de  $26\text{W}/\text{m}^2$ . Periódicamente, se efectuó la observación al microscopio (10x, 40x y 100x) de las alícuotas extraídas. En caso de contaminación, se repitió el proceso de aislamiento. Se efectuó una renovación periódica (mensual) del cultivo en medio Z8.

Para realizar el cultivo, se trabajó 10-15ml del cultivo unialgal desarrollado en Erlenmeyer conteniendo 0.8 L de medio Z8. Parte del cultivo se colocó en un agitador para su oxigenación y el restante se mantuvo en el Erlenmeyer de origen y se le adicionaron entre 15-25ml de medio nuevo. Ambos Erlenmeyer fueron colocados en una cámara de cultivo y el crecimiento (biomasa) fue monitoreado en microscopio invertido.

### **4. 7. Protocolo para la detección de Microcistinas presentes en florecimientos cianobacterianos**

#### **4. 7.1. Bioensayos ratón**

##### **4.7.1.1. Preparación de los ratones**

Se seleccionaron ratones de la cepa N:NIH-S de 20-25g de peso. Durante el ensayo los animales tuvieron acceso a alimentos y agua. Fueron pesados y marcados debidamente (rayas en la cola) y todos los valores anotados en la tabla de registro.

#### 4.7.1.2. Inyección de los ratones

Células de Cyanobacteria liofilizadas (100 mg) fueron suspendidas en 10 ml de 0.9% NaCl y ensayadas para la toxicidad en bioensayos ratón. La inyección de cada muestra (presuntas cianotoxinas) se aplicó en horas de la mañana para observar continuamente cualquier síntoma o alteración del comportamiento del animal (dos ratones y uno como control). El volumen inyectado fue de 1ml vía intraperitoneal. Los ratones se observaron hasta 24 horas posteriores a su inyección y en caso de muerte se anotó la hora para luego someterlos a necropsia. Se estudiaron los órganos para detectar alteraciones (hígado hinchado/sanguinolento). Se pesaron y compararon los hígados con el control, registrando siempre todos los datos. Cuando el peso del hígado era mayor al 7% del peso total del ratón se consideró hepatotóxico. Cada hígado fue fijado en buffer formalina neutro 10% (V/V). Una sección de tejido fue cortado y teñido con haematoxilina y eosina para luego se observado en un microscopio.



Fig. 6: Técnica de inmovilización e inyección de un ratón

#### 4.7.2. Protocolo para la extracción detección y cuantificación de las cianotoxinas

##### a) En muestras de agua.

Para la extracción de toxinas, la conservación de la muestra es de fundamental importancia. La mayoría de las cianotoxinas son fotosensibles, por lo que las muestras fueron protegidas de la luz guardadas en freezer y envueltas en papel metálico.

Para detectar Microcistina (MC), las muestras de agua provenientes de los puntos de muestreo (Río de la Plata y lagunas) y de agua de la red de distribución de agua (5L) fueron sujetas a lisis mediante tres ciclos de congelado y descongelado que promueve la liberación de las toxinas intracelulares. Luego las muestras fueron filtradas para remover el material particulado por filtros Watman 0.2  $\mu$  mediante bomba de vacío. Luego los filtrados obtenidos fueron pasados a través de cartuchos Sep-Pak C18 ODS (Waters) para realizar la extracción en fase sólida. Las toxinas fueron luego eluidas con 80% metanol y analizadas cuantitativamente mediante un cromatógrafo líquido de alta presión HPLC de fase reversa con detector UV (HPLC-UV) (Shimadzu LC- 20A, SPD-M20A, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) con una columna C18 Thermo de 5- $\mu$ m poro, 150  $\times$  4.60 mm, (Hypersil-Keystone).

La columna fue equilibrada con una mezcla compuesta por 65% de solución A [0.05% (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) en agua] y 35% de solución B [0.05% (v/v) TFA en acetonitrilo]. La fase móvil consistió en gradiente discontinuo de solución A y B. La velocidad de flujo fue de 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. Se utilizaron Standards de MC-RR, MC-YR y MC-LR provenientes de Sigma (St Louis, MO, USA). MCs fue identificada sobre la base del tiempo de retención. La detección UV fue realizada a 238nm. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico HPLC.

#### **b) En células en cultivo**

Las células en cultivo fueron concentradas por centrifugación (10 min, 3000 x g) y luego liofilizadas para ser analizados cuantitativamente por HPLC- UV. La extracción de las toxinas fue realizada sobre 100 mg de células liofilizadas y luego extraídas con 10 ml of butanol/metanol/agua (5:20:75, v/v/v) y mantenidas por una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Luego los extractos fueron centrifugados, separado el sobrenadante y el remanente precipitado re-extraído. Los sobrenadantes se combinaron y se eluyeron a través de cartuchos pre-activados de Sep-Pak C18. Las toxinas se eluyeron con 80 % metanol y detectadas mediante un equipo HPLC -UV Shimadzu HPLC siguiendo el mismo procedimiento que el presentado en las muestras de agua

**5. ESTUDIO CUALI-CUANTITATIVO  
DE ALGAS FITOPLANCTONICAS EN  
LOS ESPACIOS MUESTREADOS**

## 5. 1. Breve descripción de los espacios muestreados

### 5.1.1. Río de La Plata.

El **Río de la Plata** es un estuario del Océano Atlántico en América del Sur formado por la confluencia de los ríos Paraná y Uruguay. Sirve de frontera, en todo su recorrido, entre la República Argentina y la República Oriental del Uruguay. Por su lado sureste desemboca en el Mar Argentino. Tiene forma de "muesca" triangular de 290 km de largo. La cuenca combinada del Río de la Plata y sus afluentes tiene una superficie de aproximadamente 3.200.000 km<sup>2</sup>. Es considerado por los países ribereños como el río más ancho del mundo (Lorenzini y col, 1997).

El Paraná presenta una descarga media anual de 16.000 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>, con un caudal máximo durante el otoño y mínimo en primavera y el Uruguay de 6.000 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>, con un máximo en invierno y mínimo en verano, aunque en realidad su régimen es altamente variable. Si bien existen otros ríos y arroyos que desaguan en el estuario, como por ejemplo el Luján, Reconquista y los ríos Salado y Samborombón en la bahía homónima, el caudal del Río de la Plata puede ser calculado como el resultado de la descarga de sus dos tributarios principales y se ha estimado un valor medio de 22.000 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> (Lasta y col, 2003).



La diferencia entre el período de máximo caudal (abril a julio) y el de mínimo (diciembre a marzo) es aproximadamente del 22%. Para altas y bajas excepcionales, los máximos y mínimos registrados en el

Río de la Plata (antes de la construcción de las numerosas represas de la cuenca) eran de 75.000 y 4500 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>.

El clima de la región donde se desarrolla la cuenca del río es templado y húmedo. Los vientos más fuertes son del Sur y los más débiles del NO. El viento Pampero, que sopla desde el SO, el del sudeste (sudestadas) y del SE-SSE, son los más típicos. Las sudestadas son los vientos más intensos: pueden alcanzar los 75 a 90 Km.h<sup>-1</sup>, causando crecidas e inundaciones sobre la costa bonaerense (Pereyra, 1999). Se ha determinado que vientos del SE de 20 a 50 Km.h<sup>-1</sup> pueden elevar el nivel del río en 1 m, y a la inversa, los vientos del O (Pampero) y del N pueden provocar importantes bajantes. El nivel del agua en el Río de la Plata también está influido por la proximidad del Océano Atlántico y su régimen de mareas. La pleamar astronómica que se produce cada 12 h. aproximadamente, eleva el nivel del agua con amplitudes que no superan el metro, variando comúnmente entre 0.46 y 0.52 m, lo que corresponde a un rango micromareal (Simionato y col, 2005).

La amplitud de la onda de marea, está influenciada por los vientos. La mayor parte del tiempo (el 67%), el nivel del agua se encuentra entre 0.30 y 1.29 m. Sin embargo, cuando soplan vientos de gran intensidad, se producen crecidas o bajantes, la máxima y la mínima registradas fueron de 4.06 m y de -4.16 m, respectivamente. Las olas más altas se encuentran en la parte exterior del río, alcanzando 0.60 m de altura y las más pequeñas hacia el interior con 0.30 m de altura. La costa argentina constituye una barrera de protección del oleaje que se propaga desde el exterior del río. Los vientos que causan el mayor oleaje son los provenientes del Este y en menor medida los del Oeste (AMBA, 2007).

Dada la importancia del agua para la vida humana y atendiendo los antecedentes bibliográficos descriptos en la introducción general del presente trabajo respecto a la proliferación de algas Cyanophyta en reservorios de aguas continentales, se consideró fundamental efectuar el estudio del perfil fitoplanctónico en el Río de la Plata dado que abastece de agua, entre otras, a las poblaciones de las ciudades de La Plata, Ensenada y Berisso para conocer la calidad del agua de este limnotopo.

Con este propósito se realizó el estudio taxonómico del fitoplancton y la evaluación de la abundancia relativa de cada taxón en este ambiente.

La ubicación de los tres puntos de muestreo en el Río de la Plata fueron: **Rotonda** de acceso (34°50'04''S y 57°52'41''O) es un punto recreacional de entrada al río; **Toma de Agua** de la planta potabilizadora Donato Gerardi (Ensenada, Argentina) (34°49'13''S y 57°57'49''O) que representa la calidad del agua sin tratar e **Isla Santiago** ubicada en las proximidades de la boca de acceso al puerto de La Plata (34°49'51"S y 57°56'50"O), aproximadamente distante unos 10 km de los puntos anteriores. En la Fig. 1 de la sección Materiales y Métodos se presenta la ubicación de cada uno de los tres puntos de muestreo.

### **5.1.2. Laguna Aeroclub y Laguna Salada**

Adicionalmente al Río de la Plata se tomaron muestras en las siguientes lagunas pertenecientes al Municipio de Ensenada: **laguna Aeroclub** (34°52'48''S, 57°57'37''O), **laguna Salada** (34°50'46''S, 57°57'23'').

La laguna de Aeroclub está ubicada sobre diagonal 74 (Av. Domingo Mercante), camino a la localidad de Punta Lara (Ensenada), a 150 mts del acceso a la Autopista Bs As-La Plata. Es un cuerpo de agua artificial muy profundo anegada desde hace más de 50 años. Es reconocida por su profundidad que varía entre 1.5m a más de 45 metros en algunos sectores. Abundan camarón, bagres, sábalos, tarariras, pejerrey chico, entre otras especies. En reiteradas oportunidades se ha descripto la presencia de peces muertos en la zona. La Laguna Salada se encuentra enfrente y comparte similares características a la del Aeroclub.

Sus suelos están constituidos por limos arcillo-arenosos y arcillas limo-arenosas, castaño claro a moderado, con algunos niveles gris amarillento. Presenta un aspecto compacto, con tramos afectados por edafización. Son frecuentes las zonas de edafización superpuestas, interrumpidas por la presencia de alguna capa de escaso espesor de sedimentos eólicos o acumulados en un medio ácuo (lacustre o fluvial). La Fig. 2 de la sección materiales y métodos presentan un mapa de ambas lagunas.

### **5.2. Estudio cualitativo de cianobacterias en muestras provenientes diferentes ambientes**

La observación de muestras al microscopio es de vital importancia para el reconocimiento e identificación de las cianobacterias presentes en cada cuerpo de agua. Esta metodología se caracteriza

por su relativamente bajo costo. No obstante, implica un importante entrenamiento en la identificación y disponer de bibliografía amplia y actualizada. Cabe destacar que, si bien el análisis de las características morfológicas permite la identificación de géneros y especies, este por sí solo no es suficiente para discriminar entre cepas toxígenas y no toxígenas. Para el diagnóstico de poblaciones productoras de toxinas se han desarrollado herramientas basadas en el conocimiento de la biología molecular, las cuales complementan a las técnicas microscópicas.

Según Komárek y Anagnostidis (1986, 1998, 2005) y Anagnostidis y Komárek (1988, 1989) las Cyanobacteria (en su concepto Cyanoprokaryota), se clasifican en 4 Ordenes: **Chlorococcales**, **Oscillatoriales**, **Nostocales** y **Stigonematales**, aunque recientemente las Stigonematales han sido incluidas en el **Orden Nostocales** (Hoffmann et al., 2005).

**Chroococcales:** talo unicelular o colonial; reproducción por división celular (endo o exosporas).

**Oscillatoriales:** talo filamentoso homocitineo; reproducción por hormogonios u hormocistos.

**Nostocales:** talo filamentoso heterocitineo, no ramificado o con ramificaciones (falsas o verdaderas); reproducción por hormogonios u hormocistos.

En estos tres ordenes, se encuentran especies mencionadas como toxígenas. Con estos criterios se investigaron los diferentes taxos presentes en los ambientes estudiados.

### **5.2.1. Cianobacterias halladas en muestras provenientes del Río de la Plata**

En la Fig. 2 se presentan imágenes de ejemplares del florecimiento ocurrido durante el mes de marzo de 2005 en el Río de la Plata, donde el taxón predominante fue *Microcystis* spp. Este género se caracteriza por:

Género colonial, típicamente planctónico. Colonias macro o microscópicas, esféricas, irregulares, alargadas, a veces constituido por agrupación de subcolonias, en algunas especies presencia de clatros. Envoltura mucilaginoso incolora, amplia o estrecha, difluente o firme, desde homogénea a lamelada. Células esféricas distribuidas irregularmente en el interior de la colonia, con aerótopos. División celular por fisión en tres planos perpendiculares. Reproducción por desintegración de las colonias. Planctónicas; forman floraciones acumulativas y evidentes como mancha de pintura y espumas.



**Fig. 2:** *Microcystis* spp encontrada en muestras del Río de la Plata.

<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cyanobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Chroococcales
<b>Familia</b>	Chroococcaceae
<b>Genero</b>	<i>Microcystis</i>
<b>Lugar de procedencia</b>	Isla Santiago
<b>fecha</b>	Marzo 2005
<b>Resolución</b>	10 X y 40X

En Argentina, este género fue citado en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, Mendoza, Misiones y Santa Fe. Las toxinas producidas por los miembros de este género son microcistinas (hepatotoxinas) y lipopolisacáridos (dermatotoxinas) y las especies mencionadas como tóxicas son: *M. aeruginosa*; *M. botrys*; *M. farlowiana*; *M. lamelliiformis*; *M. novacekii*, *M. viridis*; *M. wessenbergii* (Echenique y Aguilera, 2009).

La alta biomasa concentrada en las floraciones sumada a la presencia de las cianotoxinas puede representar un problema para los otros organismos del medio acuático y para el ser humano.

Dada la presencia de cepas de *Microcystis* spp., se podría pensar que alguna de las mismas sean toxicogénicas. Estas evaluaciones se presentan en el capítulo 6 de la presente tesis.

Adicionalmente, en el Río de la Plata se hallaron los siguientes organismos:

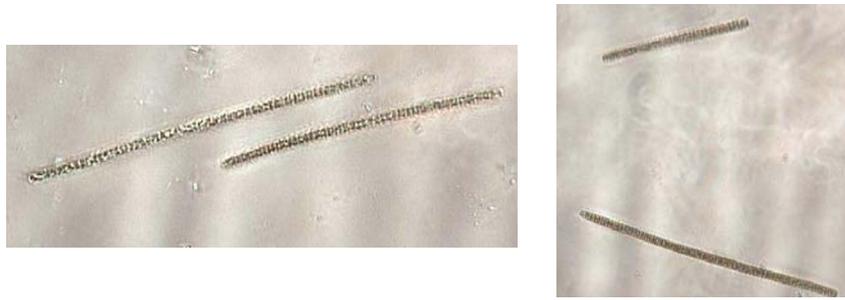


Fig. 3: Cianobacterias presentes en la estación de muestreo Toma de agua

<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cyanobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Oscillatoriales
<b>Familia</b>	Phormidiaceae
<b>Genero</b>	<i>Planktothrix</i>
<b>Lugar de procedencia</b>	Toma de agua
<b>fecha</b>	Diciembre 05
<b>Resolución</b>	10 X y 40X

Características del Género *Planktothrix* (*Oscillatoria* s pp.) Anagnostidis & Komárek, 1988

Tricomas rectos a ligeramente curvados, levemente constrictos o no a nivel de los tabiques y que se enangostan, o no, hacia el extremo, solitarios; vaina ausente u ocasionalmente muy fina. Células cilíndrico-discoideas hasta dolioliformes; las terminales con o sin caliptra o, con o sin engrosamiento apical. Con vacuolas gaseosas. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción por disgregación del tricoma a partir de necridios. Planctónicas Especies mencionadas como toxígenas: *P. agardhii* (Gom.) Anagnostidis & Komárek; *P. rubescens* (DeCandolle ex Gom.) Anagnostidis & Komárek.

Las toxinas mas conocidas son microcistinas y neurotoxinas (Echenique y Aguilera, 2009).

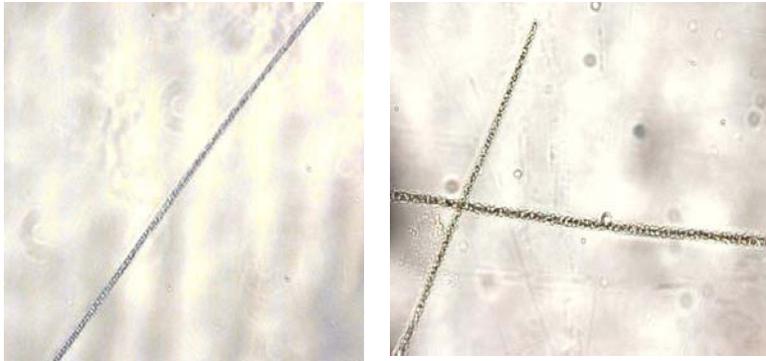


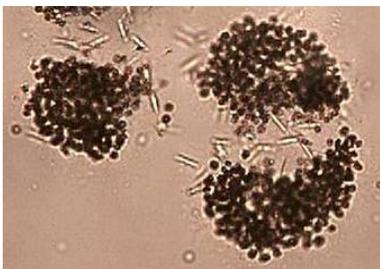
Fig. 4: Cianobacterias proveniente del punto de muestreo: Rotonda

<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cyanobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Oscillatoriales
<b>Familia</b>	Phormidiaceae
<b>Genero</b>	<i>Planktothrix</i>
<b>Lugar de procedencia</b>	Rotonda
<b>fecha</b>	Diciembre 05
<b>Resolución</b>	10 X y 40X

## 5.2.2. Estudio cualitativo de cianobacterias en muestras provenientes de las lagunas:

### 5.2.2.1. Laguna Aeroclub

Se pudo identificar las siguientes Cianobacteria



<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cyanobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Chroococcales
<b>Familia</b>	Chroococcaceae
<b>Genero</b>	<i>Microcystis</i>
<b>Lugar de procedencia</b>	Laguna Aeroclub
<b>fecha</b>	Junio 2005
<b>Resolución</b>	10 X

Fig. 5: Cianobacterias proveniente de la laguna Aeroclub (junio 2005)



<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cianobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Chroococcales
<b>Familia</b>	Chroococcaceae
<b>Genero</b>	<i>Microcystis</i>
<b>Lugar de procedencia</b>	Laguna Aeroclub
<b>fecha</b>	octubre 05
<b>Resolución</b>	10 X y 40X

Fig. 6: Cianobacterias proveniente de la laguna Aeroclub (octubre 2005)

### 5. 2. 2.2. Laguna Salada



<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cyanobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Nostocales
<b>Familia</b>	Nostocaceae
<b>Genero</b>	<i>Dolichospermum</i> (ex <i>Anabaena</i> )
<b>Lugar de procedencia</b>	Laguna Salada
<b>fecha</b>	Junio 05
<b>Resolución</b>	10 X y 40X

Fig. 7: Cianobacterias proveniente de la laguna Salada (junio 2005)

Las características típicas de *Dolichospermum* (ex *Anabaena*) son: talos microscópicos, filamentos generalmente aislados. Los tricomas pueden ser rectos, curvos o espiralados, isopolares, constrictos o no. Vaina mucilaginosa firme, hialina cuando está presente. Células redondeadas, elípticas o

cilíndricas. Las especies planctónicas presentan aerótopos. Heterocistos siempre intercalares, solitarios, o a intervalos regulares a lo largo del tricoma. Acinetos redondeados, elípticos, oblongos o cilíndricos.

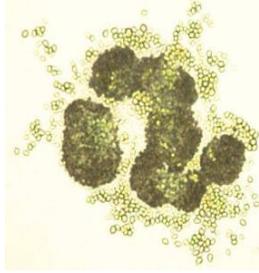
En Argentina, especies de este género fueron citadas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Misiones, Neuquén, Río Negro, Salta, San Luis y Santa Cruz. (Echenique y Aguilera, 2009).

Las toxinas descritas para los taxa pertenecientes al género *Dolichospermum* son péptidos (microcistinas) y alcaloides. Entre los alcaloides con propiedades neurotóxicas, se encuentran los más potentes, tales como anatoxinas *a*, anatoxinas *a(s)* y saxitoxinas. Las especies citadas como toxígenas son: *D. affinis*; *D. circinalis*; *D. flos-aquae*; *D. lemmermannii*; *D. planctonicum*; *D. spiroides*; *D. spiroides* var. *contracta* (Echenique y Aguilera, 2009).



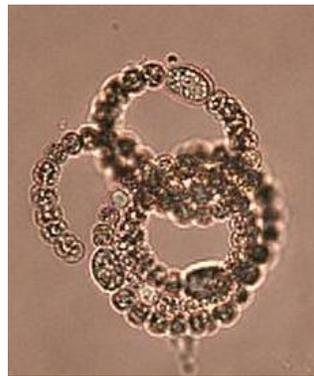
<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cyanobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Nostocales
<b>Familia</b>	Nostocaceae
<b>Genero</b>	Dolichospermum (ex Anabaena)
<b>Lugar de procedencia</b>	Laguna Salada
<b>fecha</b>	Agosto 05
<b>Resolución</b>	10 X y 40X

Fig. 8: Aislamiento de cianobacterias proveniente de la laguna Salada (agosto 2005)



<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cyanobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Chroococcales
<b>Familia</b>	Chroococcaceae
<b>Género</b>	<i>Microcystis</i>
<b>Lugar de procedencia</b>	Laguna Salada
<b>Fecha</b>	agosto 05
<b>Resolución</b>	10 X

Fig. 9: Aislamiento de cianobacterias proveniente de la laguna Salada (agosto 2005)



<b>Reino</b>	Monera
<b>División</b>	Cyanobacteria
<b>Clase</b>	Cyanophyceae
<b>Orden</b>	Nostocales
<b>Familia</b>	Nostocaceae
<b>Género</b>	<i>Dolichospermum</i> (ex <i>Anabaena</i> )
<b>Lugar de procedencia</b>	Laguna Salada
<b>Fecha</b>	Octubre 05

Fig. 10: Aislamiento de cianobacterias proveniente de la laguna Salada (octubre 2005)

Se observa que en los ambientes lénticos la mayor representatividad dentro de las cianobacterias, se centra en especies pertenecientes a los géneros *Microcystis* y *Dolichospermum*. Ello coincide con los géneros más comúnmente asociados con el desarrollo de floraciones tóxicas en nuestro país que son *Microcystis* y *Dolichospermum*, mientras que las cianotoxinas mayormente citadas son las microcistinas, quizás por ser las más estudiadas. Recientemente se detectó la presencia de neurotoxinas en muestras colectadas en el Río Salado (Provincia del Chaco), donde los géneros

predominantes fueron *Raphidiopsis*, *Planktothrix* y *Cylindrospermopsis* (Echenique y Aguilera, 2009).

### **5. 3. Aislamiento y cultivo de cianobacterias en floraciones de los cuerpos de agua estudiados.**

Entre los objetivos del presente trabajo de tesis se encuentra el aislamiento y cultivo de cianobacterias a partir de los florecimientos registrados.

En algunos de los episodios de florecimientos luego de la toma de muestra, la suspensión cianobacteriana experimentó un severo proceso de autólisis en el término de tres a cuatro horas, lo cual impidió efectuar el aislamiento y cultivo de las cianobacterias en medios corrientes de laboratorio tales como el Z8, utilizado para mantenimiento de cultivos de colección de microalgas. Para prevenir el proceso de lisis las muestras fueron procesadas inmediatamente de efectuada la toma de muestra.

Los cultivos se operaron en fase líquida y también solidificados mediante el agregado de agar-agar.

Los medios solidificados para el aislamiento no resultaron efectivos no lográndose aislar en medio sólido. Como consecuencia, se decidió trabajar en medios líquidos.

Las especies aisladas de episodios de floraciones, se cultivaron en medio de cultivo Z8 e incubadas a temperatura ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminación controlada ( $26\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Periódicamente se realizaron repiques en el medio Z8.

En la Fig. 11 se muestra un cultivo de *Microcystis aeruginosa* en medio Z8 proveniente de un florecimiento del Río de la Plata en marzo 2005.



Figura 11: Cultivo de *Microcystis aeruginosa* en medio Z8 proveniente de florecimientos del Río de la Plata.

Se logró poner en cultivo estirpes *Microcystis aeruginosa* aislada del ambiente. La evaluación de su toxicidad se presenta en el capítulo 6.

#### **5. 4. Estudio cuantitativo de los diferentes taxa hallados en el Río de la Plata.**

En la evaluación de presencia, densidad celular y potencial riesgo toxicológico de proliferaciones masivas de cianobacterias es imprescindible el diseño e implementación de un plan de monitoreo. El mismo implica la toma de muestras para análisis cualitativos y cuantitativos del fitoplancton, así como para la evaluación de toxicidad. Asimismo, es necesaria la determinación de parámetros complementarios tales como pigmentos fotosintéticos y parámetros físicos y químicos (nutrientes esenciales, pH, conductividad eléctrica, temperatura, etc.). Ello es foco de estudio en el capítulo 7.

En la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos del estudio taxonómico de algas fitoplanctónicas del monitoreo realizado en aguas continentales correspondientes a las muestras del Río de la Plata colectadas en la zona próxima a la toma de agua de la planta potabilizadora que abastece a las ciudades de La Plata, Ensenada y Berisso.

Durante el periodo de estudio, las *Cyanophyta* presentaron una alta concentración de células en las muestras del mes de septiembre, con niveles de  $81000 \text{ cel.ml}^{-1}$ . Por otra parte, se obtuvieron bajos recuentos en las muestras correspondientes al mes de julio con niveles de  $750 \text{ cel.ml}^{-1}$  mientras, que durante el mes de agosto no se observó la presencia de *Cyanophyta*.

Las especies del género *Microcystis* presentaron en altas densidades en marzo 2005, con  $51000 \text{ cel.ml}^{-1}$ , resultando este taxón quién representó el total de las *Cyanophyta* halladas. Asimismo, ello coincidió con un intenso florecimiento en la zona de muestra. Una fotografía perteneciente al florecimiento registrado en la estación de muestreo Toma de agua, se presenta en la Fig. 12.

De igual manera, en abril 2005 se observó otro florecimiento que coincidió con la presencia de peces muertos en la zona. En esta oportunidad, los recuentos de *Microcystis* spp. alcanzaron niveles de  $48900 \text{ cel.ml}^{-1}$ , resultando nuevamente el taxón que representó el total de las *Cyanophyta* halladas. Una fotografía del florecimiento en esta oportunidad se presenta en la Fig. 13.

Durante el monitoreo realizado en el presente trabajo se observó en octubre una baja concentración *Microcystis* spp. con niveles de 950 cel.ml<sup>-1</sup>. De igual manera, de julio a septiembre *Microcystis* spp. no fue detectada en nuestro estudio.



Fig. 12: Florecimiento observado en marzo 2005 en la estación de muestreo Toma de agua de la planta potabilizadora.



Fig. 13: Florecimiento observado en abril 2005 en la estación de muestreo Toma de agua de la planta potabilizadora.

Las *Chlorophyta* presentaron un mayor número de células en septiembre de 118200 cel.ml<sup>-1</sup>. En contraposición, durante el mes de febrero de 2006 presentaron una menor densidad de células de 150 cel.ml<sup>-1</sup>. Sin embargo, desde marzo hasta abril no se observaron células de *Chlorophyta*.

Por otro lado, las *Chrysophyta* mostraron altos recuentos celulares en enero (5940 cel.ml<sup>-1</sup>) y mayo (6000 cel.ml<sup>-1</sup>). Entre tanto, en marzo observamos una baja densidad celular, 300 cel.ml<sup>-1</sup> y además, no se observaron organismos pertenecientes a las *Chrysophyta*, desde agosto hasta octubre.

En nuestro estudio observamos una máxima densidad total del fitoplancton en septiembre con 199200 cel.ml<sup>-1</sup>, mientras que durante el mes de agosto se detectó un mínimo de 500 cel.ml<sup>-1</sup> en las muestras del Río de la Plata.

La variación de la densidad de células de cianobacterias y *Microcystis* spp en muestras del Río de la Plata se presentan en la Fig.14. Puede observarse que en octubre, el 5% de las *Cianobacteria* pertenecían al género *Microcystis*. De igual manera, observamos que el 100% de las cianobacterias detectadas en marzo de 2005, junio de 2005 y febrero de 2006 corresponden a *Microcystis* spp.

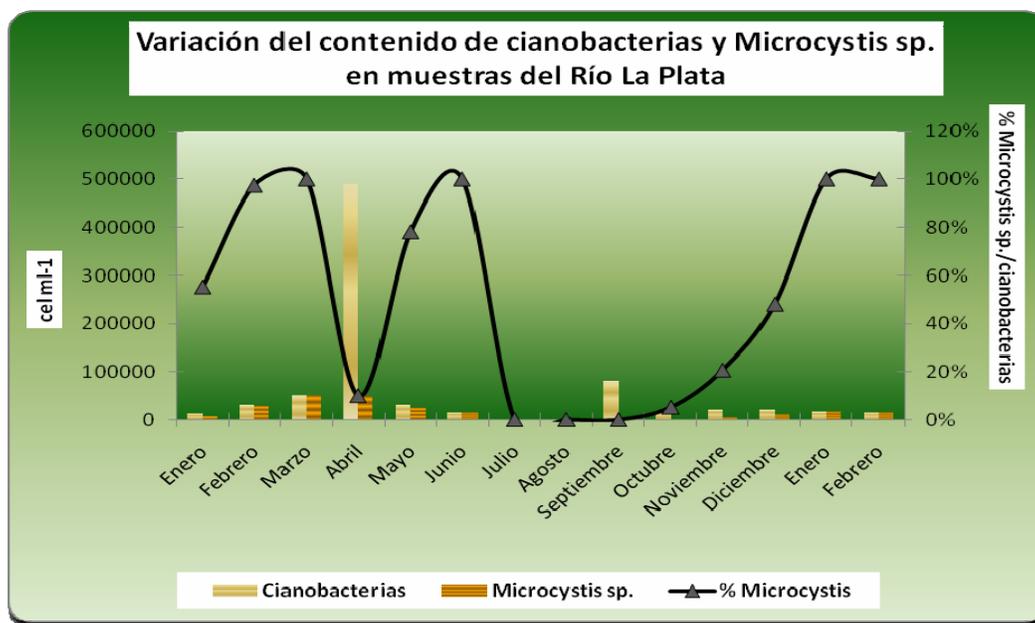


Fig. 14: Dinámica celular de las *Cianobacteria* y de *Microcystis* spp. en muestras del Río de la Plata (Toma de Agua).

La dinámica hídrica de este gran cuerpo de agua, al igual que la de varios de los que integran la cuenca, favorece el desarrollo de floraciones de cianobacterias las que son transportadas aguas abajo, hacia el Río de la Plata, donde encuentran condiciones ideales para que dicho fenómeno se magnifique aún más.

Una gran variedad de factores tales como luz, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, disponibilidad de nutrientes, velocidad de los vientos, dinámica hídrica, e incluso el impacto del zooplancton etc., han sido vinculados en forma contradictoria con el desarrollo de fitoplancton. Las condiciones ambientales requeridas para el desarrollo de florecimientos tóxicos son hasta ahora desconocidas. Sin embargo, las Cianobacteria, sean tóxicas o no, generalmente son favorecidas por condiciones tales como importante concentración del fósforo total, alta temperatura, alta estabilidad de la columna de agua, baja presión del pastoreo del zooplancton y baja relación nitrógeno a fósforo (N:P) (Paerl 1998, 1996, Hyenstrand et al., 1998).

Unos pocos estudios de campo han mostrado la prevalencia de las condiciones ambientales a ser relacionadas con la toxicidad del florecimiento en el agua, siendo estos contradictorios. La concentración de microcistina ha sido correlacionada positivamente con la radiación solar y la temperatura del agua, el fósforo total disuelto, el nitrógeno total y los nitratos (Kaebernick et al., 2001, Kotak et al., 2000 y Chrous et al., 1999).

Por otro lado, otros estudios no encontraron correlación entre microcistina versus temperatura del agua, correlación negativa con la radiación solar, fósforo o nitratos (Perona et al., 1998).

Por ello, en el presente trabajo de tesis se evaluó la variación de las condiciones ambientales dadas por la temperatura, el pH, la conductividad eléctrica, el contenido de hierro, el fósforo, el nitrato y la carga microbiana dada por las bacterias coliformes totales y fecales, durante el monitoreo y su influencia sobre el desarrollo de algas toxicogénicas. Este tema se desarrolla en el capítulo siguiente

**Tabla 1:** Variación del contenido de algas por familias presentes en muestras del Río de la Plata, (Toma de agua) en función del tiempo. Análisis taxonómico.

TAXA	2005												2006	
	Ene	Feb.	Mar	Abr.	Mayo	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Ene	Feb.
	cel.ml <sup>-1</sup>													
<b>CYANOPHYTA</b>														
<b>TOTAL</b>	13680	30800	51000	48900	32000	14850	750	0	81000	18500	20800	21675	17100	14700
<i>Microcystis</i> spp.	7560	30000	51000	48900	25000	14850	0	0	0	950	4300	10425	17100	14700
<b>CHLOROPHYTA</b>														
<b>TOTAL</b>	420	400	0	0	1250	450	300	500	118200	7800	2800	600	300	150
<b>CHRYSOPHYTA</b>														
<b>TOTAL</b>	5940	600	300	600	6000	2550	1850	0	0	0	5300	1125	5850	2850
<b>Total cel.ml<sup>-1</sup></b>	<b>20040</b>	<b>31800</b>	<b>51300</b>	<b>49500</b>	<b>39250</b>	<b>17850</b>	<b>2900</b>	<b>500</b>	<b>199200</b>	<b>26300</b>	<b>29300</b>	<b>23400</b>	<b>23250</b>	<b>17700</b>

**6. FACTORES QUE AFECTAN EL  
DESARROLLO DE  
CIANOBACTERIAS  
Y CIANOTOXINAS**

## **6. 1. Introducción**

El crecimiento de las cianobacterias y la producción de cianotoxinas frente diferentes variables ambientales así como a la disponibilidad de los nutrientes disueltos es otro aspecto que aún requiere investigación.

Como se mencionó anteriormente, para lograr una correcta evaluación de la ocurrencia de floraciones de cianobacterias y sus cianotoxinas se requiere implementar un monitoreo que incluya la observación del sistema a estudiar, la obtención de muestras para analizar los aspectos bióticos (ej. presencia de cianobacterias y toxinas) y el registro de variables abióticas relacionadas con el crecimiento de las cianobacterias (ej. temperatura, lluvia, nutrientes, etc).

En este sentido, el presente capítulo proponer realizar un monitoreo de las cianobacterias y cianotoxinas en los ambientes estudiados durante un año y determinar en forma conjunta los factores bióticos, abióticos y biológicos que pudieran ejercer efectos sobre el desarrollo de estirpes toxicogénicas.

Los puntos de muestreo son los descritos en la sección de materiales y métodos y corresponden a tres puntos sobre el Río de la Plata (Rotonda, Toma de agua e Isla Santiago) y en dos lagunas de la localidad de Ensenada (Laguna Aeroclub y Laguna Salada). A continuación se presentan los resultados obtenidos luego de un año de monitoreo. Se estudiaron la variación de la temperatura, el pH, la conductividad, el contenido de hierro, de fósforo, de nitrato, de nitrito, de coliformes totales y fecales, de Cianobacterias, de *Microcystis* spp., de clorofila y de toxina Microcistinas en función del tiempo.

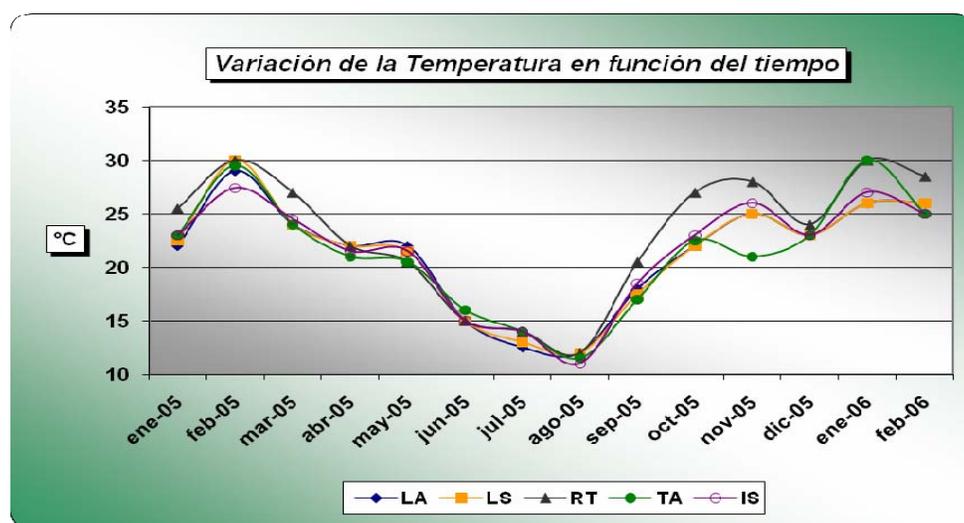
## **6.2. Variación de la temperatura en función del tiempo**

La medición de la temperatura es de fundamental importancia para la explicación de los fenómenos fisicoquímicos y biológicos que operan en aguas naturales. Las elevadas temperaturas que resultan de las descargas de agua caliente pueden tener un impacto ambiental significativo. Asimismo, un aumento de la temperatura produce una disminución de la solubilidad de los gases disueltos como el oxígeno (Bain y Stevenson, 1999).

Los resultados de la variación de temperatura en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 1. Una máxima temperatura de 30°C se observó en febrero del 2005 y en enero del 2006 mientras, la mínima temperatura osciló entre los 11° a 12°C en los meses de julio y agosto del 2005.

La temperatura de los puntos muestreados manifiesta diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) durante el periodo de estudio.

Según el análisis de varianza, Laguna Aeroclub no presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) ni con Toma de Agua, ni Isla Santiago en la temperatura, sin embargo si se observa variaciones significativas ( $p < 0.05$ ) en Laguna Salada y Rotonda.



**Fig. 1:** Variación de la temperatura en función del tiempo para cada punto de muestreo.

LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

Respecto a Laguna Salada, no muestra variaciones significativas ( $p < 0.05$ ) con Isla Santiago en la temperatura no obstante, reflejan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el resto de los puntos muestreados.

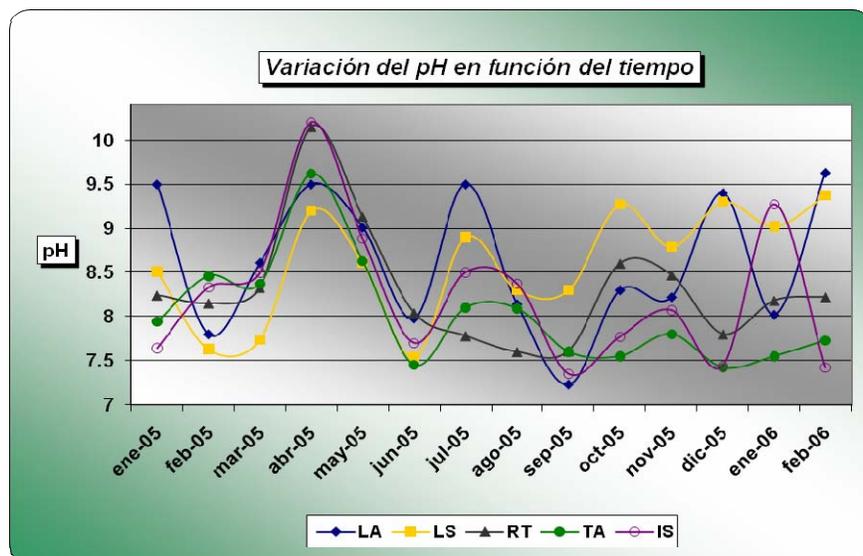
En el caso de Rotonda Punta Lara presenta diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con Laguna Aeroclub, Laguna Salada, Toma de Agua e Isla Santiago en la temperatura.

Conforme a los resultados del ANOVA, la temperatura promedio más alta se muestra en rotonda con 23.1°C contrario a Toma de Agua, quien refleja el promedio más bajo en temperatura con 21.3°C. En el anexo se presentan los resultados del ANOVA aplicado.

En nuestros resultados la temperatura presenta un valor medio de 20.8°C y un máximo de 30°C, si lo comparamos con los valores publicados por Amé et al. (2003) en lago San Roque (Córdoba, Argentina) que muestra un máximo de 29.1°C, veremos que solo presentan una diferencia del 2%. Las características térmicas del sistema en estudio son muy variables con el tiempo, así la temperatura está influenciada por la variación estacional y la dinámica del ecosistema.

### 6. 3. Variación del pH en función del tiempo

La medición de pH es una de las determinaciones más importantes y frecuentes en la química del agua. Prácticamente todas las fases del tratamiento de potabilización de las aguas de la cuenca como también de los tratamientos de depuración de efluentes cloacales e industriales dependen del pH (Nemerow, y Dasgupta, 1998). Los resultados de la variación de pH en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 2.



**Fig. 2:** Variación de pH en función del tiempo para cada punto de muestreo  
 LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

En la Fig. 2, se observa que el pH presentó un valor máximo de 10.20 en abril del 2005 en los siguientes puntos de muestreo: Isla Santiago y la rotonda; en cambio, en el mes de septiembre del 2005 se aprecia un pH mínimo de 7.23. De igual manera, en el mes de junio tendió a disminuir el pH en un rango de 7.45 a 8.00.

Entre las estaciones de muestreo, el pH mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por tal razón, se efectuó un LSD para determinar entre cuales existen tales diferencias. Toma de Agua mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el pH con el resto de las áreas evaluadas. Mientras, Laguna Aeroclub no presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el pH con Laguna Salada, Rotonda e Isla Santiago pero sí variaciones significativas ( $p < 0.05$ ) en Toma de Agua.

Acorde a los resultados del análisis de varianza, Laguna Aeroclub exhibe el promedio más alto en pH con 8.63 seguido por Laguna Salada con 8.61. Por otro lado, las muestras del punto de muestreo Toma de agua presentan el promedio más bajo de pH respecto a los otros puntos de muestreo, el cual fue de 8.02.

El Análisis de varianza efectuado al pH de cada área de estudio se puede observar en el anexo.

Amé et. al. (2003) en su estudio sobre florecimientos de cianobacterias en lago San Roque (Córdoba, Argentina) muestra un pH promedio de 8.23 y un máximo de 9.35 mientras que nuestros puntos de muestreo en el Río de la Plata (La Plata, Argentina) presentan un pH de 8.35 y un máximo de 10.20 es decir que nuestros niveles de pH respecto a los del Lago San Roque tienen una diferencia de 4%. Los resultados encontrados en las muestras del Río de la Plata resultaron ser diferentes a los presentados en el informe de la Calidad de Aguas de la Franja costera sur del Río de la Plata durante el periodo 1992-1995 donde informan que los valores de pH registrados se encuentran en el intervalo 7.00 a 7.40. Este informe corresponde a las Publicaciones del Consejo Permanente para el monitoreo de la calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (1997). El análisis de los valores de pH indica que el Río de la Plata ha aumentado el valor de pH máximo (máximo pH 10.20 en el período estudiado) respecto al valor informado de 7.40 encontrado en 1997.

Por último, debe mencionarse que los niveles guía de calidad en función de los distintos usos del recurso, le asignan al pH un rango de 6.50 a 8.50 para todo uso, con lo cual se concluye que el Río de

la Plata en determinados momentos, no cumple con los niveles guías de calidad de la Cuenca del Plata en el área de estudio.

#### 6. 4. Variación de la conductividad en función del tiempo

La conductividad es una medida de la capacidad de una solución acuosa de transportar la corriente eléctrica. Depende de la presencia de iones, de su concentración total de su movilidad y balance y de la temperatura de medición. Soluciones de compuestos orgánicos son relativamente buenas conductoras mientras que compuestos orgánicos que no se disocian en soluciones acuosas conducen muy poco la corriente eléctrica (Chang, 2003).

Los resultados de la variación de conductividad en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 3.

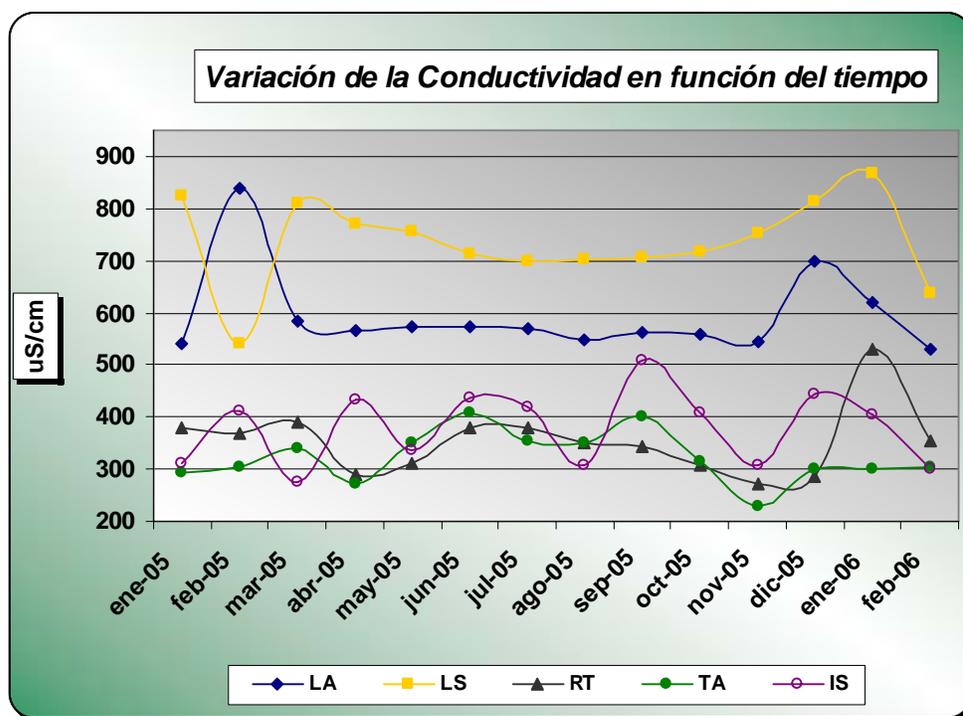


Fig. 3: Variación de la conductividad en función del tiempo para cada punto de muestreo

LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

Se registró una conductividad máxima de  $868 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  en Enero de 2006 y  $840 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  en febrero de 2005 en las lagunas de Salada y Aeroclub respectivamente. Entre tanto, en el mes de noviembre se aprecia una conductividad mínima de  $228 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

En el periodo de estudio se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la conductividad de las áreas muestreadas. Se efectuó un análisis de LSD para determinar las diferencias encontrando que, la conductividad de Rotonda no tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con la de Isla Santiago y Toma de agua. También, se evidenció que Laguna Aeroclub presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con los otros puntos muestreados.

Con relación a Laguna Salada, la conductividad presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con Laguna Aeroclub, Rotonda, Toma de agua e Isla Santiago. En cambio Toma de Agua mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con Isla Santiago, Laguna Salada y Laguna Aeroclub debido a que estos son diferentes puntos del Río de la Plata.

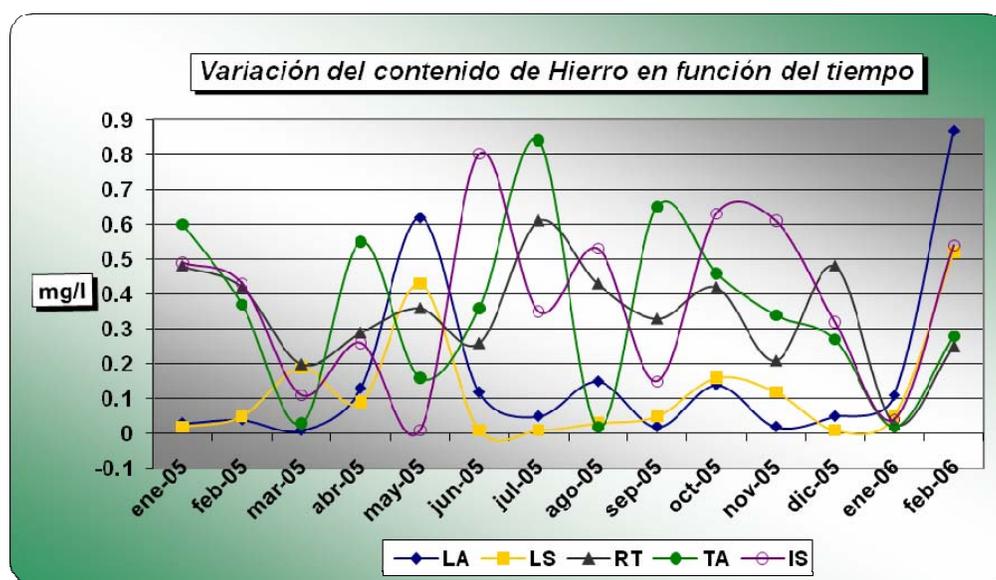
La mayor conductividad obtenida fue en Laguna Salada con un promedio de  $736.42 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  seguido por Laguna Aeroclub con  $593.85 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Por el contrario, Toma de Agua refleja la menor conductividad con un promedio de  $322.71 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . El anexo presenta los resultados del análisis de varianza practicado.

Los resultados encontrados en las muestras del Río de la Plata resultaron ser similares a los presentados en el informe de la Calidad de Aguas de la Franja costera sur del Río de la Plata durante el periodo 1992-1993 donde se detectaron valores medios de  $224 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  y un máximo de  $432 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  en las campañas 1992-1993, mientras que también presentó un valor máximo de  $1770 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  en la estación Santo Domingo en el año 1994/1995.

#### **6. 5. Variación del contenido de hierro en función del tiempo**

Es sabido que la producción de toxina por *Microcystis aeruginosa* está influenciada por condiciones de cultivo limitantes en determinados metales siendo asimismo dependiente de la luz. Lukac y Aegerter (1993) estudiaron la influencia de trazas de metales sobre el crecimiento y producción de toxina por *M. aeruginosa* y encontraron que el hierro tiene efecto sobre la producción de toxina, indicando que el contenido de toxina aumenta cuando la concentración de hierro decrecía. Sin

embargo, los estudios de Utkilen and Gjølme, 1995 contradicen los anteriores dado que *M. aeruginosa* creciendo en cultivo Bach en un medio conteniendo diferentes concentraciones de EDTA (la concentración de hierro decrece cuando la concentración de EDTA aumenta) encontraron que ambas relaciones: la cantidad de células/proteínas o la relación toxina/proteína eran reducidas al aumentar la concentración de EDTA. Estas discrepancias pueden ser debidas a las diferentes cepas empleadas en los estudios. Sin embargo, la producción de toxina en las cepas de *Microcystis* parece verse influenciadas de alguna manera por el contenido de hierro. Por ello es que el presente estudio ha considerado estudiar la variación de hierro en las muestras analizadas durante el período estudiado. Los resultados de las determinaciones de hierro en los distintos puntos de muestreo durante el periodo de estudio presentan en la Fig. 4.



**Fig. 4:** Variación del contenido de hierro en función del tiempo para cada punto de muestreo  
 LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

En la Fig. 4 se observan picos altos de 0.87 mg de  $\text{Fe.L}^{-1}$  en febrero de 2006 y 0.84mg de  $\text{Fe.L}^{-1}$  en julio de 2005. En tanto picos bajos de 0.01mg de  $\text{Fe.L}^{-1}$  se evidencian en los meses de marzo, mayo, junio y diciembre de 2005.

Los puntos de muestreo presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de hierro según el ANOVA. A través del LSD, se detecto que entre Laguna Aeroclub y Laguna Salada no hay

diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de hierro pero ambas difieren del resto de las áreas evaluadas. Las muestras de la Rotonda no presenta diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con Toma de Agua e Isla Santiago en los niveles de hierro y entre los últimos puntos de igual manera no se observan variaciones significativas ( $p < 0.05$ ).

En consonancia con los resultados del ANOVA, Laguna Salada presentó el menor contenido de hierro  $0.12 \text{ mg.L}^{-1}$  durante el periodo de estudio e Isla Santiago con  $0.38 \text{ mg.L}^{-1}$  de Fe muestra el mayor valor promedio.

El Análisis de varianza del contenido de Hierro de cada área de estudio se puede observar en el anexo. En las áreas evaluadas los niveles de hierro presentaron un promedio de  $0.27 \text{ mg.L}^{-1}$  y un máximo de  $0.87 \text{ mg.L}^{-1}$ . Entre tanto, en el lago San Roque (Córdoba, Argentina) se encuentran valores medios de  $0.10 \text{ mg.L}^{-1}$  y un máximo de  $0.54 \text{ mg.L}^{-1}$  lo que indica una diferencia del 23% en ambos reservorios.

Los valores guías tomados de Secretaría de Recursos Hídricos 1992, para calidad de agua destinados a provisión de agua son de  $0.20 \text{ mg.L}^{-1}$  como valor máximo y de  $0.10 \text{ mg.L}^{-1}$  como límite recomendado. Ello indica que en todos los ambientes muestreados, la mayoría de los muestreos exceden los máximos tolerables.

## **6. 6. Nutrientes**

Se denominan nutrientes a aquellas especies inorgánicas disueltas en el agua que sirven como alimento a los primeros eslabones de la cadena alimentaria, tales como las algas unicelulares. Los más importantes son iones derivados de la descomposición de la materia orgánica y aportes inorgánicos (Margalef, 1983). La descomposición de la materia orgánica por bacterias proteolíticas, producen amoníaco (amoniación); a su vez el grupo de de bacterias autótrofas del tipo de las nitrosomonas convierten amoníaco o al ión amonio en nitrito. Un segundo grupo de bacterias autotrofas (nitrobacterias) convierten el nitrito en ión nitrato. Todos estos cambios corresponden a procesos de oxidación (Herrero et. al, 2001). El nitrito es la especie química del nitrógeno que usualmente se halla en cantidades muy pequeñas en aguas superficiales. Este ión es muy inestable en presencia de oxígeno. Su presencia en concentraciones relativamente elevadas indica procesos biológicos activos influenciados por la contaminación orgánica.

El nitrato es la principal forma del nitrógeno inorgánico que se halla en aguas naturales. Este ión altamente soluble es la forma más estable y representa el estado de oxidación mayor del nitrógeno y sus compuestos.

Los niveles guías de estos nutrientes para uso I (aguas destinadas para consumo humano con tratamiento convencional según los Niveles Guía de la Cuenca del Plata dado por la Secretaria de Recursos Hídricos de la Cuenca del Plata (1992) son:

Nitrito: máximo  $0.10 \text{ mg.L}^{-1}$  como  $\text{N-NO}_2^-$

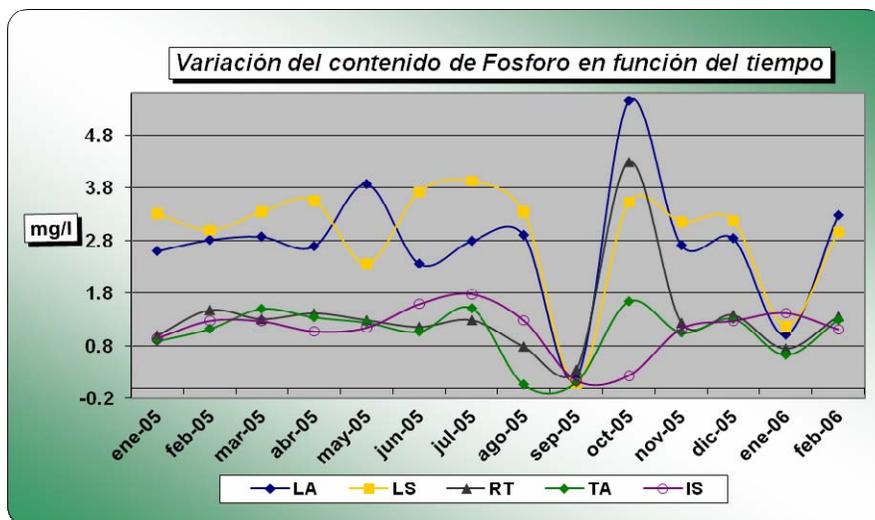
Nitrato: Máximo  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  como  $\text{N-NO}_3^-$

Al considerar los nutrientes del fósforo, solo se hace mención en general a su forma mas soluble, el ión fosfato que normalmente se encuentra en cantidades apreciables (Holtan y col, 1988). Las principales fuentes de fósforo son los desechos cloacales, industriales y drenajes agrícolas de tierras fertilizadas característica que comparte con los nutrientes del nitrógeno (Pedrozzo y col, 1991).

#### **6. 6. 1. Variación del contenido de fósforo total en función del tiempo**

Los resultados de la variación de fósforo en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 5.

El aumento del fósforo es considerado un marcador confiable del estado trófico de una ecosistema acuático debido a que se halla estrechamente relacionado a las floraciones algales (Meichtry y col. 2007). Sin embargo, los lagos eutróficos responden lentamente o fallan en responder a una disminución en la entrada de fósforo debido a procesos químicos internos del lago. La eutrofización puede estar relacionada a alteraciones en el ciclo del fósforo (Carpenter et al. 1998).



**Fig. 5:** Variación del contenido de fósforo total en función del tiempo para cada punto de muestreo LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

La Fig. 5 en el punto de muestreo Toma de agua, muestra altos niveles de fósforo total en Octubre de 2005 ( $1.78\text{mg.L}^{-1}$ ) y bajos niveles de fósforo total en agosto ( $0.02\text{mg.L}^{-1}$ ) y septiembre ( $0.03\text{mg.L}^{-1}$ ) de 2005. Estos niveles son comparables a los registrados en el informe de la Calidad de aguas de la franja costera sur del Río de la Plata durante el periodo 1992-1993 donde detectan valores de  $1.30$  a  $1.70\text{mg.L}^{-1}$  en la salida de los arroyos Sarandí y Santo Domingo respectivamente. Según este informe, en las zonas del Río de la Plata, la distribución de contaminantes provenientes de las descargas cloacales permite observar un desplazamiento de las plumas de distribución de contaminantes que se desplazan hacia el sur aguas adentro. Asimismo, el contenido de fósforo total promedio en nuestros puntos de muestreo en el Río La Plata (La Plata, Argentina) fue de  $0.62\text{mg.L}^{-1}$  con un máximo de  $1.78\text{mg.L}^{-1}$ .

Por otra parte, los niveles de fósforo obtenidos en la laguna Aeroclub permiten observar los valores más altos de fósforo, siendo mayores a  $4.80\text{mg.L}^{-1}$ . Esto indica un ambiente hipertrófico típico de una laguna.

Los niveles de fósforo en los puntos de muestreo presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el periodo de estudio. En base a los resultados obtenidos, se realizó un LSD detectándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre Laguna Aeroclub con Rotonda, Toma de Agua y Isla Santiago.

En el caso de Laguna Salada, se presenta el mismo comportamiento en los niveles de fósforo que en Laguna Aeroclub y entre ambos puntos de muestro no se muestran variaciones significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de Fósforo. También en el análisis de varianza, se observa que entre La Rotonda con la Toma de Agua e Isla Santiago no se exponen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de Fósforo.

Asimismo, los valores de fósforo total publicados por Amé et al (2003) en el lago San Roque (Córdoba, Argentina) presenta un pico máximo de  $2.39 \text{ mg.L}^{-1}$  lo que equivale un 13% de diferencia respecto a los niveles de fósforo total obtenidos en nuestro estudio.

En proporción con los resultados del ANOVA, Toma de Agua manifiesta el menor promedio de fósforo ( $0.31 \text{ mg.L}^{-1}$ ) respecto al resto de las áreas evaluadas. Mientras, Laguna Salada con  $0.946 \text{ mg.L}^{-1}$  de fósforo, muestra el promedio más alto.

El Análisis de varianza del contenido de fósforo en cada área de estudio se aprecia en el anexo.

Asimismo, es posible calcular el índice de estado trófico que corresponde al dado por

Índice de Estado Trófico de Carlson (1977) o TSI (Trophic State Index)

$$\text{TSI (Fósforo total)} = 10 \times \left( (2.46 + \frac{6.68 + 1.15 \ln \text{Pt}^*}{\ln 2.5}) \right)$$

donde  $\text{Pt} = \text{Fósforo total (mg.L}^{-1})$

Para las muestras tomadas en los diferentes sitios considerando el rango de los valores hallados de fósforo durante el monitoreo, podemos calcular el rango del índice trófico para cada ambiente.

Los ambientes se caracterizan por tener elevadas concentraciones de fósforo total en niveles de  $0.80 - 4.80 \text{ mg L}^{-1}$ , a partir del cual el cálculo de TSI arrojó valores que varían entre  $77 - 119 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabla 1) que superan ampliamente el límite sugerido de TSI de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

De acuerdo a los valores que alcanza el TSI podemos diferenciar cuatro categorías: Oligotrófico ( $\text{TSI} < 30$ ), Mesotrófico ( $30 < \text{TSI} \leq 60$ ), Eutrófico ( $60 < \text{TSI} < 90$ ), Hipereutrófico ( $\text{TSI} > 90$ ) Carlson (1977).

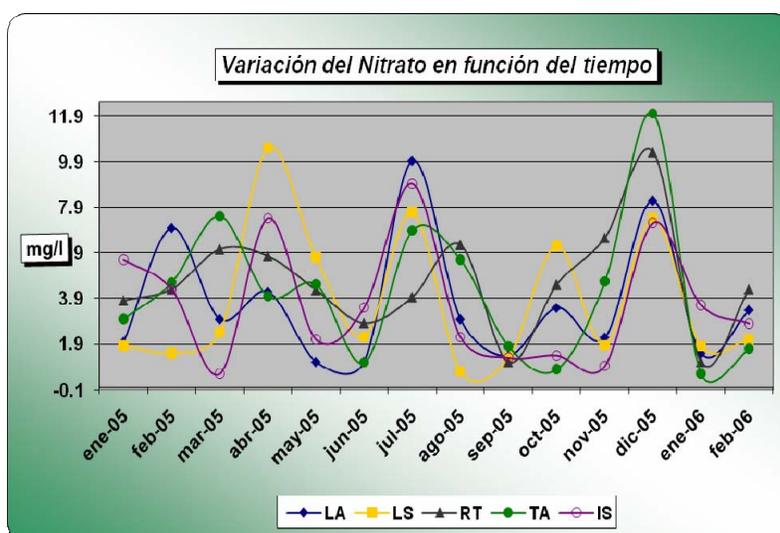
**Tabla 1: Valores del Índice de Estado Trófico de Carlson (1977) o TSI para los diferentes ambientes estudiados.**

<i>Sitios de muestreo</i>	<i>Fosforo total (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>TSI (mg.L<sup>-1</sup>)</i>
<b>Laguna Aeroclub</b>	0.2-4.8	<b>77-119</b>
<b>Laguna Salada</b>	0.2-3.8	<b>77-117</b>
<b>Rotonda</b>	0.2-3.0	<b>77-114</b>
<b>Toma de agua</b>	0.2-1.70	<b>77-106</b>
<b>Isla Santiago</b>	0.2-0.8	<b>77-97</b>

Podemos considerar que todas las muestras analizadas se encuentran en estado que varían entre eutrófico a hipóereutrófico según el período estudiado.

### 6. 6. 2. Variación del contenido de Nitrato en función del tiempo

Los resultados de la variación del nitrato en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 6.



**Fig. 6:** Variación de nitrato en función del tiempo para cada punto de muestreo

LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

En la Figura 6, se observa que el nitrato presentó un valor máximo de  $12 \text{ mg.L}^{-1}$  en diciembre de 2005 en tanto, en el mes de marzo de 2005 y enero de 2006 se aprecia un mínimo de  $0.6 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitratos. De igual manera, en agosto de 2005 se obtuvo bajas concentraciones de nitrato de  $0.7 \text{ mg.L}^{-1}$ .

El análisis de varianza que se detalla en el anexo señala que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de  $\text{NO}_3$  entre las áreas muestreadas durante el tiempo de estudio.

Para el caso de las muestras correspondientes a la toma de agua, los niveles encontrados alcanzaron niveles máximos de  $11.9 \text{ mg.L}^{-1}$  siendo estos concordantes con los registrados en el informe de la Calidad de aguas de la franja costera sur del Río de la Plata durante el periodo 1992-1993. Sin embargo, el valor de  $11.9 \text{ mg.L}^{-1}$  sobrepasa los niveles dados para aguas destinadas para consumo humano con tratamiento convencional según los Niveles Guía de la Cuenca del Plata que establece un máximo de nitrato de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  como  $\text{N/NO}_3^-$ .

Según la ocurrencia de nitratos en aguas dulces superficiales del territorio argentino, los datos correspondientes a muestras de ríos Paraná, Uruguay, Paraguay y Río de la Plata, Período 1987-96 correspondientes a 289 datos informados, se registraron valores entre  $0.05 - 10.08 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ . En el lago San Roque (Córdoba, Argentina) los estudios de Ame y col., 2003 informan un máximo de  $6.33 \text{ mg N-NO}_3$  siendo estos valores menores a los datos encontrados en las áreas muestreadas en nuestro estudio.

### **6. 6. 3. Variación del contenido de Nitrito en función del tiempo**

Los resultados de la variación del nitrito en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 7.

La Fig. 7, muestra en el mes de abril de 2005 un nivel máximo de  $0.62 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^-$  correspondiente al punto de muestreo de Isla Santiago. Asimismo, Laguna Aeroclub presenta también valores máximos de  $0.55 \text{ mg.L}^{-1}$  en febrero 2005 no siendo ello sorprendente debido a que en reiteradas oportunidades se ha visto a camiones de descargas cloacales realizar vertidos de estos efluentes en la laguna. Existe informes que indican la existencia de descargas cloacales ilegales registradas periódicamente en la zona (CEAMSE, 1993 y Flory, 1997).

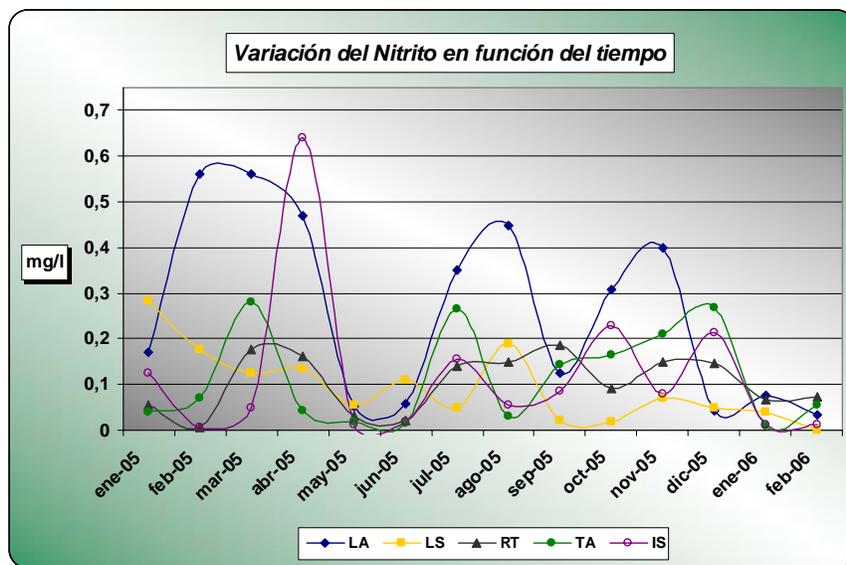


Fig. 7: Variación del contenido de nitrito en función del tiempo para cada punto de muestreo  
 LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

Luego de un año (febrero de 2006), se aprecia un mínimo de  $0.001 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^-$ .

Según ANOVA el contenido de  $\text{NO}_2^-$  presenta diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las áreas evaluadas. Con LSD se detectó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los niveles de  $\text{NO}_2^-$  entre Laguna Aeroclub y el resto de las áreas.

La variación estacional fue importante durante el monitoreo realizado, observándose menor concentración de nitrito en Laguna Salada con valor medio de  $0.09 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^-$ . Como se describió anteriormente, la mayor concentración de  $\text{NO}_2^-$  se obtuvo en Laguna Aeroclub, con un valor promedio de  $0.26 \text{ mg.L}^{-1}$ . Estos valores resultan ser concordantes con los registrados en el informe de la Calidad de aguas de la franja costera sur del Río de la Plata durante el periodo 1992-1993. Los valores hallados no sobrepasan los niveles dados para aguas destinadas para consumo humano con tratamiento convencional según "Niveles Guía de la Cuenca del Plata" que establece un máximo de nitrito de  $0.10 \text{ mg.L}^{-1}$  como  $\text{NO}_2^-$ .

La ocurrencia de nitritos en aguas superficiales del territorio argentino según datos correspondientes a muestras de los ríos Paraná, Uruguay, Paraguay y Río de la Plata, periodo 1988-95 se encontró niveles de  $\text{N-NO}_2^-$  en el rango entre  $< 0.005 - 9.58 \text{ mg.L}^{-1}$  según informes de Agua Superficial, 1999b.

En el lago San Roque (Córdoba, Argentina) los estudios de Ame y col., 2003 informan un valor máximo de  $0.16\text{mg.L}^{-1}\text{NO}_2^-$  siendo menores a los registrados en el presente trabajo, presentado una diferencia del 66% con los valores obtenidos en nuestro estudio.

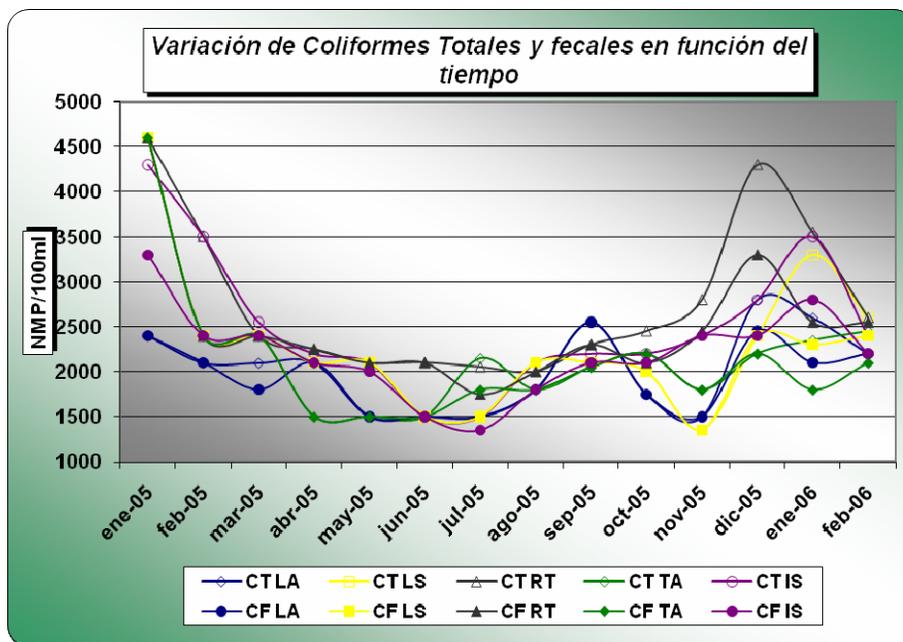
### **6. 7. Variación del número de Coliformes totales y fecales en función del tiempo**

Las características microbiológicas de las aguas tienen importancia en la salud pública y en el medio ambiente. Los aportes cloacales e industriales al cuerpo receptor, determinan el grado de riesgo bacteriológico de las aguas (Martín y Pila, 2007, Vargas et al, 1996).

Los resultados de la variación del número de coliformes totales y fecales en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 8. Los resultados se informan en NMP/100 ml siendo NMP (Numero Más Probable).

La Fig 8 muestra altos recuentos de coliformes totales en enero (4600 NMP/100ml) y diciembre (4300 NMP/100ml) de 2005. De igual manera, en enero de 2005 se observa un alto número de coliformes fecales (4600 NMP/100ml). Por el contrario, en noviembre de 2005 se observó el pico más bajo de coliformes con 1350 NMP/100ml seguido por 1500 NMP/100ml de abril a julio de 2005. Similares resultados fueron encontrados en el trabajo de Pérez y col. (1993) donde se informó niveles de coliformes totales entre 500-22000 NMP/100ml y de coliformes fecales 100-7000 NMP/100ml en muestras tomadas en las costas de la ciudad de La Plata en el año 1993.

En el presente estudio, se obtuvo un valor promedio de 2200 NMP/100ml de coliformes totales mientras que Amé et al (2003) en lago San Roque (Córdoba, Argentina) indica valores medio de coliformes totales de 15330 NMP/100ml con un máximo de 240000 NMP/100ml. Nuestros resultados son 52 veces menor a los reportados en lago San Roque (Córdoba, Argentina).



**Fig. 8:** Variación del número de coliformes totales y fecales en función del tiempo para cada punto de muestreo. LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

En el presente trabajo los coliformes fecales presentaron un promedio de 2169 NMP/100 ml y un máximo de 4600 NMP/100ml en las área muestreadas mientras que los resultados informados en el lago San Roque (Córdoba, Argentina) informan valores máximos de 28000 NMP/100 ml de coliformes fecales, es decir, que el número de coliformes fecales documentados en la lago San Roque corresponde a 6 veces mayor a nuestros resultados.

En el periodo de estudio, los coliformes totales y fecales presentaron diferencias significativas entre las áreas evaluadas. Con LSD se detectó que el recuento de coliformes totales de Laguna Aeroclub presenta diferencias con Rotonda e Isla Santiago más sin embargo, entre estas dos áreas no se exhibían diferencias.

Laguna Salada no manifestó diferencias en el número de coliformes totales con la Laguna Aeroclub y Toma de agua.

Según LSD, Laguna Aeroclub no presento diferencias significativas en el recuento de coliformes fecales con Laguna Salada, Toma de Agua e Isla Santiago. De igual manera, Laguna Salada no fue

distinta a Rotonda, Toma de Agua en el contenido de dichas bacterias pero Rotonda si muestra diferencias con Toma de agua e Laguna aeroclub.

De acuerdo a los resultados del ANOVA, Rotonda muestra el recuento de coliformes totales más alto con 2785 NMP/100ml y de fecales con 2489 NMP/100ml. Por el contrario, Laguna Aeroclub refleja el promedio de coliformes totales más bajo con 2029 NMP/100ml y de fecales con 1946 NMP/100ml.

En el anexo se presentan los resultados del ANOVA aplicado.

Asimismo, el análisis de la presencia de *Escherichia coli* determinó que el 83 % de las muestras analizadas eran positivas en la tipificación de esta bacteria. Se aisló *E. coli* en todos los meses estudiados a excepción de junio y agosto. Lo anterior indica que el Río de la Plata es un reservorio de calidad deficiente en su aspecto sanitario ya sea para ser utilizado como recreacional o como fuente de agua para ser potabilizada.

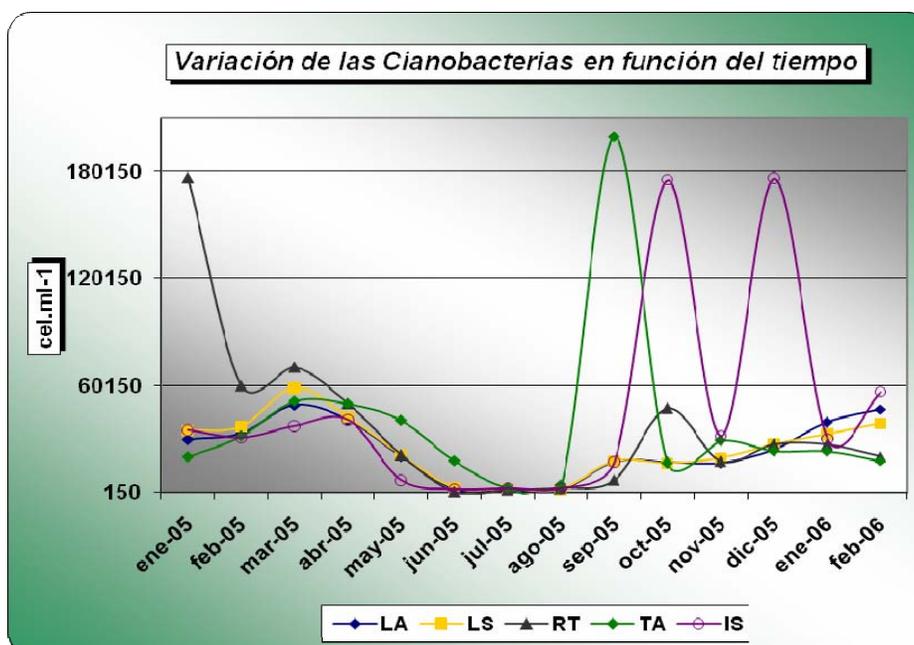
Los niveles guía de la Secretaría de Recursos Hídricos (1992) para aguas recreativas para contacto directo indican que los coliformes totales deben ser menores a 1000 NMP/100 ml y los coliformes fecales menores a 200 NMP/100 ml. Estos valores coinciden con los estándares internacionales habitualmente aplicados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS): Colifomes fecales NMP menor a 1000/100ml o los de la Unión Europea: NMP menor a 2000/100ml. Los valores guías para aguas recreacionales publicados por Canadian Council of Resources and Environment Ministres indican que la media geométrica de coliformes fecales en no menos de 5 muestras tomadas en un periodo de 30 días debe ser menor que 200 microorganismos/100 ml.

La media geométrica de coliformes totales y fecales en las muestras analizadas en el presente trabajo fue de 2208 y 2156 NMP/100ml respectivamente. Estos valores exceden ampliamente los valores guías, sin embargo la interacción entre los microorganismos y el hombre depende de numerosos factores que harían de ser considerados; así los valores de referencia puedan variar en diferentes áreas geográficas. Asimismo, es conveniente remarcar la importancia de un adecuado tratamiento de los efluentes domiciliarios a ser vertidos al río y a las lagunas para disminuir los riesgos para la población.

#### **6. 8. Variación del número de Cianobacteria en función del tiempo**

Los resultados de la variación del número de Cianobacteria en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 9.

En la Fig. 9, se observa un alto contenido de Cianobacteria en septiembre de 199200 cel.ml<sup>-1</sup> en el punto de muestreo correspondiente a la toma de agua. También, se observan picos altos de 175850 cel.ml<sup>-1</sup> de cianobacterias en enero, octubre y diciembre de 2005 en los diferentes puntos de muestreo siendo el más afectado el correspondiente a Isla Santiago. En tanto, en el mes de junio hay un número inferior de cianobacterias de 200 cel.ml<sup>-1</sup>, al igual que de julio a agosto con 1862 cel.ml<sup>-1</sup>.



**Fig. 9:** Variación del número de Cianobacteria en función del tiempo para cada punto de muestreo. LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

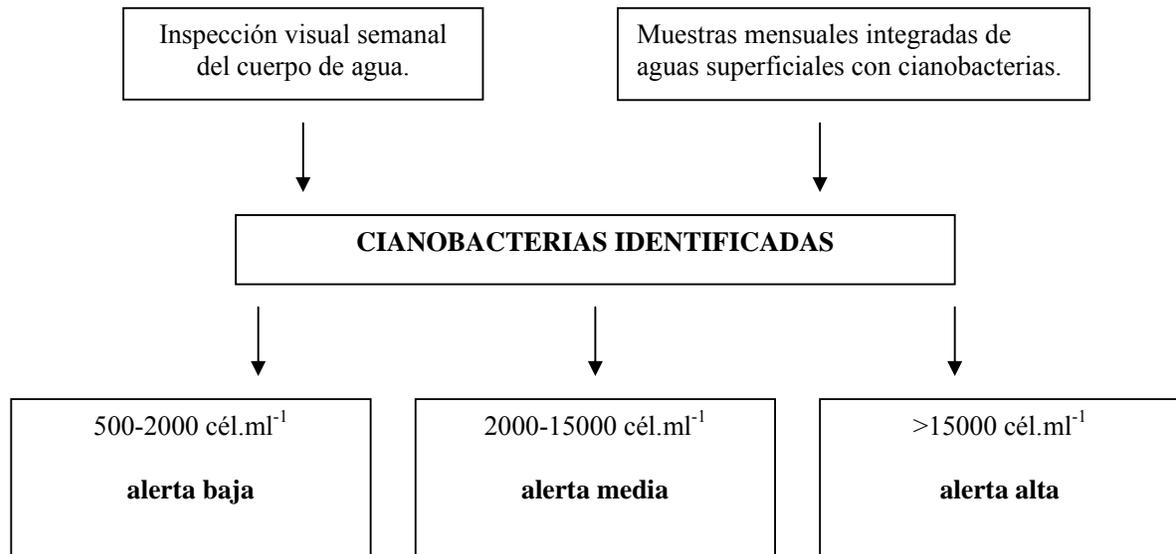
Según el análisis de varianza entre las áreas muestreadas no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el contenido de cianobacterias en nuestros puntos de muestreo.

Los resultados del ANOVA de las cianobacterias para cada área de estudio se señalan en el anexo. La Fig. 10 muestra un florecimiento observado en la isla Santiago en diciembre 2005.



Fig. 10. Florecimiento en Isla Santiago, dic. 2005

Para cianobacterias totales existe una Guía para la práctica segura en el manejo de aguas recreativas dada por Chorus y Bartram 1999.



**Alerta Baja** corresponde a 500-2000 cel.ml<sup>-1</sup>: En estas concentraciones las algas normalmente no serían visibles. Aunque existe la posibilidad de un desarrollo rápido de floración, si las condiciones siguen siendo favorables. En el extremo superior de este rango de algunos géneros de algas azul-verdes pueden afectar el sabor y olor del agua.

**Alerta Media** corresponde a 2000-15000 cel.ml<sup>-1</sup>: Estos números indican que las algas verde azules se pueden multiplicar y el agua puede tener color verdoso y sabor a moho u orgánicos y presencia de olor. Las espumas pueden estar presentes en concentraciones de más de 5 000 cél/ml. La Unidad de Salud Pública local debe ser notificada por el oficial encargado de suministros de agua para uso doméstico si los recuentos de células superior a 2 000 cél/ml y si el agua es usada para consumo humano.

**Alerta alta** corresponde a más de 15000 cel.ml<sup>-1</sup>: La toxicidad es asumida y el agua se presume no apta para el contacto humano o doméstica. El agua es generalmente de color verde con un fuerte olor y sabor a humedad y olor orgánico. Las espumas pueden estar presentes y se movilizan de acuerdo a la dirección del viento.

De acuerdo a lo anterior los resultados encontrados en el presente trabajo de tesis indican que los niveles de cianobacterias en los diferentes ambientes superan ampliamente los niveles de alerta alta fundamentalmente en períodos de temperaturas elevadas.

#### **6. 8. 1. Variación del número de *Microcystis aeruginosa* en función del tiempo**

Durante el verano de 1999, un florecimiento de *Microcystis aeruginosa* fue observado en la costa Uruguaya del Río de la Plata cerca de la ciudad de Colonia (De Leon & Yunes, 2001). Florecimientos de Cianobacterias en las costas argentinas del Río de la Plata así como identificación de las toxinas no fueron descriptas hasta 2007 por el grupo de trabajo de esta tesis (Andrinolo y col, 2007). No existe en bibliografía más datos de recuento de células de *Microsystis aeruginosa* en el Río de la Plata.

Los resultados de la variación del número de *Microcystis* spp, en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 11.

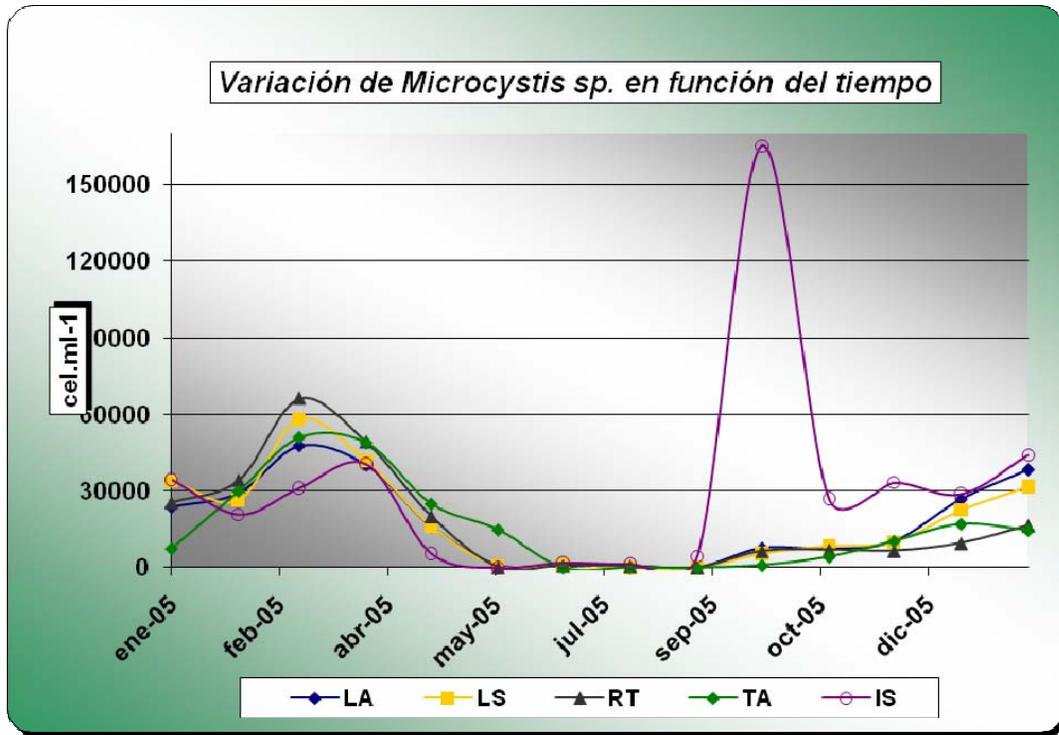


Fig. 11: Variación del número de *Microcystis aeruginosa* en función del tiempo para cada punto de muestreo. LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

Se observa que la presencia de *Microcystis aeruginosa* fue nula de Junio a septiembre de 2005. Entretanto, un número alto de  $165000 \text{ cel.ml}^{-1}$  de *Microcystis aeruginosa* se detecta en octubre del mismo año en Isla Santiago. De acuerdo al análisis de varianza, existen diferencias significativas durante el periodo de estudio pero no entre las áreas evaluadas. Un detalle de la colonia de *Microcystis aeruginosa*, se presenta en la Fig. 12

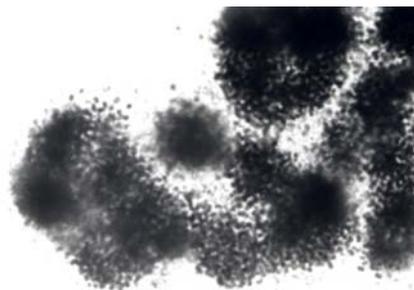


Fig. 12: Detalle de colonia de *Microcystis aeruginosa* encontrada en la zona de Isla Santiago

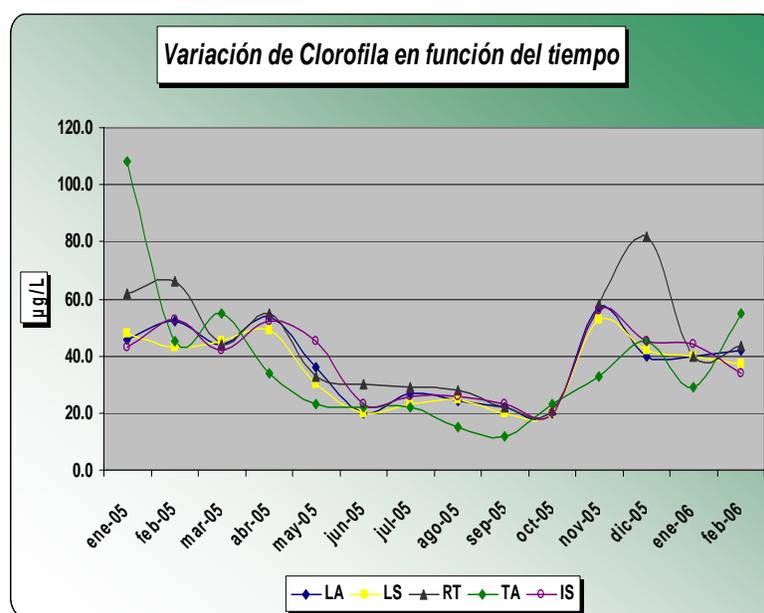
## 6. 9. Variación de los valores de Clorofila a en función del tiempo

La determinación de la concentración de pigmentos fotosintetizadores se realiza para estimar aproximadamente la biomasa y la capacidad de fotosíntesis del fitoplancton. Todas las algas contienen clorofila a, constituyendo aproximadamente el 1 a 2% del peso de las planctónicas (APHA, 1992). La clorofila a es utilizada como representación de la concentración total de pigmentos algales ya que es la más abundante e importante.

Los resultados de la variación de clorofila en función del tiempo para cada punto de muestreo se presentan en la Fig. 13.

Puede observarse máximos valores en enero de 2005 de  $108 \mu\text{g.L}^{-1}$  y en diciembre de 2005 de  $81.8 \mu\text{g.L}^{-1}$  mientras que, un bajo contenido de clorofila se presenta en los meses de agosto y septiembre de 2005 (menor a  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Dichos períodos de máxima concentración de clorofila corresponden a los máximos encontrados en cianobacterias indicando que el elevado nivel de clorofila se asocia con la concentración de bacterias fotosintéticas como son las cianobacterias.

Según el análisis de varianza entre las áreas muestreadas no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración de clorofila en cada punto de muestreo.



**Fig. 13:** Variación de clorofila en función del tiempo para cada punto de muestreo

LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

En el anexo se presentan los resultados del ANOVA aplicado.

Los resultados de clorofila encontrados en el presente trabajo en las muestras del Río de la Plata resultaron ser significativamente mayores a los presentados en el informe de la Calidad de Aguas de la Franja costera sur del Río de la Plata (CAFCS) durante el periodo 1992-1993 donde se detectaron valores medios de  $8.0 \mu\text{g.L}^{-1}$  y un máximo de  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  en las campañas 1992-1993. Es importante recalcar que es probable que las condiciones del Río de la Plata se están viendo deterioradas con los años mostrando diferencias en el contenido de clorofila que pasa de valores de  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ambiente mesotrófico según Informe de Calidad de Aguas años 1993-1994 (CAFSC) a valores de  $208 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ambiente hipertrófico en diciembre 2005 (este trabajo)).

## **6.10. Variación de los valores de Microcistina-LR**

### **6.10.1. En los ambientes estudiados en función del tiempo**

Si bien los ensayos analíticos como los realizados con equipos de HPLC se han establecido como las metodologías de elección debido a los excelentes resultados que arrojan en la identificación y cuantificación de cianotoxinas, se debe tener presente que siempre en una primera instancia se realizan las pruebas de toxicidad en ratones como ensayos de orientación, al cual se adicionan luego algún método analítico. Además es importante mencionar que, a pesar de los óptimos resultados obtenidos con los métodos instrumentales, se continúa en la búsqueda de pruebas más sencillas y fundamentalmente más baratas, tanto en lo referente al instrumental imprescindible como así también en el costo de los insumos en general. Particularmente en este segundo punto, teniendo en cuenta que estas determinaciones deberían quedar al alcance de laboratorios de análisis de agua de rutina, no especializados, en los cuales no siempre es posible contar con instrumental sofisticado y un adecuado presupuesto necesario para tareas de funcionamiento y mantenimiento.

Para evaluar el grado de toxicidad de los florecimientos en las fechas de noviembre y diciembre 2005, donde se observó florecimiento algal, se realizaron los ensayos de toxicidad en ratón.

Todos los ratones inyectados intraperitonealmente con 1 ml de extracto de células de *Microcystis* spp obtenidas del Río de la Plata murieron en  $40 \pm 2$  minutos ( $n=3$ ) después de la inyección (Fig. 14 a).

La necropsia reveló que los hígados presentaban hemorragias y el peso de los hígados fue  $57 \pm 5$  %

mayor que los correspondientes a los controles inyectados con solución salina (Fig. 14 b). Los resultados se muestran en la Tabla 2.



Fig. 14: Extracto de células obtenidas del Río de la Plata, (a) Tamaño de dos hígados de animales controles y de tres hígados tratados con Microcistinas extraídas del Río de la Plata (b).

Tabla 2: Resultados del ensayo ratón para hepatotoxinas obtenidas en florecimientos de *Microcystis sp.*, tomados en el punto de muestreo toma de agua.

	Volumen inyectado (ml)	Peso del animal (g)	Tiempo de muerte (min)	Peso del hígado (g)
Control 1	1	19.5	Sin síntomas	0.87
Control 1	1	18.3	Sin síntomas	1.11
Control 1	1	20.3	Sin síntomas	0.95
Muestra 1	1	19.9	36	1.63
Muestra 2	1	18.9	43	1.52
Muestra 3	1	19.8	43	1.60

Los análisis histopatológicos de los hígados de los ratones mostraron una disrupción masiva de la arquitectura lobular y sinusoidal del hígado, dilatación de los vasos hepáticos, pérdida de hepatocitos y displasia (Fig. 15).

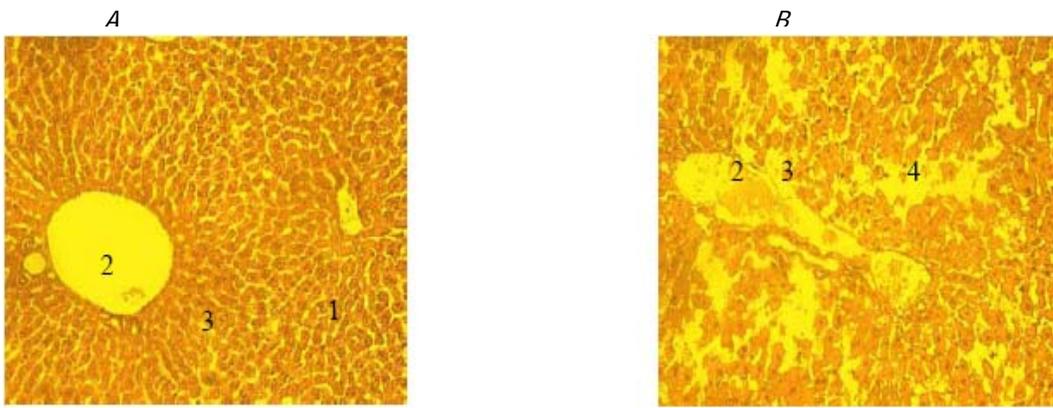


Fig. 15: Corte histológico del hígado de ratón, (A) control, (B) animal tratado con florecimiento de *Microcystis spp.* 1- Vena hepática terminal 2- Tracto portal 3- Interfase del parénquima en posición radiada. Nótese tracto portal con importante vasodilatación, disrupción de la interfase del parénquima y pérdida parénquima hepático.

Asimismo, se realizó la determinación analítica de las toxinas presentes en los florecimientos mediante técnicas de HPLC.

Fig. 16 muestra un cromatograma típico de HPLC-UV de *Microcystis aeruginosa* tomada de un florecimiento (picos 1, 2, 3, 5 y 7 son Microcistinas sin identificar), 4 y 6 corresponden a Microcistina-YR y LR respectivamente.

Los resultados de la variación de MC-LR en función del tiempo para cada punto de muestreo determinados por técnicas de HPLC se presentan en la Fig. 16.

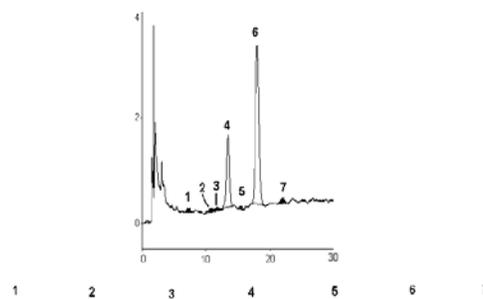
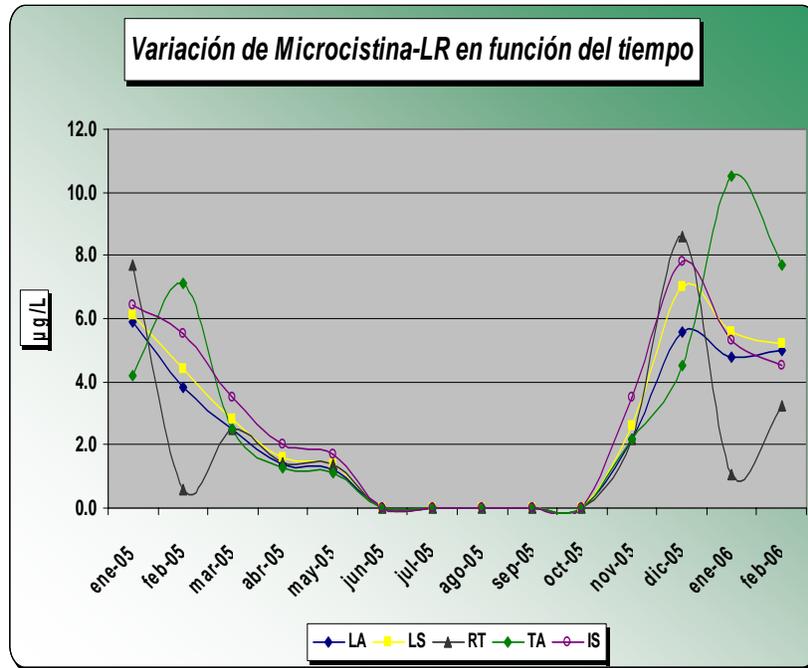


Fig. 16. Cromatograma típico de HPLC-UV de Microcistina-LR de *Microcystis spp* tomada de un florecimiento. Los picos 4 y 6 corresponden a Microcistina-YR y LR respectivamente.



**Fig. 17:** Variación de Microcistina-LR en función del tiempo para cada punto de muestreo.

LA: Laguna Aeroclub, LS: Laguna Salada, RT: Rotonda, TA: Toma de agua, IS: Isla Santiago.

En la Figura 17, se observa que la toxina Microcistina-LR tuvo un pico máximo de  $10.5 \mu\text{g.L}^{-1}$  en enero de 2006 y de  $8.6 \mu\text{g.L}^{-1}$  en diciembre de 2005 en el punto de muestreo toma de agua entre tanto, se aprecia un mínimo de Microcistina-LR de  $0.6 \mu\text{g.L}^{-1}$  en febrero de 2005 y de  $1.1 \mu\text{g.L}^{-1}$  en mayo de 2005 en todos los puntos de muestreo. De igual manera, del mes de junio a octubre de 2005 no se detectó esta toxina en los puntos muestreados.

El análisis de varianza señala que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración de Microcistina-LR entre las áreas muestreadas durante el tiempo de estudio.

El Análisis de varianza del contenido de Microcistina-LR de cada área en estudio se puede observar en el anexo.

En Argentina, Ame y col., 2003, confirmaron la presencia de microcistina-LR y microcistina-RR en un 97% de los florecimientos en el lago San Roque (Córdoba, Argentina). La presencia de cianobacterias *Anabaena circinalis* y *Microcystis aeruginosa*, fueron detectadas en alta concentración en agua de red en la ciudad de Bahía Blanca durante el verano de 2002.

La formación de fenómenos de floraciones en el Río de la Plata suelen ser frecuentes, produciéndose generalmente durante los meses de verano.

En la mayoría de los casos la especie responsable es *Microcystis aeruginosa*, la cual llega a generar floraciones uniespecíficas de amplia distribución y gran densidad celular (Guarrera, 1950; Gómez & Bauer, 2000).

Este fenómeno aparece en áreas donde la actividad humana o la contaminación son intensas. Es muy frecuente, en coincidencia con los meses de floraciones algales en el Río de la Plata, que parte de la población que concurre a los balnearios de la región sufra desordenes gastrointestinales. Sin embargo no existen registros epidemiológicos.

Asimismo, es de resaltar eventos masivos de muerte de peces, asociados a este tipo florecimientos, como los observados días previos a este estudio.

Un florecimiento tóxico de *Microcystis aeruginosa* en el Río de la Plata fue informado en las costas uruguayas del Río de la Plata pero sin identificar las toxinas (De Leon, 2002).

Recientes publicaciones presentadas por el grupo de trabajo donde se llevó a cabo los estudios de la presente tesis dan cuenta de la presencia de florecimientos de *Microcystis aeruginosa* en muestras del Río de la Plata así como la presencia de microcistina evaluada por HPLC empleando arreglo de diodos como detector. El florecimiento contenía microcistina LR y una variante de ion molecular  $[M+H]^+$  = 1037.8 m/z como principal componente (Andrinolo, 2008). El total de toxina encontrada fue de 0.94  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  de células liofilizadas. La alta toxicidad detectada en los ensayos ratón se puede explicar por el alto contenido de toxina en los extractos detectados por los análisis de HPLC. En el ensayo ratón se inyectó 1ml de extracto con 94  $\mu\text{g}$  de microcistina. Esta dosis de 540  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , es 10 veces mayor que la LD50 que es de 50  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  de peso corporal estimada para micocystinas. Estos autores concluyen que la presencia de clones tóxicos de *Microcystis aeruginosa* en las costas Argentinas del Río de la Plata representa un problema sanitario que debe ser encarado en términos de evaluación de riesgo.

La Tabla 3 resume los valores medios así como los máximos y mínimos de los parámetros físico-químicos estudiados y los biológicos durante los meses de muestreo en los cuatro puntos de muestreo realizados.

Tabla 3. Estadística descriptiva para los puntos de muestreo en el periodo de estudio en el Río de la Plata y en las lagunas

Parámetros	Promedio	Desv. Est.	Máximo	Mínimo
Temperatura	20.8	0.73	30	11
pH	8.35	0.21	10.2	7.23
Conductividad	477.06	69.81	868	228
Hierro	0.27	0.15	0.87	0.01
Fosfato	1.89	0.97	5.45	0.07
nitratos	4.12	0,54	12	0.6
nitritos	0.14	0.123	0.56	0.001
Coliformes Totales	2208	389.43	4600	1350
Coliformes Fecales	2156	175.78	4600	1350
Cianobacterias Totales	34288	11275.76	199200	200
<i>Microcystis</i> sp.	19368	6296.52	165000	0
Clorofila	38	43.83	35.36	3.213
Microcistina LR	3	2.93	10.50	0.375

La fuerte contaminación del Río de la Plata y en las lagunas estudiadas dada por los altos niveles de coliformes totales y fecales y la concentración de nitratos y fosfatos define a este cuerpo de agua como eutrófico. Estos negativos parámetros impactan sobre la pérdida de diversidad del fitoplancton y favorece el desarrollo de cianobacterias toxígenas productoras de Microcistinas como se observó durante el período estudiado.

#### **6. 10. 2. Variación de los valores de Microcistina-LR en muestras de agua red.**

Considerando los valores de microcistinas-LR encontrados en los puntos de muestreo y en particular en la toma de agua de la planta potabilizadora, no es de extrañar que estas toxinas atraviesen los procesos tradicionales de potabilización y se detecten en agua de red.

Se estudió los niveles Microcistina-LR en diferentes muestras de agua de red obtenidas en domicilios particulares de las localidades de Ensenada y La Plata durante el primer trimestre de 2005 y analizadas mediante HPLC-UV. En la localidad de Ensenada se tomaron muestras en 3 puntos de muestreo de la red de distribución domiciliaria (puntos 1, 2 y 3) y en La Plata en 4 puntos de muestreo (puntos 4, 5, 6 y 7). En la sección de Materiales y Métodos se presentan la ubicación de esos puntos.

La Fig. 18 muestra la corrida cromatográfica de una muestra de agua de distribución domiciliar obtenida en la zona de 18 y 33 (La Plata) donde se aprecia la presencia de Microcistina LR en comparación con un Standard analítico de Microcistina YR y LR.

La Tabla 4 presenta las concentraciones de Microcistina-LR encontradas en agua de red así como el punto de muestreo en que fue detectado y la fecha correspondiente.

Tabla 4: Concentraciones de Microcistinas-LR encontradas en agua de red en la localidad de Ensenada y La Plata.

Fecha de muestreo	Ensenada (punto de muestreo 1 y 3)	La Plata (punto de muestreo 4-7)
4-01-05	0.70 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (1)	Nd
8-01-05	6.70 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (2)	Nd
14-01-05	6.07 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (2)	Nd
18-01-05	1.14 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (1)	Nd
13-02-05	0.08 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (3)	Nd
18-02-05	0.15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (3)	Nd
3-03-05	Nd	Nd
7-03-05	Nd	1.25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (4)
9-03-05	0.27 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (1)	Nd
9-03-05	Nd	0.23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (4)
9-03-05	Nd	Nd
23-03-05	Nd	Nd
1-04-05	0.70 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (1)	Nd

Nd no detectado:  $<0.05 \mu\text{g.L}^{-1}$

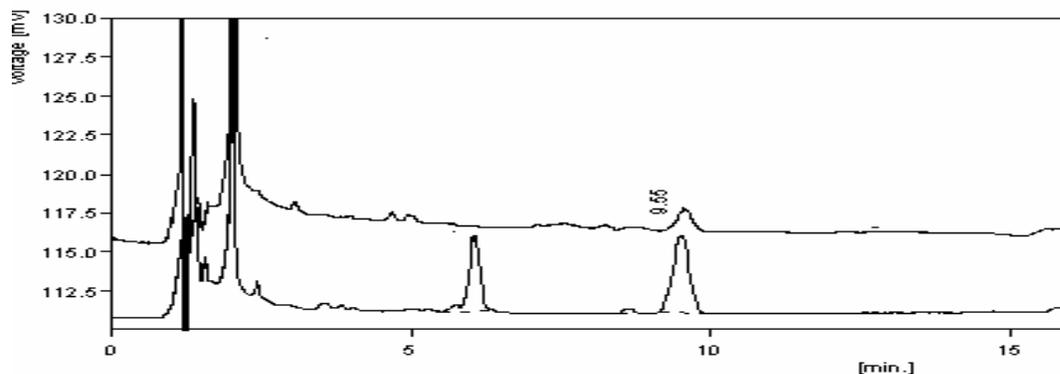


Fig. 18: Corrida cromatográfica de una muestra de agua de red

Teniendo en cuenta los niveles propuestos por la OMS (19989) como valor límite de seguridad de Microcistina que es de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , observamos que el proceso de tratamiento aplicado es deficiente, por lo menos durante los períodos críticos de desarrollo masivo de fitoplancton en el Río de la Plata. En base a esta información podemos concluir que la exposición a cianotoxinas a través del abastecimiento de agua representa un riesgo real para la salud de la población debiendo evaluarse su impacto.

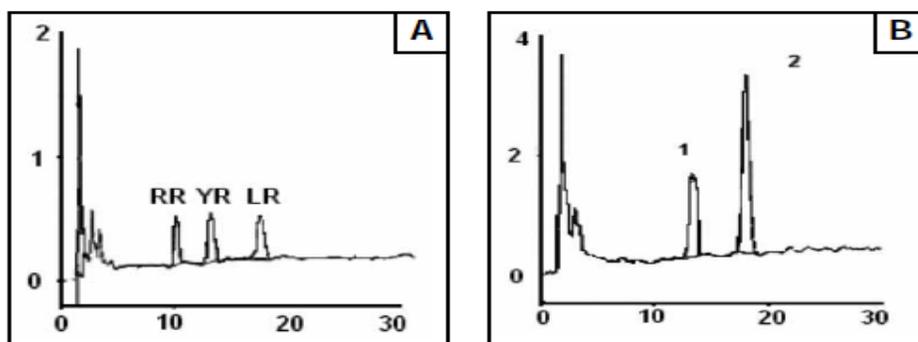
Estos resultados abren nuevos interrogantes referidos a las consecuencias sanitarias ecológicas y económicas de esta problemática. Futuros estudios resultan necesarios ser realizados a efectos de profundizar estas cuestiones.

### 6.10.3. Cuantificación de Microcistinas en extracto de células de *Microcystis aeruginosa* en cultivo.

La presencia de *Microcystis aeruginosa* y la detección de Microcistina-LR en las muestras de los florecimientos del Río de la Plata anteriormente encontradas, planteó la posibilidad de puesta en cultivo las estirpes aisladas. En el capítulo 5 se muestra el cultivo logrado de *Microcystis aeruginosa* a partir de muestras ambientales aisladas del Río de la Plata.

Se determinó el tipo de variante de MC producida y su cuantificación durante el crecimiento de la estirpe mantenida en cultivo en condiciones controladas.

Un perfil típico de elución de extractos de células de *Microcystis aeruginosa* en un cultivo en fase exponencial se muestra en el cromatograma de la Fig. 19.



**Fig 19:** Corrida cromatografica HPLC-UV de mezcla estándar de Microcistinas : MCRR- YR y LR (1  $\mu\text{g}$  cada una), (B) Extracto de células de *Microcystis aeruginosa* en cultivo .

En los extractos de las células en cultivo se detectaron dos picos mayores coincidentes con microcistina-YR y LR.

Los dos picos tienen tiempos de retención de 9.0 y 12.34 minutos respectivamente y fueron coincidentes con el tiempo de detección mostrado por los estándares de MC-YR y MC-LR.

El promedio de concentración de MC-LR detectada fue de  $90 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de células con una desviación estándar de  $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  células.

Para MC- YR el promedio fue de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  células con desviación estándar de  $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  células.

Los niveles detectados de MCs fueron similares a los hallados en los florecimiento de *M. aeruginosa* informados en las costas uruguayas del Río de la Plata (De León, 2001). Estos hallazgos sugieren que el fenómeno tóxico se encuentra ampliamente distribuido en el Río de la Plata.

El presente trabajo logró aislar y poner en cultivo una cepa toxicogenica identificada como *Microcystis aeruginosa* extraída del ambiente.

La caracterización de la toxina producida correspondió MC-LR y MC-YR.

Es sabido que tanto el tiempo de retención como el espectro de absorbancia constituyen la condición para la identificación de microcistina. Sin embargo, este criterio de identificación puede no ser suficiente y los resultados pueden ser erróneos. Es necesario incorporar tecnologías más precisas como ser detector de masa a efectos de estudiar las cianotoxinas de esta cepa aislada del Río de la Plata.

# **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS MONITOREADOS**

## 7. 1. Introducción

En el capítulo anterior se analizó el monitoreo de los parámetros físico, químicos y biológicos del Río de la Plata realizado durante el periodo de estudio. A efectos de evaluar la influencia de estos parámetros sobre la formación de floraciones cianobacterias y la producción de Microcistinas se utilizará en este capítulo el Análisis de componentes principales.

En el presente trabajo se aplicó el Análisis de Componentes Principales a los puntos pertenecientes en el Río de Plata (Rotonda, Toma de agua e Isla Santiago) **debido** a que presentaban mayor homogeneidad en los resultados dado que provienen del mismo ambiente. No se incorporó los ambientes lacustres (Laguna aeroclub ni laguna salada) por presentar resultados que mayormente diferían en forma significativa del ambiente del Río de la Plata.

## 7.2. Análisis de componentes principales

El **Análisis de componentes principales** (ACP) permite reducir la dimensionalidad de los datos, transformando el conjunto de **p** variables originales en otro conjunto de **q** variables incorrelacionadas ( $q \leq p$ ) llamadas componentes principales (Foguet, 1989).

Las **p** variables son medidas sobre cada uno de los **n** individuos (muestras), obteniéndose una matriz de datos de orden **np** ( $p < n$ ).

En el ACP existe la opción de usar la matriz de correlaciones o bien, la matriz de covarianzas. En la primera opción se le está dando la misma importancia a todas y a cada una de las variables; esto puede ser conveniente cuando se considera que todas las variables son igualmente relevantes. La segunda opción se puede utilizar cuando todas las variables tengan las mismas unidades de medida y además, cuando se juzga conveniente destacar cada una de las variables en función de su grado de variabilidad.

Las **q** nuevas variables (componentes principales) son obtenidas como combinaciones lineales de las variables originales. Los componentes se ordenan en función del porcentaje de varianza explicada. En este sentido, el primer componente será el más importante por ser el que explica mayor porcentaje de la varianza de los datos (Johnson y Wichern, 1982).

El análisis se realiza en el espacio de las variables (parámetros muestreados) y, en forma dual, en el espacio de los individuos que en este caso corresponde a las muestras tomadas (fechas realizadas). Se

acostumbra a representar gráficamente los puntos-variables y los puntos-individuos tomando como ejes de coordenadas los componentes. A veces, puede facilitar la interpretación de los resultados, el observar la similar ubicación de los puntos en los planos respectivos. Aunque el plano de puntos-variables no se superpone al plano de puntos-individuos, es de gran utilidad "interpretar" la cercanía de un grupo de puntos-individuos, a ciertas variables.

En el presente trabajo se aplicó en el ACP para **reducir la dimensionalidad de la matriz de datos** con el fin de evitar redundancias y destacar relaciones. En la mayoría de los casos, tomando sólo los primeros componentes, se puede explicar la mayor parte de la variación total contenida en los datos originales.

Se desea analizar la influencia, en el desarrollo de floraciones tóxicas, de las variables ambientales monitoreadas durante un año; estas son temperatura, pH, conductividad, hierro, fósforo total, nitratos, nitritos, coliformes totales, coliformes fecales, clorofila, células totales de fitoplancton, *Microcystis* spp, toxina (Microcistina).

ACP proporciona información sobre el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal (PC) y mantiene la máxima información de los datos originales (Esbensen, 2005). Se aplicó ACP en forma independiente en cada punto de monitoreo del Río de la Plata (Toma de agua, Rotonda y Isla Santiago) con el fin de identificar grupos correlacionados con los principales factores que influyen en la calidad de agua en la estacionales (fechas de muestreo).

### **7.3. Pretratamiento de los datos**

El pretratamiento de los datos es un paso fundamental antes de realizar cualquier otro cálculo, ya sea de regresión o clasificación.

El pretratamiento de los datos se utiliza para minimizar contribuciones de variables físicas que incorporan información irrelevante de manera que se puedan construir modelos más simples y robustos.

Algunos de los pretratamientos más comunes y utilizados a lo largo de la presente tesis se describen brevemente a continuación.

Consiste en cambiar el origen de la nueva escala de variables por la media de la variable antes del centrado.

Para cada valor  $x_{i,m}$  de una columna  $m$  el nuevo valor es:

$$x'_{i,m} = x_{i,m} - \bar{x}_m$$

siendo  $x'_{i,m}$  el dato centrado,  $x_{i,m}$  el dato de la fila  $i$  y la columna  $m$  antes del centrado,  $\bar{x}_m$  media de la columna

$$\bar{x}_m = \left( \bar{x}_m = \sum_i x_{i,m} / I \right)$$

La propiedad fundamental de los datos centrados es que el valor medio de cada una de las variables es igual a cero. Este pretratamiento no modifica la varianza de los datos

El autoescalado consiste en un centrado seguido de una normalización:

$$x'_{i,m} = \frac{x_{i,m} - \bar{x}_m}{s_m}$$

donde  $x'_{i,m}$  es el dato autoescalado,  $x_{i,m}$  es el dato antes del autoescalado,  $\bar{x}_m$  la media de la columna  $m$  y  $s_m$  la desviación estándar de la columna  $m$ . De esta forma, la media y la varianza de las nuevas variables autoescaladas es de 0 y 1 respectivamente.

Una vez realizado el tratamiento de los datos, se realiza la aplicación del ACP.

#### **7.4. Aplicación de Análisis de Componentes Principales a los datos experimentales**

Al aplicar el análisis de componentes principales, se analiza el gráfico de **Scores**, donde se

observa la **relación que existe entre las muestras en los nuevos ejes o PCs** (fechas del monitoreo en este caso) en términos de su varianza.

Muestras similares se agruparan y se separaran de aquellas que no, y dependiendo en donde se observe esa separación, ya sea x o y o (PC1 o PC2, o cualquier otro PC) e indica la componente que brinda la información influyente o estadísticamente importante en esa separación.

De igual manera, al aplicar en análisis de componentes principales, se puede analizar el grafico de loadings (también conocidos como eigenvectores o valores propios), donde se observa la **relación entre que existe entre las variables originales** (parámetros monitoreados, pH, células, etc), para cada PC.

Las variables que posean los valores máximos (sean positivos o negativos) son las variables mas influyentes o importantes que nos muestran similitudes o diferencias en esa Componente Principal (PC).

Así, si se observa un comportamiento interesante en PC1, y se analiza el loading de PC1 en términos de las variables, los valores máximos o mínimos de los loadings indican cuales de las variables son las más influyentes que modelan o explican ese comportamiento observado en los scores de PC1. Los loadings explican que variables son las influyentes o importantes para dicha agrupación o discriminación

Los datos correspondientes a cada punto de muestreo fueron analizados empleando un paquete estadístico Multivariante (MVSP, Kovach Computing Services, Wales, UK) y el análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando The Unscrambler™ v.9.8 software de CAMO Inc. (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

#### **7.4.1. Análisis de componentes principales del punto de muestreo Rotonda**

La Fig. 1 muestra la Variancia expandida para el análisis de datos correspondientes al punto de muestreo Rotonda.

El análisis de la varianza expandida para este punto de muestreo permite inferir que el componente principal 1 (PC1) permite explicar 26% de la varianza, el PC2 el 23%, el PC3 el 16%, el PC4 10% de la varianza.

Analizando los valores para las muestras colectadas se puede observar que las primeras 10 componentes explican el 100% de la varianza total del conjunto de datos, asimismo las dos primeras componentes principales explican el 49% de la varianza.

Las barras azules nos dicen el comportamiento del modelo en la etapa de calibración en términos de su varianza.

A los efectos de analizar cuales son los factores que influyen en esos componentes, se analizan los Scores y los loading para cada caso.

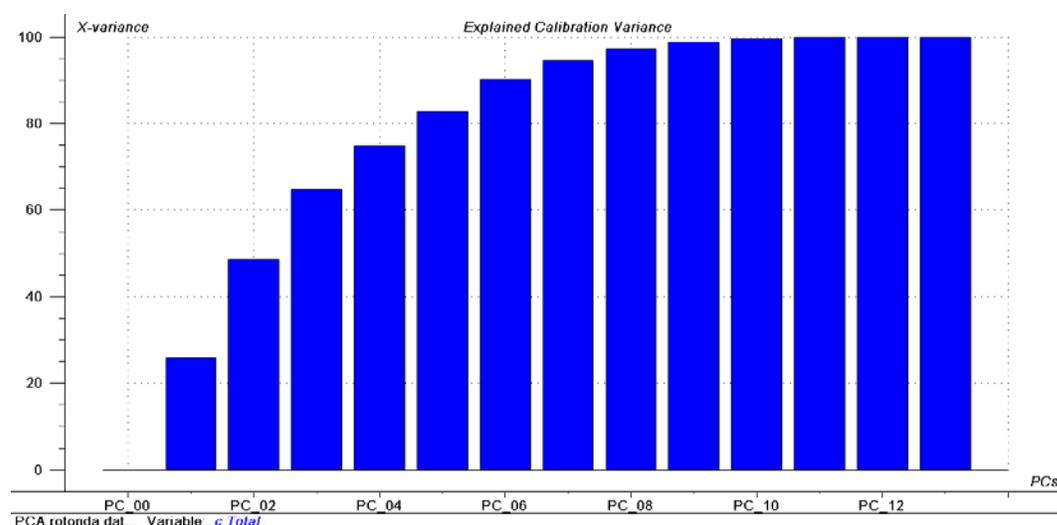


Fig. 1: Variancia explicada para el análisis de datos correspondientes al punto de muestreo Rotonda.

Realizando un análisis de la grafica de Scores es posible identificar un grupo claro a lo largo del eje PC1 en la Fig. 2 (incluido dentro de la elipse). A lo largo del eje PC1, se pueden observar dos claras agrupaciones de muestras y tres muestras (12 dic, 05 enero, 03 de febrero) que no forman parte de estas agrupaciones y se encuentran dispersas en PC1.

Si los objetos son proyectados sobre el eje PC2 es posible reconocer los objetos “12/12/2004”, “5/1/2004” y “3/2/2004” son diferentes del resto; hay que hacer notar que estos objetos se corresponden con ocurrencia de floraciones de cianobacterias.

Para interpretar la distribución de estos objetos debe analizarse la gráfica de loading para PC1 y PC2 (Fig. 3).

Las variables que más influyen relacionadas a la distribución de los objetos en los gráficos de loading de ACP, se muestran en un rectángulo en Fig. 3 a y b.

Se encontró que la componente 1 (PC1) que explica el 26% de la varianza, ordena las muestras en términos de sus diferencias en *coliformes totales*, *coliformes fecales*, *cianobacterias totales*, *Microcystis aeruginosa*, *clorofila* (Fig. 3 a.). Analizando los valores de los loadings de PC2, encontramos que las variables más influyentes para esta agrupación son las variables referentes a los *nitritos*, *el pH* y *Microcistina* y en menor porcentaje la variable *Microcistis* sp. (Fig. 3 b).

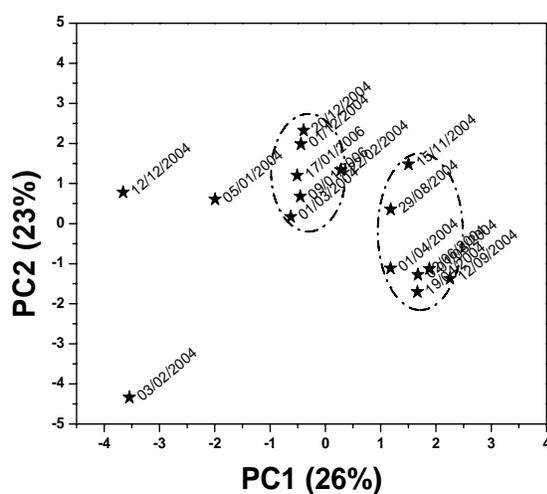


Fig. 2. Grafica de Scores PC1 vs PC2 para los datos colectados de la Rotonda.

De acuerdo a los gráficos, la distribución de los objetos proyectados sobre el eje PC1 se observa que están altamente influenciados y /o correlacionados por la presencia, variación o ausencia de cinco atributos (*Microcystis aeruginosa*, cianobacterias totales, coliformes totales y coliformes fecales). Mientras que a lo largo del eje PC2 la distribución de los “objetos” es influenciado por los mayores valores de loading (positivos o negativos), que son pH, conductividad, *M. aeruginosa* y cianobacterias totales y microcistina-LR y nitrito (ver rectángulos en Fig. 3).

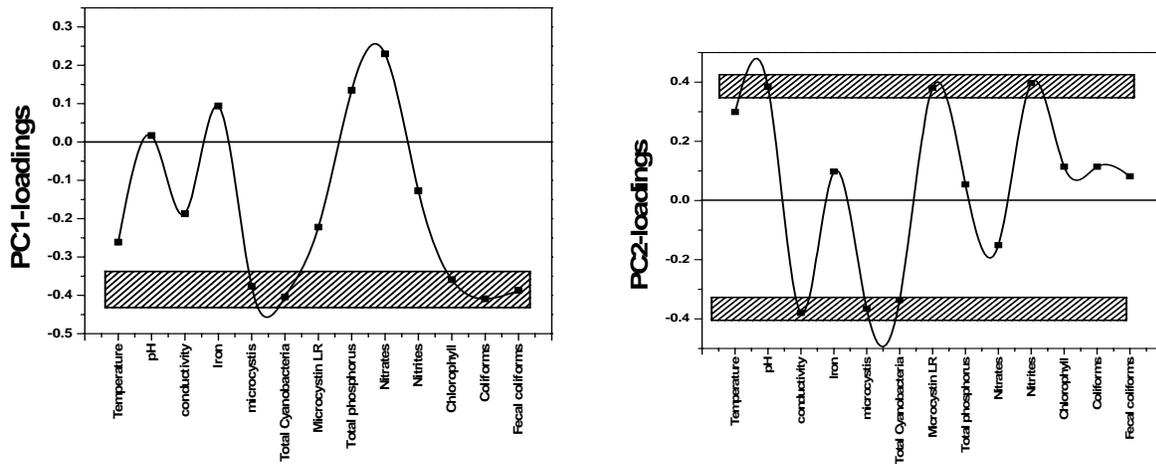


Fig. 3: Graficas 1-dimensionales de los valores de los loadings para las componentes principales 1 y 2 (PC1 y PC2), en un rectángulo se observan las variables más importantes y/o influyentes para cada componente.

El gráfico de dos dimensiones de loading (Fig. 4) puede ayudar a identificar la relación inter-variables. *Microcystitis aeruginosa*, clorofila -a, coliformes totales y fecales están altamente relacionadas en el eje PC1 pero no en PC2. Por otro lado, en el eje PC2 es posible observar la falta de correlación entre los atributos conductividad y nitrito.

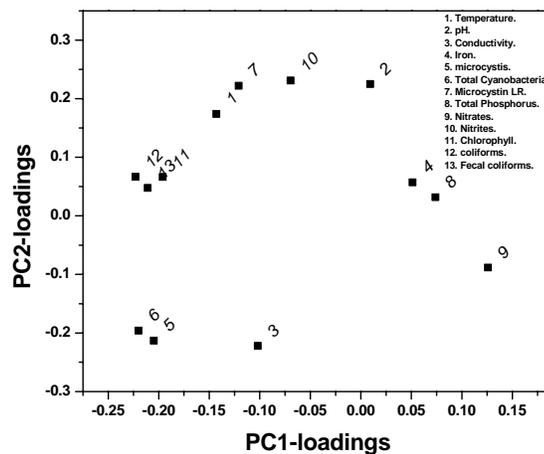


Fig. 4: Resultados de ACP obtenido para muestras recolectadas en punto de muestreo rotonda. Gráfico de dos dimensiones de los valores de loadings.

#### 7. 4. 2. Análisis de componentes principales del punto de muestreo Isla Santiago

La Fig. 5 muestra la Variancia explicada para el análisis de datos correspondientes al punto de muestreo Isla Santiago.

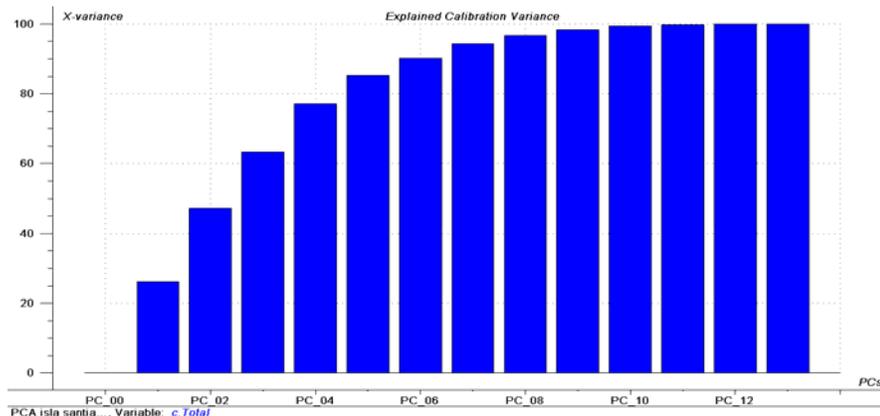


Fig. 5: Variancia explicada para el análisis de datos correspondientes al punto de muestreo Isla Santiago.

El análisis de la varianza expandida para este punto de muestreo permite inferir que el componente principal 1 (PC1) permite explicar 26% de la varianza, el PC2 el 21%, el PC3 el 16%, el PC4 14% de la varianza.

Analizando los valores para las muestras colectadas se puede observar que las primeras 10 componentes explican el 100% de la varianza total del conjunto de datos, asimismo las dos primeras componentes principales explican el 50% de la varianza.

A los efectos de analizar cuales son los factores que influyen en esos componentes, se analizan los Scores y los loading para cada caso.

En la grafica de Scores se observa una separación en un grupo a lo largo de la componente 1 (PC1) incluido en una elipse que explica el 26% de la varianza de los datos.

Se observa una separación en un grupo el cual corresponde a la época estival que abarca entre octubre y febrero (Fig. 6).

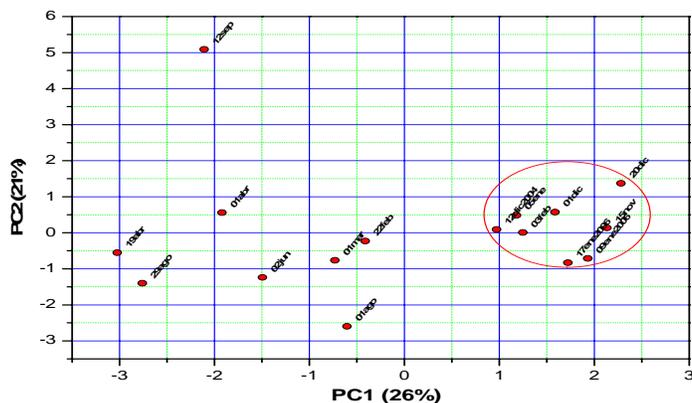


Fig. 6. Grafica de Scores PC1 vs PC2 para los datos colectados de la Isla Santiago.

Si los objetos son proyectados sobre el eje PC2, es posible reconocer que el objeto “12/09/2004” es diferente del resto, este objeto corresponde a la presencia de un evento raro y es un severo florecimiento de cianobacterias. Esto se correlaciona con lo presentado en la Fig. 11 del capítulo 5 donde en isla Santiago presenta un evento de florecimiento notorio en setiembre 2004. La muestra colectada el 12 de setiembre esta en el extremo opuesto en PC2 con la colectada el 01 de agosto, que poseen valores extremos para estas dos variables.

De acuerdo a los loadings, los cuales nos dan la relación que existe entre las variables y nos muestran que variables son las más importantes en el modelo de ACP, podemos observar que a lo largo de la componente 1 (que explica el 23% de la varianza) donde la separación se encuentra estrechamente correlacionada con *Microcistina-LR*, *coliformes* y *la temperatura*, y en menor grado con la *clorofila* y *coliformes fecales*, lo cual se puede observar de los valores obtenidos para los loadings (Fig. 7 a).

Podemos observar que a lo largo de la componente 2 (PC2) la cual explica el 21% de la varianza total de los datos, existe una distribución de las muestras en términos de los valores de *Microcistis aeruginosa* y *cianobacterias totales* (Fig.7 b).

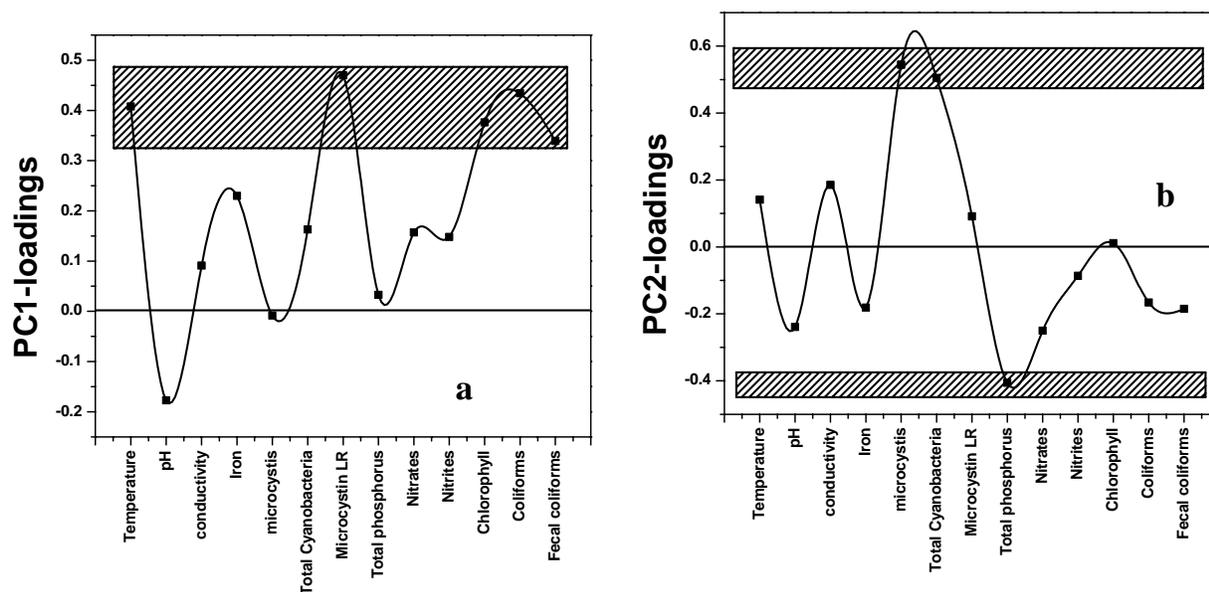


Fig. 7. Graficas 1-dimensionales de los valores de los loadings para las componentes principales PC1 (a) y PC2 (b), encerrado en un rectangulo las variables más importantes y/o influyentes para cada componente.

Si continuamos analizando los valores de los loadings, podemos identificar que la componente 3 (loading PC3) que explica un 16% de la varianza de los datos, nos explica las diferencias o similitudes de las muestras en términos de los nitritos y el pH (Fig. 8).

Cabe mencionar, que conforme aumenta el número de componentes principales, el valor porcentual de la varianza debe ir en decremento y la diferencia en influencia de las variables es menos significativa que para las primeras componentes. Generalmente la información más importante de nuestro conjunto de datos, se encuentra contenida en las primeras componentes, en donde se esperaría por lo general tener valores altos en porcentaje de la varianza.

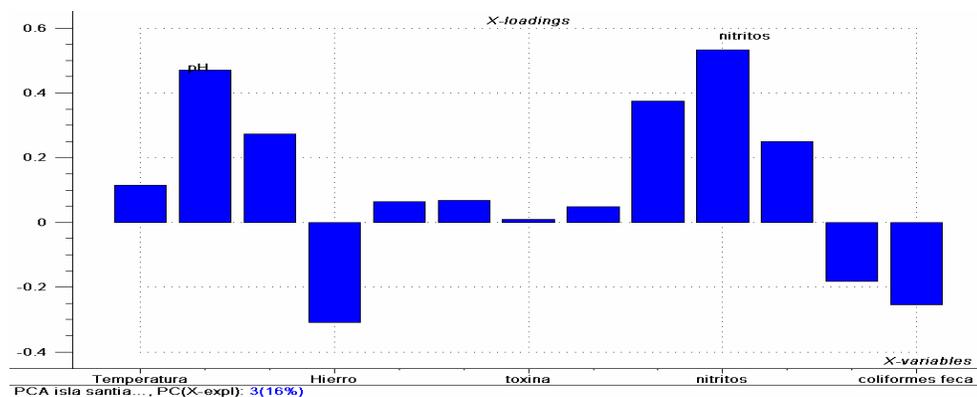


Fig. 8. Grafica 1-dimensional de los valores de los loadings para la componente principal 3.

El gráfico de dos dimensiones de loading (Fig. 9) puede ayudar a identificar la relación inter-variables. Temperatura, clorofila -a, Microcistin -LR, coliformes totales y fecales están altamente relacionadas en el eje PC1 .

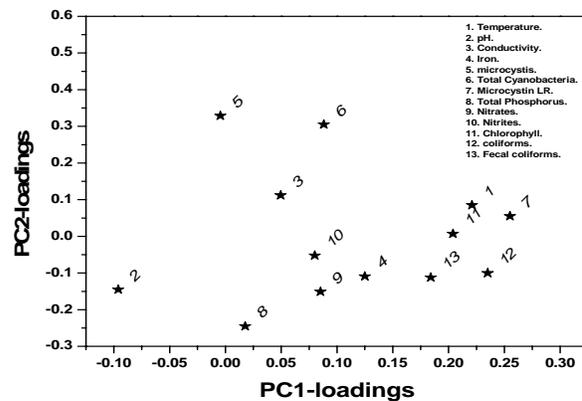


Fig. 9: Resultados de ACP obtenido para muestras recolectadas en punto de muestreo Isla Santiago.

Gráfico de dos dimensiones de los valores de loadings.

### 7. 4. 3. Análisis de componentes principales del punto de muestreo Toma de Agua

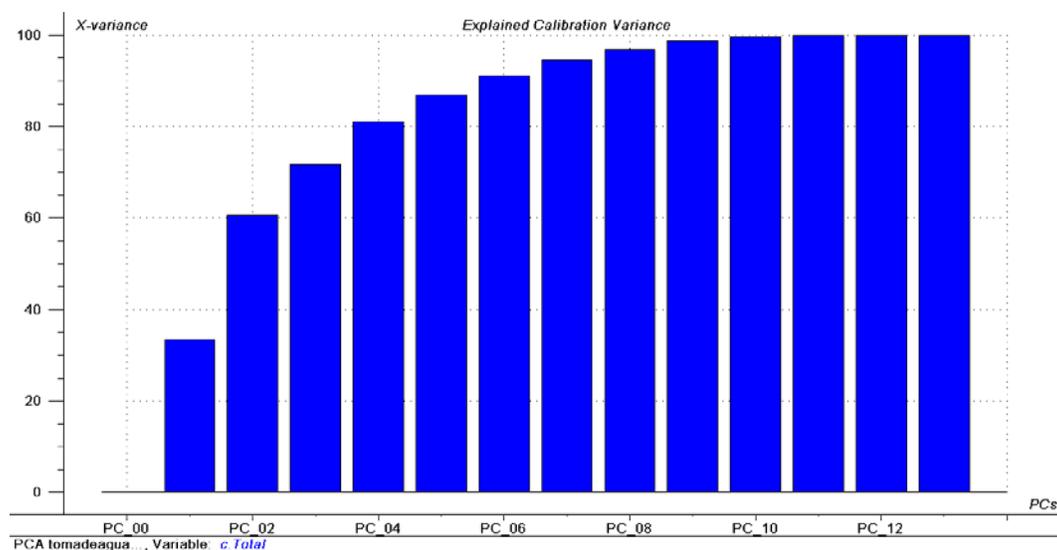


Fig.10. Variancia expandida para el análisis de datos correspondientes al punto de muestreo Toma de agua.

El análisis de la varianza expandida para este punto de muestreo permite inferir que el componente principal 1 (PC1) permite explicar 34% de la varianza, el PC2 el 27%, el PC3 el 16%, el PC4 14% de la varianza.

Analizando los valores para las muestras colectadas se puede observar que las primeras 10 componentes explican el 100% de la varianza total del conjunto de datos, asimismo las dos primeras componentes principales explican el 61% de la varianza.

A los efectos de analizar cuales son los factores que influyen en esos componentes, se analizan los Scores y los loading para cada caso.

La gráfica bidimensional de Scores PC2 vs PC1 se observan tres clusters bien diferenciados. Uno de ellos corresponde a las fechas de muestreo correspondientes a épocas estivales que abarca desde 3 de diciembre hasta el 1 de abril. El segundo cluster bien diferenciado se observa desde el 2 de junio hasta el 1 de agosto correspondiente a épocas templadas y el tercer cluster se observa en épocas que cursan desde el mes de abril al 11 de diciembre (Fig. 11).

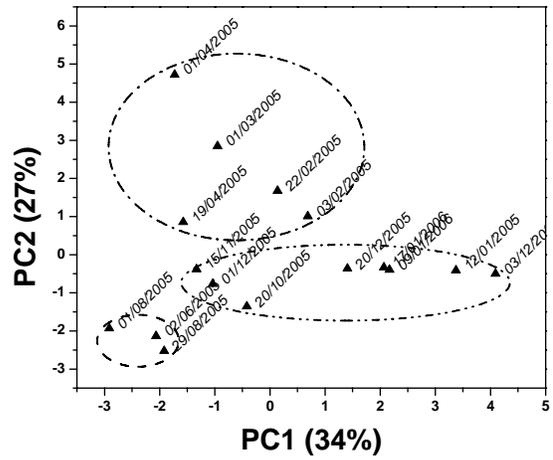


Fig. 11. Grafica de Scores PC1 vs PC2 para los datos colectados en el punto de muestreo Toma de agua.

Analizando los valores de los loadings para PC1 y PC2, observamos lo siguiente; PC1 explica el 34% de la varianza en los datos y PC2 el 27%.

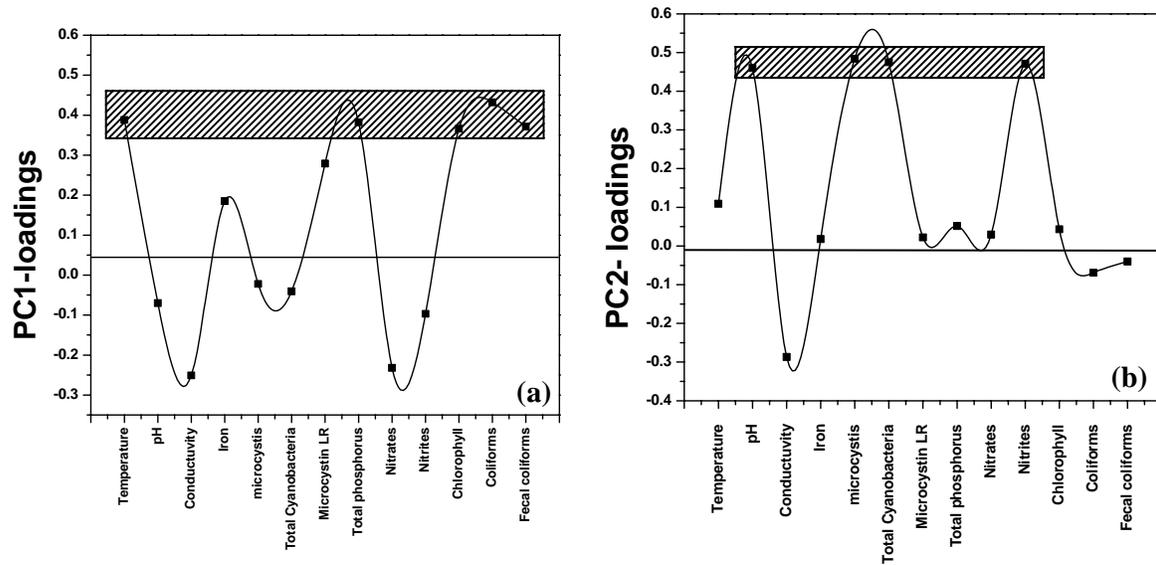


Fig. 12. Graficas 1-dimensionales de los valores de los loadings para las componentes principales PC1 (a) y PC2 (b), enmarcando en el rectángulo las variables más importantes y/o influyentes para cada componente.

Las variables principales influyentes de los objetos de distribución sobre el eje PC1 son temperatura, fósforo total, clorofila-a y coliformes totales y fecales (Fig. 12, a).

Como se muestra en la Fig. 12 b las principales variables influyentes identificados a el eje PC2 son pH, *Microcistis aeruginosa*, cianobacterias totales y nitritos.

El gráfico de dos dimensiones de loading (Fig. 13) puede ayudar a identificar la relación inter-variables. Tres atributos relacionados con las relaciones entre variables (similitudes variables) se puede observar en la Fig.13.

*Microcistina aeruginosa*, el recuento total de cianobacterias, la concentración de nitritos y el pH muestran una fuerte relación entre ellos y también influyen en la separación de los tres grupos a lo largo del eje PC2 como se indica en el gráfico de las puntuaciones del ACP.

Otros autores han aplicado el Análisis de componentes principales (PCA) al análisis de los datos registrados en sucesivos monitoreos de calidad de agua en ambientes. Los resultados del análisis de calidad de agua evaluados tanto espacialmente (diferentes puntos de muestreo) y temporalmente realizados en el Río Suquia, Córdoba, fue analizado por (Wunderblin y col. (2001).

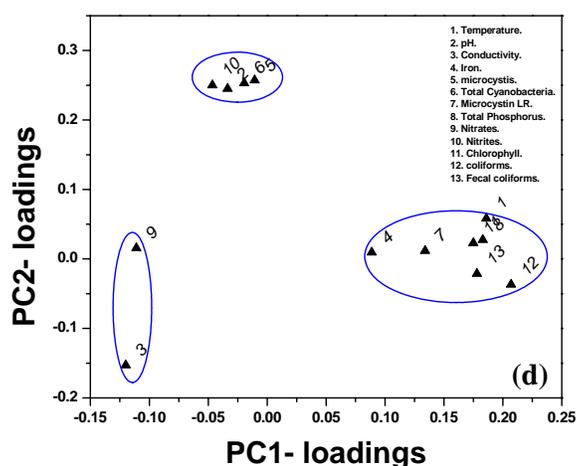


Fig. 13: Resultados de ACP obtenido para muestras recolectadas en punto Toma de agua. Gráfico de dos dimensiones de los valores de loadings.

Dicho trabajo, permitió agrupar los parámetros seleccionados de acuerdo a los cambios observados y evaluar la incidencia de cada grupo sobre los cambios en la calidad de agua especialmente durante el

análisis temporal de los mismos. Ese estudio monitoreo 22 parámetros en diferentes estaciones de muestreo (3 puntos) durante 2 años. Obtuvieron una compleja matriz de datos la cual fue tratada por diferentes métodos estadísticos incluyendo el APC. Dichos autores informan que fue posible reducir a 6 parámetros la matriz de datos indicando que los mayores cambios en la calidad de agua tanto como en la variación de los mismos se encontraba asociada con las variaciones estacionales (Temperatura), condiciones urbanas como coliformes totales y fuentes de contaminación presentando un nuevo abordaje para la evaluación de la calidad de aguas. Concentraciones de microcistina en diferentes condiciones ambientales mostraron que el predominio de cepas tóxicas podría favorecerse con la temperatura del agua (mayor a 23C) altos niveles de nitrógeno de amonio (mayor a 3 M) y hierro (mayor a 2 mM) que afectan el crecimiento de las cianobacterias.

En el presente trabajo, el análisis de los resultados aplicando la metodología de Análisis de componentes principales en tres puntos de muestreo permitió inferir las siguientes conclusiones.

El comportamiento de las variables estudiadas pudo ser también analizado en función de su variación estacional. Así, para cada punto de muestreo se pudo identificar fechas de muestreo que se agrupaban o se dispersaban.

En el punto de muestreo Rotonda se identificó tres fechas que se distinguieron del resto que coincidieron con los florecimientos observados y correspondieron a los meses de diciembre, enero y febrero.

En el punto de muestreo de Isla Santiago, se logró separar en un grupo importante coincidente con un florecimiento cianobacteriano que correspondió a época estival que fue desde octubre a febrero.

En el punto de muestreo Toma de agua, los datos fueron agrupados en tres clusters bien definidos, uno estival desde diciembre a abril que coincidió con florecimientos, otro templado desde junio a agosto y un tercer cluster de abril a diciembre.

Ello indica que la época estival coincidió en los tres puntos de muestreo con florecimientos cianobacterianos y corresponden a periodos de alerta para la detección de florecimientos masivos de cianobacterias.

Respecto a los factores mas influyentes en el análisis realizado, se monitorearon 13 parámetros que indican calidad de agua y mediante el análisis de componentes principales se pudo reducir los

parámetros influyentes en los tres puntos de muestreo a siete parámetros: los coliformes, cianobacterias totales, *Microcystis aeruginosa*, Microcistina-LR, temperatura, clorofila y fósforo que representan los factores mas relevantes en el componente principal (PC1) lográndose reducir un 46%. Además, en los tres puntos de muestreo los coliformes fueron factores importantes. Ello significa que pudo reducirse los parámetros que influyen en el desarrollo del fenómeno cianobacteriano.

Asimismo, en dos puntos de muestreo (Isla Santiago y Toma de agua) la temperatura influye en el PC1.

El análisis respecto al CP2, nitritos y pH se evidenciaron como importantes en dos puntos de muestreo. *Microcystis aeruginosa*, cianobacterias totales y Microcistina-LR también resultaron ser factores de influencia sobre el PC2. La Tabla 1 resume los análisis realizados.

**Tabla 1: Parámetros que influyen en los CP1 y CP2 en los tres puntos de muestreo.**

Punto de muestreo	Parámetros influyen en PC1	Parámetros que influyen en PC2
Rotonda	Coliformes totales y fecales	Nitritos
	cianobacterias totales	pH
	<i>Microcystis aeruginosa</i> clorofila	Microcistina Microcystis aeruginosa
Isla Santiago	Microcistina-LR	Microcystis aeruginosa
	Coliformes	Cianobacterias totales
	Temperatura	
Toma de agua	Coliformes totales y fecales	<i>Microcystis aeruginosa</i>
	Temperatura	células fitoplanctónicas
	Fósforo clorofila	Nitritos, pH

Los valores elevados hallados de cianobacterias totales, de *Microcystis aeruginosa*, coliformes totales y fecales reflejan la presencia de fuentes de contaminación antropogénica en el Río de la Plata.

El tratamiento de aguas residuales no constituye una práctica generalizada o extendida relacionada con el desarrollo urbano, así como las actividades agrícolas o industriales en Argentina. Este déficit da lugar a un progresivo deterioro de las cuencas hidrográficas como es el estuario del Río de la Plata.

Comprender el efecto de factores ambientales y antropogénicos en la producción de microcystinas podría contribuir a dilucidar los mecanismos implicados en su biosíntesis, así como en la prevención de la contaminación que lleva al control de las floraciones de cianobacterias tóxicas. Las concentraciones de microcistina observado en el Río de la Plata durante este estudio son similares a las descritas en otros episodios de floraciones cianobacterianas en todo el mundo (Kotak y col., 1993, Park y col., 1993, Fastner, y col., 2001, Chorus, 2001) donde MC-LR fue la toxina más frecuente.

El método estadístico aplicado en este estudio permite extraer información adicional de los registros y de seguimiento y comprender mejor las condiciones que llevan a las floraciones cianobacterianas tóxicas.

Cabe mencionar que aunque la principal vía de exposición humana a las toxinas de cianobacterias es el consumo de agua potable, siendo de menor importancia el uso recreativo de los lagos y lagunas (Falconer, 1999).

El Río de la Plata cumple con ambos aspectos, siendo necesario establecer programas de vigilancia para evitar la presencia de MC en el agua potable así como evitar la intoxicación en los usos recreativos. Especial atención debe ser dirigida a disminuir el grado de eutrofización de este recurso hídrico.

## **8. CONCLUSIONES**

En la presentes tesis de Magister llevó a cabo un monitoreo anual que incluyó la observación del sistema a estudiar, la obtención de muestras para analizar los aspectos bióticos (ej. presencia de cianobacterias y toxinas) y el registro de variables abióticas relacionadas con el crecimiento de las cianobacterias con el objeto de evaluar la ocurrencia de floraciones de cianobacterias y sus cianotoxinas

Se logró detectar e identificar las especies de cianobacterias potencialmente tóxicas presentes en el Río de La Plata y en las lagunas correspondiente a los géneros *Microcystis*, *Dolichospermum* y *Planktothrix*.

Una máxima densidad total del fitoplancton se registró en septiembre con 199200 cel.ml<sup>-1</sup>, mientras que durante el mes de agosto se detecto un mínimo de 500 cel.ml<sup>-1</sup> en las muestras del Río de la Plata.

La temperatura de los puntos muestreados manifestó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) durante el periodo de estudio. En los meses de febrero 2005 y enero de 2006 se mostró la temperatura más alta de 30°C. Contrariamente, se reflejo en julio y agosto de 2005 una temperatura mínima de 12°C.

Estos resultados reflejan la variación estacional y dinámica del ecosistema que a su vez influencia la presencia de Microcistinas-LR en el medio ya que, en enero de 2006 muestra la más alta concentración de toxinas de 10.5 µg.L<sup>-1</sup> mientras, en julio de 2005 no fue detectada.

El pH de puntos de muestreo del Río la Plata presenta un valor máximo de 10.20 en abril de 2005 y un mínimo de 7.23 en septiembre de 2005. El análisis de estos valores de pH indican que el Río de la Plata ha aumentado su valor de pH máximo respecto al valor informado de 7.4 en 1997 con lo cual, se concluye que el Río de la Plata no cumple con los niveles guías de

calidad de la Cuenca del Plata (rango pH de 6.5 a 8.5 para todo uso) y se relaciona con la presencia de floraciones de cianobacterias detectadas durante el periodo de estudio.

La conductividad de los puntos muestreados del Río la Plata presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Toma de agua reflejó la menor conductividad promedio de  $322.7 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Sin embargo, Laguna Salada y Aeroclub mostraron una alta conductividad promedio de  $1474 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  y  $748.49 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

Los altos niveles de conductividad encontrados nos permiten correlacionarlos con el alto contenido de sólidos disueltos presentes en estas Lagunas producto de la eutrofización. Ligado a esto, los valores obtenidos en este estudio son similares a los presentados en el informe de la Calidad del agua de la Franja costera Sur del Río La Plata donde se registró valores medios de  $432 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  en las campañas de 1992-1993, mientras que también se presentó un valor máximo de  $1770 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  en la estación de Santo Domingo en el año 1994-1995.

Se observaron valores de hierro superiores a la norma de calidad de agua potable en febrero 2006 ( $0.87 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y julio de 2005 ( $0.84 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), que establece un máximo de  $0.30 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Por otra parte, se detectó bajos niveles de hierro de  $0.01 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en los meses de marzo, mayo, junio y diciembre de 2005. La concentración registrada en diciembre de 2005 corresponde a los máximos de Microcystina LR encontrados en el mismo mes de  $8.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , indicando que bajos niveles de Fe se asocian con la concentración de toxinas de Microcystinas.

El contenido de fósforo total promedio de nuestros puntos de muestreo en el Río La Plata fue de  $0.62 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  con un máximo de  $1.78 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Estos niveles son comparables a los detectados en el informe de calidad de agua de la franja sur del Río La Plata durante el periodo 1992-

1993 donde se detectaron valores de 1.30 a 1.70mgL<sup>-1</sup>. También, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de fósforo entre los puntos de muestreo. Laguna Aeroclub presento valores de fósforo total de 4.8 mg.L<sup>-1</sup>, que son valores característicos de ambientes hipertróficos típicos de una laguna. Toma de agua mostró niveles de fósforo total de 1.7mg.L<sup>-1</sup>, valor que supera los niveles guías de la Cuenca del Plata para aguas destinadas para actividad recreativa sin contacto directo que establece un máximo de 1mg.L<sup>-1</sup> y refleja la presencia de contaminantes.

Los niveles medios de N- NO<sub>3</sub> en nuestro estudio fueron de 0.97 mg.L<sup>-1</sup> con un máximo de 2.7 mg.L<sup>-1</sup>. Según análisis de varianza no existen variaciones significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de NO<sub>3</sub> entre las aéreas muestras durante el periodo de estudio. En toma de agua los niveles máximos de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> alcanzados de 11.9 mg.L<sup>-1</sup> en diciembre de 2005 fueron concordantes con una alta concentración de Microcistina LR (8.6 µg. L<sup>-1</sup>) detectada en el mismo mes y con los registrados en el informe de la calidad de aguas de la Franja Costera del Sur del Río La Plata durante 1992-1993. Aunado a esto, sobrepaso el límite máximo dado para aguas destinadas para consumo humano con tratamiento convencional según Niveles guías de la Cuenca del Plata que establece 10 mg.L<sup>-1</sup> como N/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Los valores de nitrito obtenidos mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre Laguna Aeroclub y el resto de los puntos de muestreados en Río La Plata. Producto de las descargas cloacales que periódicamente se registraban en Laguna Aeroclub obtuvimos altos niveles de nitrito (2.54mg.L<sup>-1</sup>) esta zona. La concentración promedio de NO<sub>2</sub> hallada en Isla Santiago (0.38 mg.L<sup>-1</sup>) y Toma de Agua (0.35mg.L<sup>-1</sup>) no sobrepasa los niveles dados para aguas destinadas para consumo humano con tratamiento convencional según Niveles Guía de la Cuenca del Plata que establece un máximo de nitrito de 0.50 mg.L<sup>-1</sup> como N/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Altos recuentos de coliformes totales y fecales que se registraron en enero (4600 NMP/100ml) y diciembre (4300 NMP/100ml) de 2005 se correlacionan con los máximos de cianobacterias encontrados en dichos meses. Rotonda mostró los promedios más alto de coliformes totales con 2785 NMP/100ml y de coliformes fecales con 2489 NMP/100ml. Mientras que, Laguna Aeroclub reflejo el recuento de coliformes totales y fecales más bajo con 2029 NMP/100ml y 1946 NMP/100ml. La media geométrica de coliformes totales y coliformes fecales en los puntos muestreados del Río La Plata fue de 2208 y 2156 NMP/100ml respectivamente. Estos valores exceden ampliamente al valor guía para aguas recreacionales publicados por Canadian Council of Resources and Environment Ministres quienes indican que la media geométrica de coliformes fecales debe ser menor a 200 microorganismos/100 ml en no menos de 5 muestras tomadas en un periodo de 30 días. Ligado a esto, el 83 % de las muestras analizadas fueron positivas en la tipificación de *Escherichia coli* en todos los meses estudiados a excepción de junio y agosto.

Lo anterior indica que el Río de la Plata es un reservorio de calidad deficiente en su aspecto sanitario, ya sea para uso recreacional o como fuente de agua para ser potabilizada.

La Toma de agua de la planta potabilizadora que abastece a la ciudad de La Plata mostró un alto número de Cyanobacteria en septiembre de 199200 cel.ml<sup>-1</sup>. Este valor sobrepasa el umbral de Cianobacterias para el nivel guía de alerta alta que establece 100000 cel.ml<sup>-1</sup> e indica la probabilidad de efecto adverso a la salud por enfermedades a largo plazo, o alergias y problemas gastrointestinales a corto plazo. Así mismo, en los diferentes puntos de muestro del Río La Plata se observaron picos de cianobacterias de 175850 cel.ml<sup>-1</sup> en enero, octubre y diciembre de 2005, siendo el más afectado el correspondiente a Isla Santiago que presento coincidencialmente en octubre de 2005 un número alto células del genero *Microcystis* de

165000 cel.ml<sup>-1</sup> lo que indica, un proceso de eutrofización acelerado en esta zona que ocasiona perjuicios con relación al uso de este recurso.

Las variaciones estacionales de clorofila mostraron máximos valores en enero de 2005 de 108 µg.L<sup>-1</sup> y en diciembre de 2005 de 81.8µg.L<sup>-1</sup> dichos períodos de máxima concentración de clorofila corresponden a los máximos encontrados en cianobacterias indicando que el elevado nivel de clorofila se asocia con la concentración de bacterias fotosintéticas como son las cianobacterias. Es importante recalcar que es probable que las condiciones del Río de la Plata se están viendo deterioradas con los años mostrando diferencias en el contenido de clorofila que pasa de valores de 15 µg.L<sup>-1</sup> (ambiente mesotrófico según Informe de Calidad de Aguas años 1993-1994 (CAFCS) a valores de 208µg.L<sup>-1</sup> (ambiente hipertrófico en diciembre 2005) en este trabajo.

En los meses donde se hicieron presentes los florecimientos de cianobacterias se logró el aislamiento y cultivo en medio Z8 de uno de los principales géneros, *Microcystis aeruginosa*. Asimismo, se realizó el ensayo de toxicidad de ratón sobre la cepa indicándose que los ratones inyectados intraperitonealmente con 1ml de extracto de células de *Microcystis aeruginosa* murieron en 40 ± 2 minutos después de la inyección. La necropsia de los ratones muertos reveló que los hígados presentaban hemorragias y el peso de los hígados fue 57±5 % mayor que los correspondientes a los controles inyectados con solución salina, lo que nos confirma el alto grado de toxicidad de los florecimientos algales del Río de La Plata observados en fechas de noviembre y diciembre de 2005.

No se manifestaron diferencias significativas (p<0.05) en la concentración de la toxina Microcistina-LR entre las aéreas muestreadas y del mes de junio a octubre de 2005 no fue detectada. Sin embargo, altos niveles de Microcistina-LR fueron observados en diciembre de 2005 (8.6 µg.L<sup>-1</sup>) y en enero de 2006 (10.5 µg.L<sup>-1</sup>) en los puntos de muestreo.

Los niveles de Microcistina –LR en muestras de de aguas correspondientes a red domiciliaria indicaron que en determinados lugares y fechas valores máximos de  $6.07 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Este valor supera el valor guía de la Organización Mundial de la Salud que establece  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , con lo se concluye que su presencia representa un riesgo a la salud si estas toxinas ingresan al organismo por diversas vías.

El análisis de componentes principales (PC1) mostro que los coliformes, Células fitoplanctónicas, *Microcistis aeruginosa*, Microcistina, temperatura, clorofila y Fósforo, fueron factores influyentes en la calidad del agua de los puntos muestreados en el Río de La Plata. También, se puede inferir que Isla Santiago y Toma de agua se encuentran asociadas con las variaciones estacionales (temperatura) y coliformes.

El componente 2 (CP2) evidencia como factores influyentes en los puntos de muestreo a *Microcistis aeruginosa*, células fitoplanctónicas, Microcistina, nitritos y pH. Incluso, las células fitoplanctónicas y *Microcistis aeruginosa* resultaron ser los parámetros más importantes en dos puntos muestreados (Isla Santiago y Toma de agua).

El comportamiento de las variables estudiadas pudo ser también analizado en función de su variación estacional. Para los diferentes puntos de muestreo los datos fueron agrupados en clusters bien definidos, siendo el estival coincidente con florecimientos

## **9. BIBLIOGRAFIA**

- Abel, P.D. 1996. Water pollution Biology. Taylor & Francis, London, 286 pp.
- Alonso-Andicoberry, C., L. Garcia-Villada, V. Lopez-Rodas & E. Costas .2002. Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *The Veterinary Record* 151: 706-707.
- Alvarez-Cobelas, M., C.S. Reynolds, P. Sanchez-Castillo y J. Kristiansen, 1998. Phytoplankton and Trophic Status. *Developments in Hydrobiology*, Kluwer Acad. Publ., 372 pp.
- Amé, M.V.; Díaz, M.P. and Wunderlin, D.A. 2003. Occurrence Of Toxic Cyanobacterial Blooms In San Roque Dam (Córdoba–Argentina): A Field And Chemometric Study. *D.A. Environ. Toxicol.* 18(3): 192-201.
- Andrinolo, D., Pereira, P., Giannuzzi, L., Aura, C., Massera, S., Caneo, M., Caixach, J. Barco, M. And Echenique, R. 2007. Occurrence of *Microcystis aeruginosa* and microcystins in Río de la Plata River (Argentina). *Acta toxicol. Argent.* Vol. 15p.13-18.
- Andrinolo D. 2008. Microcystins in the drinking water supply in the cities of Ensenada and La Plata (Argentina). *Applied Phycology: Annals of the 11th Brazilian Phycology Congress and Latin-American Symposium on Harmful Algae* 30:141- 26 148.
- Ann J and Carmichael WW. 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked inmuno sorbent assayfor the study of microcystins and nodularins. *Toxicon*, 32, 1495-1507.
- APHA. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (18<sup>th</sup> edn), American Public Health Association, Washington, DC. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, N 2, 797–800.
- APHA, AWWA WEF. 1998. Standard Methods for the examination of water and wasfewater. 20 th edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Arenas PM. 2004. Relevamiento etnofarmacológico, análisis micrográfico y potenciales efectos fisiológicos de suplementos dietéticos conteniendo algas en su composición [tesis]. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.

- Arenas PM. 2009. Algas empleadas en la elaboración de suplementos dietéticos: abordaje etnobotánico en algunas áreas urbanas de argentina. En: Arenas PM, editor. Etnoficología aplicada: estudio de casos en relación a la salud y la alimentación en ambientes rurales y urbanos. San Salvador de Jujuy: Cyted – Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; p. 69-159.
- Arrigo KR. 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*. 437: 349-355.
- Aubriot L, Bonilla S, Kruk C. 2009. Cianobacterias: Factores que regulan su crecimiento Cap.2. En *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Bonilla Ed. Programa hidrológico Internacional de la UNESCO para America Latina y el Caribe; p.5-11.
- Aubriot L. 2008. Flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones en el suministro del nutriente. Tesis de Doctorado. PEDECIBA Biología, Opción Ecología. Montevideo, Universidad de la República: p.130.
- Azevedo, S. M, Carmichael W., Jochimsen E., Rinehart K., Lau S., Shaw G. and Eaglesham G. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru/Brazil. *Toxicology* 181/182: 441-446
- Babica P., Blaha L., Marsalek B. 2006. Exploring the natural role of microcystins - review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* 42(1): 9-20.
- Bain, M.B. and Stevenson N. 1999. Aquatic habitat assessment: common methods. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Basurto Peña F. 2009.El tecuitatl o espirulina (*Arthrospira maxima* Setchell & Gardner): alimento prehispánico con potencial a futuro. En: Arenas PM, editor. Etnoficología aplicada: estudio de casos en relación a la salud y la alimentación en ambientes rurales y urbanos. San Salvador de Jujuy: Cyted – Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; p. 43-68.
- Blomqvist P, Pettersson A, Hyenstrand P. 1994. Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Archiv für Hydrobiologie*. 132: 141-164.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J. 1985. Introduction to the Algae. Structure and reproduction. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 720 pp.

Bourke A.T.C, Hawes R.B, Neilson A. and Stallman N.D. 1983. An outbreak of hepato-enteritis (The Palm Island mystery disease) possibly caused algal intoxication. *Toxicon* Suppl.3, 45-48.

Briand, J.F., Leboulanger C., Humbert J. F., Bernard C. and Dufour F. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology* 40: 231-238

Carmichael W.W, Falconer I.R. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. En: Falconer I.R, editor. *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press; p. 187-209.

Carmichael, W.W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Sci Am*. Jan Vol. 270:78-86

Carmichael, W.W. 1996. Liver failure and human deaths at a haemodialysis centre in Brazil: microcystins as a major contributing factor. *Harmful Algae News* 15:11.

Carmichael, W. W., Azevedo S. M., An J. S., Molica R. J., Jochimsen E. M., Lau S., Rinehart K. L., Shaw G. R. and Eaglesham G. K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.*, 109: 663–668.

Carmichael, WW. 2008. A world overview — one-hundredtwenty-seven years of research on toxic cyanobacteria — where do we go from here? En: Kenneth H, Hudnell H, editores. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer Science + Business Media; p. 105-26.

Carlson, R.E. 1977. A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanogr.* 22(2):361-369.

Carpenter S.R., Caraco N. F., Correll D. L., Howarth R. W., Sharley A. N. and Smith V. H. 1998. Nowpoint pollution of surface waters with phosphores and nitrogen. *Ecological Application* 8, 559-568.

Carrasco D, Moreno E., Paniagua T., De Hoyos C., Wörmer L., Sanchis D., Codd G., Quesada A. 2006. Anatoxina-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in Spanish reservoirs. *Journal of Phycology*, 25. 4:25-39.

Castro, D., Vera D., Lagos L., Garcia C. and Vasquez M. 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 44: 483-489.

- CEAMSE (Coordinación Ecológica Área Metropolitana Sociedad del Estado). 1993. Propuesta para el Saneamiento de la Cuenca del Río Matanza-Riachuelo. Buenos Aires, Argentina.
- Chang, R. 2003. Química, Mc Graw Hill, 7ma ed, México. pp. 8-10, 106, 468-470.
- Chorus, I. 2001. Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences. (editor) Springer, Berlin, Germany.
- Chorus, I. and Bartram J. 1999. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, Chapman and Hall. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resourcesquality/toxiccyanbact/en/:416](http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxiccyanbact/en/:416)
- Codd, G.A. 1994. Blue-green algal toxins: water-borne hazards to health. in Golding A.M.B., Noah N. and Stanwell-Smith R. Eds., *Water and Public Health*, pp 271-278. Smith-Gordon, UK.
- Consejo Permanente para el Monitoreo para la Calidad del Agua de la Franja Costera Sur del Río de la Plata 1997. Calidad de las aguas de la franja costera sur del río de la Plata. Secretaría de Obras Públicas, Buenos Aires.
- Cox, P. A., Banack B., Murch S. J, Rasmussen U., Tien G., Bidigare R. R., Metcalf J. S., Morrison L. F., Codd G. A. and Bergman B. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy Society* 102: 5074- 5078
- Cronberg, G., Annadotter, H., Lawton, L.A., Hansson, H.-B., Göthe, U., Skulberg, O.M. 1997: A large outbreak of gastroenteritis associated with the toxic cyanobacterium *Planktothrix (Oscillatoria) agardhii*. *Proceedings of the 1st international symposium on toxic Cyanobacteria. Phycologia*.
- Cybis, L. F., Bendati M. M., Marodin Maizonave C. R, Werner V. R. and Domingues C. D. 2006. Manual para estudo de cianobacterias planctonicas em mananciais de abastecimento publico: Caso da represa Lomba do Sabao e lago Guaiba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Porto Alegre, PROSAB: 144pp.
- De Leon, L. and Yunes Y. 2001. First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River. *Environmental Toxicology and Water Quality* 16: 110-112.
- De Leon, L., Brugnoli E., Gorga J., Paradiso J. and Conde D. 2002. Informe Técnico. VI Muestreo de calidad de agua en los embalses del Rio Negro (Enero 2002). Montevideo, Universidad de la Republica: 19pp.

- Dias, E., Andrade M. , Alverca E., Pereira E., Batore M. C., Jordan P. and Silva M. J. 2009. Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicon* 53: 487-495
- Dillenberg H.O. and Dehnel M.K. 1960. Toxic waterbloom in Saskatchewan 1959. *Can Med Assoc J*; 83:1151-1154.
- Dokulil, M. T. and Teubner K. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiol.* 438: 1-12.
- Dyble, J., Tester P. A. and Litaker R. W. 2006. Effects of light intensity on cylindrospermopsin production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. *African Journal of Marine Science* 28: 309-312
- Echenique R.; L. Giannuzzi; L. Ferrari y D. González. 2003, Estudios sobre la calidad del agua de red en Bahía Blanca, Argentina, 13º Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente, Buenos Aires, Argentina, 9 al 11 de septiembre.
- Echenique R, Giannuzzi L, Ferrari L. 2006. Drinking water: problems related to water supply in bahía blanca, Argentina. *Acta toxicol. Argent.* 14 (2): 2-9.
- Echenique R., Rodríguez J., Caneo M., Gianuzzi L., Barco M., Rivera J., Caixach J. and Andrinolo D. 2008. Microcystins in the drinking water supply in the cities of Ensenada and La Plata (Argentina). *Anais do XICBFic Livros do Museu Nacional, Brasil* 2008, 125-129.
- Echenique R. y Aguilera A., 2009. Cianobacterias y Cianotoxinas. Identificación, Toxicología, Monitoreo y Evaluación de riesgo. Moglia Ediciones. Corrientes, Argentina: 2009 p. 238
- Edge, R., McGarvey D. J. and Truscott T. G. 1997. The carotenoids as anti-oxidants-a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41: 189-200.
- Edwards, C., Graham D., Fowler N. and Lawton N. A. 2008. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere* 73: 1315-1321.
- Edwards, C., Lawton, L.A., Beattie, K.A., Fawell, J.K. y Codd, G.A. 1991. Separación y caracterización de las toxinas cyanobacterial del peptide por cromatografía líquida de alto rendimiento del arsenal del fotodiodo. *Br. Phycol. J.*, 26:84 – 85.
- Falconer, I. R. 1993. *Algal toxins in seafood and drinking water*, Academic Press, London.

- Falconer, I.R. 1994. Health problems from exposure to Cyanobacteria and proposed safety guidelines for drinking and recreational water, 3-10. In: Codd, G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W. and Potter, E. (eds.): Detection Methods for Cyanobacterial Toxins. The Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85186-961-0, 191pp.
- Falconer, I. 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ. Toxicol.* 14:5-12
- Fastner J., Erhard M., von Dohren H. 2001. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix assisted laser desorption ionization time of light mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, pp. 5069-5076.
- Flory, L. J. 1997. La Contaminación del Agua en el Área Metropolitana. Instituto Argentino de la Energía "General Mosconi", Buenos Aires, Argentina.
- Fogg G.E., Stewart W.D.P., Fay P. and Walsby A.E. 1973. The blue-green algae. London & New York: Academic press.
- Foguet, J. M. 1989. Análisis multivariante: análisis de componentes principales. (Colección ESADE). Editorial Hispano Europea S.A., Barcelona, España.
- Forsgren, G. and Jansson, M. 1992. The turnover of river-transported iron, phosphorus and organic carbon y Öre estuary, northern Sweden. *Hydrobiology* 235/236: 585-596.
- FWR (2005). The Water Framework Directive-A Summary, Foundation for Water Research
- Francis, G. W., Hertzberg, S. Andresen K. and Liaan-Jensen S. 1970. New Carotenoid glycosides from *Oscillatoria limosa*. *Phytochemistry* 9: 629-635
- Gago-Martinez A., Piñeiro N., Aguete E.C., Vaquero E., Nogueiras M., Leao J.M., Rodriguez-Vasquez J.A., Dabek-Zlotorzynska E. 2003. Further improvements in the application of high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and capillary electrochromatography to the analysis of algal toxins in the aquatic environment. *J Chromatography A* 992: 159-168.
- Garbisu C, Blanco A, Alkorta I, Llama M.J and Serra JL. 1999. Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y Ciencia*. 64- 71

- García Pichel, F. and Castenholz R. 1991. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology* 27: 395 – 409
- Garibay Hernández A., Vázquez-Duhalt R., Sánchez Saavedra M., Serrano Carreón L., Martínez Jiménez A. 2009. Biodiesel a Partir de Microalgas. *BioTecnología*. 13 (3): 38-61
- Giannuzzi, L. 2009. Cianobacterias y cianotoxinas: identificación, toxicología monitoreo y evaluación de riesgo. *Corrientes, Moglia Impresiones*: 238pp
- Gómez, N.Y and Bauer D. E. 2000. Diversidad fitoplanctónica en la franja costera sur del río de La Plata. *Biología Acuática* 19: 7-26.
- Gorham, P.R. and Carmichael W.W. 1980. Toxic substances from fresh-water algae. *Progr. Water Technol.* 12:189-198.
- Gorham, P.R. and Carmichael W.W. 1988. Hazards of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). in Lembe, C. A. and Waaland, J. R. Eds., *Alg. Hum. Aff.* 403-431. Cambridge University Press, Cambridge.
- Graham L.E., Graham J.M., Wilcox L.W. 2009. *Algae*. San Francisco, Benjamin Cummings
- Graham L.E. and Wilcox L.W. 2000. Cyanobacteria (Chloroxybacteria). En: Gram LE, Wilcox LW, editores. *Algae*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall; p. 97-131.
- Guarrera, S.A. 1950. Estudios hidrobiológicos en el Río de la Plata. *Mus. Arg. C. Nat. B. Rivadavia, Cienc. Bot.* 1-62.2 (1).
- Haande, S., Rohrlack T., Balot, A. Roberg, K., Silkulberg, R. Beck R. and Wiedner C. 2008. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 7: 692 - 701
- Hallegraeff G.M, 1992. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32 (2):77-99.
- Harada K, Kondo F. and Lawton L. 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: Toxic Cyanobacteria in water. [Eds] Ingrid Chorus and Jamie Bartram. World health organization and E&FN SPON.
- Hee-Mock O.H., Seog June L., Min-Ho J. and Byung-Dae Y. 2000. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus- Limited Chemostat, *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 176-179.

- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E. 2001. Nitrogen Control in Cyanobacteria, *J. Bacteriol.*, 183: 411-425.
- Hockelmann, C., Becher P. G., von Reuss S. H. and Juttner F. 2009. Sesquiterpenes of the geosmin producing cyanobacterium *Calothrix* PCC 7507 and their toxicity to invertebrates. *Zeitschrift für Naturforschung C* 64: 49-55
- Hoiczky, E. and Hansel, A. 2000. Cyanobacterial Cell Walls: News from an unusual Prokaryotic Envelope, *J. Bacteriol.*, 182: 1191-1199.
- Holtan H, Kamp-Nielsen L and Stuanes A. 1988. Phosphorus in soil, water and sediment: an overview. *Hydrobiologia*, 170:19-34.
- Humpage, A. 2008. Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. En: Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. RTP North
- Hyenstrand P, Blomqvist P, Petterson A. 1998. Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems: a literature review, *Archiv für Hydrobiologie Special Issues Advances in Limnology*. 51: 41 - 62.
- Jang, M.H., Jung J. M. and Takamura N. 2007. Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and infochemical concentrations. *Limnology and Oceanography* 52: 1454 - 1466
- Jeffrey, S.W. and Humphrey G.F. 1975. New spectrophotometric equations go determining chlorophylls a, b and c in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167:191.
- Jeffrey, S.W. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography. Monographs on oceanographic methodology. Mantoura & S. W. Wright (Eds)
- Jochimsen, E. M., Carmichael W.W., An J. S., Cardo D. M., Cookson D. M. Holmes, C. M. Antunes C. m. de Melo Filho D. A., Lyra, T. M., Barreto, Azevedo S.M. and Jarvis W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.*, 338: 873–878.
- Johnson R.A. and Wichern D.W. 1982. Applied multivariate statistical analysis. U. Wisconsin, Madison. Prencite Inc., 594 p.

- Juttner, F. and Watson S.B. 2007. Biochemical and ecological control of off-flavours of aquatic cyanobacteria and algae. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(14):4395-4406.
- Karl D, Michaels A, Bergman B y col. 2002. Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry.* 57: 47-98.
- Kirk, J.T.O. 1994. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge, Cambridge University Press: 509pp.
- Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokaryota 1: Chroococcales. 1998. En: Ettl H, Gartner HG, HeynGig H, Mollenhauer D, editores. Süßwasserflora von mitteleuropa. Heidelberg & Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Konst, H., McKercher, P.D., Gorham, P.R., Robertson, A., and Howell, J. 1965. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals, *Can J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 29: 221.
- Kotai, J. 1972. Instruction for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. NIVA B-11/69. Norwegian Institute for Water Research,Oslo.
- Kotak, B.G., Kenefick, S.L., Fritz, D.L., Rouseaux, C.G., Prepas, E.E. and Hrudey, S. 1993. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Wat. Res.* 27 7pp. 495- 506.
- Lam, A.K., Prepas, E.E., Spink, D. and Hrudey, S.E. 1995. Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. *Water Research*, 29, 8, 1995, pp. 1845-1854.
- Lawton L., Edwards C., Codd G.A., 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*, 119:1525.
- Leflaive, J. and Ten-Hage L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52: 199-214.
- Long B.M., Jones G.J., Orr P.T. 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology.* 67(1):278-283.
- Lukac, M., and Aegerter R.. 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31:293-305.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 1999. Brock, Biología de los Microorganismos. Octava edición revisada (Cuarta reimposición: 2001), Prentice Hall, Iberia, Madrid.
- Margalef, R. 1983. Limnología. Barcelona, Omega: 1010pp.
- Margalef, R. 1991. Ecología. Ed. Omega. 951 págs.
- Martín, M y Pila, M. 2007. Informe de aguas y Salud Publica. Plan nacional de Salud y Medio Ambiente. Resumen Ejecutivo. 11p.
- Martínez, R. E., Martínez S. M. A. and Ramírez G. P. 2002. Determinación de toxinas biológicas en una fuente de abastecimiento de agua dulce. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún, México. Octubre 2002.
- Meerhoff, M., Clemente J. M., Teixeira-de Mello F., Iglesias C., Pedersen A. R. and Jeppesen A.E. 2007a. Can warm climate-related structure of littoral predator assemblies weaken the clear water state in shallow lakes. *Global Change Biology* 13: 1888–1897.
- Meichtry, J.M., Lin, H., de la Fuente, L., Levy, I.K., Gautier, E.A., Blesa, M.A., Litter, M.I., 2007. Low-cost TiO<sub>2</sub> photocatalytic technology for water potabilization in plastic bottles for isolated regions. *Photocatalyst fixation, J. Solar Energy Eng.*, 129, 119-126.
- Mochida, K. 2009. Evaluation of the cytotoxicity of geosmin and 2-methylisoborneol using cultured human, monkey, and dog cells. *Biocontrol Science* 14: 35-38
- Moss, B. 1998. Ecology of freshwaters. Oxford, Blackwell: 557pp.
- Mullor, J.B. 1945. Toxic algae (Algas toxicas). *Rev. Sanid., Asist. Social Trabajo* 1:95. Keywords: cyanotoxin. (Spanish).
- Neehring N. 1993. Mortality of dogs associated with a mass development of *N. spumigena* in a brackish lake at the German North Sea Coast. *J. Plankton Res.* 15(7): 867-872.
- Nemerow, N.L. y Dasgupta, A. 1998. Tratamiento de Vertidos Industriales Y Peligrosos. Ed. Díaz De Santos. Ramalho, R. S.
- Odrizola, E., Ballabene, N. y Salamanco, A. 1984. Intoxicación en ganado bovino por algas verde-azuladas. *Revista Argentina de Microbiología* 16:219-224.

- Oh, H.M., Lee S.J., Kim, J.H. Kim, H.S. and Yoon, B.D. 2001. Seasonal variation and indirect monitoring of microcystin concentrations in daechung reservoir, Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1484-1489.
- Oliver R.L., Ganf G.G.. 2000. Freshwater blooms. En: BA W, M P, editores. *The ecology of cyanobacteria*. The Netherlands: Kluwer Acad. Publishers; p. 149-94.
- OMS. 1998. Guías para ambientes seguros en aguas recreativas. Vol. 1: Aguas costeras y aguas dulces. Versión preliminar.
- Osborne, N.J.T., Webb P. and Shaw G. R. 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environment International* 27: 381-392
- Ott J. and Carmichael W.W. 2006. LC/ESI-MS Method Development for the Analysis of Hepatotoxic Cyclic Peptide Microcystins in Animal Tissues. *Toxicon*.
- Paerl, H.W. and Huisman J. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* 1:27-37.
- Palmetier J., Vince Y., Taguchi S., Jenkins W., Wang D., Nuo K. and Robinson D. 1998. The determination of geosmin and 2 – methylisoborneol in water using isotope dilution high resolution mass spectrometry. *Wat. Res.*, 32(2), 287 – 294. Paris, UNESCO: 661pp.
- Park Y.S., Kwak J.M., Kwon O.Y., Kim Y.S., Lee D.S., Cho M.J., Lee H.H. and Nam H.G. 1993. Generation of expressed sequence tags of random root cDNA clones of *Brassica napus* by single-run partial sequencing. *Plant Physiol.* 103: 359-370.
- Parra O., Avilés D., Becerra J., Dellarossa V. and Montoya R. 1986. First toxic blue-green algal bloom recorder for Chile: A preliminary report. *Gayana Bot.*; 43(1-4): 15-17
- Pedrozzo, F. and Boneto, C. 1991. Nitrogen and Phosphorus in Chaco Plain waterbodies. *Medio ambiente* 11:96-106.
- Perez, P.F., Constanza, O.R., Garre, M., Morelli I., Martinez, A., Vecchiolo, G. I., Paineira, M. T. 1993. Resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de aguas del Río de La Plata. *Revista Argentina de Microbiología*. Aregentina: , v.25, n.1, p.7 - 14.
- Pflugmacher S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology* 17: 407-413.

- Pierce R.H. and J. Kirkpatrick. 2001. Innovative techniques for harmful algal toxin analysis. Annual review. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 20, nº1, pp: 107-114.
- Pilotto, L.S., Douglas, R.M., Burch, M.D., Cameron, S., Beers, M., Rouch, G.R., Robinson, P., Kirk, M., Cowie, C.T., Hardiman, S., Moore, C. and Attwell, R.G. 1997. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) due to recreational water-related activities. Aust. N. Zealand J. Public Health, 21, 562-566.
- Potts M. 2000. Nostoc. En: Whitton B, Potts M, editors. The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; p. 465-504.
- Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R., Barreto, V., Ward, C., Preiser, W., Poon, G., Neild G. and Codd, G. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, Lancet., 325: 21-26.
- Quesada, A., Sanchis D. and Carrasco D. 2004. Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? Limnetica 23: 109-118
- Ramírez, G.P., Martínez, R.E. and Martínez, S.M. 2001. Identification and Quantification of Cyanotoxins by HPLC in a Water supply reservoir. En: Memories of Congress Biomarkers of Environmental Contamination. Póvoa de Varzim, Portugal. September 24-26.
- Redfield A.C. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. American Scientist. 46: 205-222.
- Reynolds C.S. 2006. Ecology of phytoplankton. Cambridge, Cambridge University Press; p. 550.
- Reynolds, C.S. and Walsby A.E. 1975. Water-blooms, Biol. Rev., 50: 437-481.
- Ringuelet R. 1955. Panorama zoogeográfico de la provincia de Buenos Aires. Notas del Museo, Zoología 18(156):1-45
- Río de la Plata, Calidad de las Aguas, Franja Costera Sur (San Fernando – Magdalena)  
AGOSBA – OSN – SIHN. Edición 1992.
- Rohrlack T., Dittmann E., Henning M., Borner T., Kohl J.G. 1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. 65:737-739.

- Rosales-Loaiza N., Guevara M., Lodeiros C., Morales E. 2008. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Rev. Biol. Trop.* 56 (2): 421-9.
- Ross, C., Santiago-Vazquez L. and Paul V. 2006. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 78: 66-73
- Scheffer, M. 2007. Shallow lakes theory revisited: various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth and lake size. *Hydrobiologia* 584: 455-466.
- Scheurs, H. 1992. Cyanobacterial dominance, relation to eutrophication and lake morphology. Thesis, University of Amsterdam. Holland.
- Schopf, J.W. and Walter, M.R. 1982. Origin and Early Evolution of Cyanobacteria: the Geological Evidence, in *The Biology of Cyanobacteria*, Blackwell Scientific Publications, Chapter 21, pp. 543-564.
- Schwimmer, M. and Schwimmer, D. 1968. Medical aspects of phycology. In: D. F. Jackson (ed.), *Algae, Man and the Environment*. Syracuse University Press, New York: 279–358
- Shapiro, J. 1990. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO<sub>2</sub> and pH. *Verh. Intern. Verein. Limnol.* 24:38-54.
- SRH (Secretaría de Recursos Hídricos de la Cuenca del Plata). 1992. Selección de los niveles guía de calidad del agua en función de los diferentes usos del recurso. La Plata, Argentina.
- Silva, J.H., Luco, J.M., Gonzalez, D.M. y Baudino, O.M. 1995. Detección de compuestos biogénicos-volátiles en un lago eutrófico de San Luis-Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 3:38-42.
- Sivonen, N. Kaarina. M. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 35(& Suppl.):12-24.
- Sivonen K and Jones G. 1999. Cyanobacterial toxins. En: Chorus I, Bartram J, editores. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: St Edmundsbury Press; p. 41-112.
- Smayda, T. 1997. What is a bloom? *Limnology and Oceanography* 42: 1132-1136.
- Smith L, Boyer G, Zimba P.V. 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*. 280: 5–20.

- Sommaruga, R., Chen Y. and Liu Z. 2008. Multiple Strategies of Bloom-Forming Microcystis to Minimize Damage by Solar Ultraviolet Radiation in Surface Waters. *Microbial Ecology* doi: 10.1007/s00248-008-9425-4.
- Stewart, I., Seawright A.A. and Shaw G. R. 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds--an overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619: 613-637.
- Subrahmanyam, R. and Manna G. H. 1966. Relative response of the rice plant to blue-green algae and ammonium sulphate in bulk trials. *Curr. Sci.* 35: 482-483.
- Suikkanen, S., Fistarol G.O and Graneli E. 2005. Effects of cyanobacterial allelochemicals on a natural plankton community. *Marine Ecology Progress Series* 287: 1 – 9.
- Svircev, Z., Krstic, S. Miladinov-Mikov, M. Baltic V. and Vidovic M. 2009. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health - Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 27:36-55.
- Teixeira M.G., Costa Mda.C., Carvalho V.L.P., Pereira M.S. and Hage E. 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 27: 244-253.
- Tisdale, E.S. 1931. Epidemic of intestinal disorders in Charleston, W. Va., occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. *Am. J. Public Health* 21, 198-200.
- Thomas, A. D., Saker, H. L., Norton H. J. Olsen, R. D. 1998. Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland. *Australian Veterinary Journal* 76: 592-594
- Torres-Ariño, A. 2004. Uso de cianobacterias en la producción de antibióticos. *Ciencia y Mar.* 43-52.
- Turner, P.C., Gammie, A.J., Hollinrake, K., Codd, G.A. 1990. Pneumonia associated with cyanobacteria. *British Medical Journal*, 300:1440-1441.
- Ueno Y., Nagata S., Tsutsumi T., Hasegawa A., Watanabe M.F., Park H.D., Chen G.C., Chen G., YU S.Z. 1996. Detection of Microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17: 1317-1321

- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt int. Ver. Limnol., 9: 1-38.
- Utkilen, H. and Gjølme, N. 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Apl. Env. Microb.* 58(4): 1321-1325.
- Utkilen, H. and Gjølme, N. 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*.
- Van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers J.A. and Bakker, G. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research* 51: 7- 60.
- Vargas, C, Rojas, R. y Joseli, J. 1996. Control y Vigilancia de la Calidad del Agua de Consumo humano. *Textos Completos. CEPIS*; 27p.
- Varkonyi, Z., Masamoto, K., Debreczeny, M., Zsiros, O., Ughy, B., Gombos, Z., Domonkos, I., Farkas, T., Wada H., and Szalontai H. 2002. Lowtemperatureinduced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium. *Cylindrospermopsis raciborskii*: An FTIR spectroscopic study. *Proceedings of the National Academy Society* 99: 2410-2415.
- Vezie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K. 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology.* 43: 443-454.
- Vidal, L. and Kruk C. 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 3: 142-151
- Vincent, W.F. 2000. Cyanobacterial dominance in the polar regions. En: *Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space.* B. Whitton and M. Potts (Eds.) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 321-338.
- Vollenweider, R.A. and Kerekes J. 1982. *Eutrophication of Waters. Monitoring Assessment and Control.* Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), Paris. 156 p.
- Watanabe, M., Harada, K., Carmichael W. and Fujiki, H. 1995. *Toxic Microcystis.* CRC Press. 258 pp.
- Wetzel, R.G. 2001. *Limnology.* Academic Press, New York. 1006 p.

Whitton, B. and Potts M. 2000. *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 669pp.

WHO (International Standards for Drinking-water). 1998. Guidelines for drinkingwater quality. Segunda edición. Addendum to Volume 1, Recommendations. World Health Organization, Ginebra.

Wunderblin, D., Diaz, M., Amé, M., Pesce, S., Hued, A. and Bistoni, M. 2001. Pattern Recognition Techniques for the Evaluation of Spatial and Temporal Variations in Water Quality. A case Study: Suquía River Basin. Córdoba, Argentina. *Water Research* 35:2881-2894.

Zohary, T. and Robarts, R.D. 1990 Hyperscums and populations dynamics of *Microcystis aeruginosa*, *J. Plankton. Res.*, 12: 423.

## **10. ANEXO**

## Variación de la temperatura en función del tiempo en los diferentes puntos de muestreo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	116.0	23.2	1.35
feb-05	5	145.9	29.2	1.08
mar-05	5	123.5	24.7	1.30
abr-05	5	108.5	21.7	0.45
may-05	5	106.0	21.2	0.67
jun-05	5	76.0	15.2	0.45
jul-05	5	67.5	13.5	0.71
ago-05	5	58.5	11.7	0.45
sep-05	5	91.5	18.3	1.35
oct-05	5	116.5	23.3	2.11
nov-05	5	125.0	25.0	2.55
dic-05	5	116.0	23.2	0.45
ene-06	5	139.0	27.8	2.05
feb-06	5	130.5	26.1	1.43
LA	14	298.5	21.3	5.14
LS	14	299.5	21.4	5.23
RT	14	324.0	23.1	6.02
TA	14	298.0	21.3	5.32
IS	14	300.4	21.5	5.05

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo (Meses)	1803.82	13	138.76	109.03	6.14E-33	1.91
Puntos de Muestreo	35.67	4	8.92	7.01	1.37E-04	2.55
Error	66.17	52	1.27			
Total	1905.67	69				

MDS o LSD **0.86**

LA - LS	-1.00	si
LA - RT	-1.82	si
LA - TA	0.50	no
LA - IS	-0.14	no
LS - RT	-1.75	si
LS - TA	1.50	si
LS - IS	-0.06	no
RT - TA	1.86	si
RT - IS	1.69	si
TA - IS	-0.17	no

Áreas	Promedios	Letras
LA	21.32	a
LS	21.39	b
RT	23.14	c
TA	21.29	a
IS	21.46	a, b
LSD	0.86	

## Variación del pH en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	41.83	8.37	0.51
feb-05	5	40.37	8.07	0.12
mar-05	5	41.55	8.31	0.11
abr-05	5	48.67	9.73	0.19
may-05	5	44.26	8.85	0.05
jun-05	5	38.71	7.74	0.07
jul-05	5	42.78	8.56	0.46
ago-05	5	40.50	8.10	0.09
sep-05	5	38.09	7.62	0.17
oct-05	5	41.49	8.30	0.47
nov-05	5	41.35	8.27	0.14
dic-05	5	41.36	8.27	0.99
ene-06	5	42.04	8.41	0.51
feb-06	5	42.37	8.47	0.97
LA	14	120.84	8.63	0.61
LS	14	120.48	8.61	0.40
RT	14	116.30	8.31	0.45
TA	14	112.31	8.02	0.36
IS	14	115.44	8.25	0.65

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo (Meses)	16.44	13	1.26	4.18	1.02E-04	1.91
Puntos de Muestreo	3.70	4	0.92	3.06	2.46E-02	2.55
Error	15.73	52	0.30			
Total	35.86	69				

MDS o LSD 0.42

LA - LS	0.03	no
LA - RT	0.32	no
LA - TA	0.61	si
LA - IS	0.39	no
LS - RT	0.30	no
LS - TA	0.58	si
LS - IS	0.36	no
RT - TA	0.28	no
RT - IS	0.06	no
TA - IS	-0.22	no

Areas	Promedios	Letras
LA	8.63	a
LS	8.61	a
RT	8.31	a
TA	8.02	b
IS	8.25	a
LSD	0.42	

### Variación de la conductividad en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	2351	470.2	48928.7
feb-05	5	2467	493.4	44966.8
mar-05	5	2397	479.4	47475.3
abr-05	5	2335	467	43154.5
may-05	5	2327	465.4	37438.8
jun-05	5	2511	502.2	19529.7
jul-05	5	2422	484.4	21264.3
ago-05	5	2261	452.2	28065.7
sep-05	5	2518	503.6	19938.8
oct-05	5	2306	461.2	30771.7
nov-05	5	2104	420.8	49225.7
dic-05	5	2544	508.8	57122.2
ene-06	5	2722	544.4	47458.3
feb-06	5	2129	425.8	22828.7
LA	14	8314	593.857143	6779.51648
LS	14	10310	736.428571	7030.72527
RT	14	4945	353.214286	4111.87363
TA	14	4518	322.714286	2312.68132
IS	14	5307	379.071429	4993.91758

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	70756.97143	13	5442.84396	1.10034967	0.37970334	1.91345502
Columnas	1815460.486	4	453865.121	91.755402	6.5168E-23	2.54976297
Error	257216.3143	52	4946.46758			
Total	2143433.771	69				

MDS o LSD

53.34

LA - LS	-142.57	si
LA - RT	240.64	si
LA - TA	271.14	si
LA - IS	214.79	si
LS - RT	383.21	si
LS - TA	413.71	si
LS - IS	357.36	si
RT - TA	30.50	no
RT - IS	-25.86	no
TA - IS	-56.36	si

Áreas	Promedios	Letras
LA	593.86	a
LS	736.43	b
RT	353.21	c, d
TA	322.71	c
IS	379.07	d
LSD	53.34	

### Variación del Hierro en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	1.62	0.32	0.08
feb-05	5	1.31	0.26	0.04
mar-05	5	0.54	0.11	0.01
abr-05	5	1.32	0.26	0.03
may-05	5	1.58	0.32	0.06
jun-05	5	1.55	0.31	0.09
jul-05	5	1.86	0.37	0.13
ago-05	5	1.16	0.23	0.06
sep-05	5	1.20	0.24	0.07
oct-05	5	1.81	0.36	0.04
nov-05	5	1.30	0.26	0.05
dic-05	5	1.13	0.23	0.04
ene-06	5	0.25	0.05	0.00
feb-06	5	2.46	0.49	0.06
LA	14	2.36	0.17	0.06
LS	14	1.74	0.12	0.03
RT	14	4.77	0.34	0.02
TA	14	4.95	0.35	0.06
IS	14	5.27	0.38	0.06

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo (Meses)	0.77	13	0.06	1.37	2.07E-01	1.91
Puntos de Muestreo	0.77	4	0.19	<b>4.44</b>	3.69E-03	<b>2.55</b>
Error	2.25	52	0.04			
Total	3.79	69				

MDS o LSD **0.16**

LA - LS	0.04	no
LA - RT	-0.17	si
LA - TA	-0.19	si
LA - IS	-0.21	si
LS - RT	-0.22	si
LS - TA	-0.23	si
LS - IS	-0.25	si
RT - TA	-0.01	no
RT - IS	-0.04	no
TA - IS	-0.02	no

Áreas	Promedios	Letras
LA	0.17	a
LS	0.12	a
RT	0.34	b
TA	0.35	c, b
IS	0.38	d, b
LSD	<b>0.16</b>	

### Variación del fósforo en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	2.86	0.57	0.14
feb-05	5	3.14	0.63	0.08
mar-05	5	3.36	0.67	0.10
abr-05	5	3.30	0.66	0.12
may-05	5	3.23	0.65	0.15
jun-05	5	3.23	0.65	0.13
jul-05	5	3.70	0.74	0.12
ago-05	5	2.73	0.55	0.21
sep-05	5	0.29	0.06	0.00
oct-05	5	4.90	0.98	0.47
nov-05	5	3.01	0.60	0.10
dic-05	5	3.24	0.65	0.09
ene-06	5	1.62	0.32	0.01
feb-06	5	3.61	0.72	0.21
LA	14	12.86	0.92	0.17
LS	14	13.24	0.95	0.12
RT	14	6.27	0.45	0.09
TA	14	4.79	0.34	0.02
IS	14	5.06	0.36	0.02

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo (Meses)	2.84	13	0.22	4.36	6.50E-05	1.91
Puntos de Muestreo	5.14	4	1.29	25.61	9.30E-12	2.55
Error	2.61	52	0.05			
Total	10.60	69				

MDS o LSD **0.17**

LA - LS	-0.03	no
LA - RT	0.47	si
LA - TA	0.58	si
LA - IS	0.56	si
LS - RT	0.50	si
LS - TA	0.60	si
LS - IS	0.58	si
RT - TA	0.11	no
RT - IS	0.09	no
TA - IS	-0.02	no

Áreas	Promedios	Letras
LA	0.92	a
LS	0.95	a
RT	0.45	b
TA	0.34	c, b
IS	0.36	d, b
LSD	0.17	

## Variación del nitrato en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ene-05	5	16.22	3.24	1.54
feb-05	5	21.70	4.34	1.95
mar-05	5	19.55	3.91	2.81
abr-05	5	31.85	6.37	2.68
may-05	5	17.71	3.54	1.87
jun-05	5	10.75	2.15	1.05
jul-05	5	37.37	7.47	2.29
ago-05	5	17.74	3.55	2.33
sep-05	5	6.90	1.38	0.26
oct-05	5	16.40	3.28	2.22
nov-05	5	16.20	3.24	2.30
dic-05	5	45.10	9.02	2.07
ene-06	5	8.60	1.72	1.14
feb-06	5	14.30	2.86	1.04
LA	14	51.61	3.69	2.77
LS	14	53.15	3.80	3.07
RT	14	65.01	4.64	2.34
TA	14	58.75	4.20	3.15
IS	14	51.87	3.71	2.65

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tiempo (Meses)	309.37873	13	23.79836363	6.0513493	1.1105E-06	1.91345502
Puntos de Muestreo	9.5116914	4	2.377922857	0.6046484	0.6610206	2.54976297
Error	204.50231	52	3.932736703			
Total	523.39273	69				

### Variación del nitrato en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	0.675	0.135	0.009778
feb-05	5	0.822	0.1644	0.0542878
mar-05	5	1.19	0.238	0.039408
abr-05	5	1.448	0.2896	0.0642353
may-05	5	0.171	0.0342	0.0003907
jun-05	5	0.222	0.0444	0.0016778
jul-05	5	0.964	0.1928	0.0136067
ago-05	5	0.873	0.1746	0.0276298
sep-05	5	0.56	0.112	0.003926
oct-05	5	0.814	0.1628	0.0130057
nov-05	5	0.91	0.182	0.01807
dic-05	5	0.718	0.1436	0.0098383
ene-06	5	0.204	0.0408	0.0009317
feb-06	5	0.174	0.0348	0.0008427
LA	14	3.659	0.26135714	0.04094825
LS	14	1.323	0.0945	0.00647258
RT	14	1.455	0.10392857	0.00377161
TA	14	1.616	0.11542857	0.0107218
IS	14	1.692	0.12085714	0.02793967

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0.404511786	13	0.03111629	2.11900269	0.028396083	1.91345502
Columnas	0.266925	4	0.06673125	4.54436222	0.003187022	2.54976297
Error	0.763589	52	0.0146844			
Total	1.435025786	69				

MDS o LSD **0.091907313**

LA - LS	0.166857143	si
LA - RT	0.157428571	si
LA - TA	0.145928571	si
LA - IS	0.1405	si
LS - RT	-0.009428571	no
LS - TA	-0.020928571	no
LS - IS	-0.026357143	no
RT - TA	-0.0115	no
RT - IS	-0.016928571	no
TA - IS	-0.005428571	no

Áreas	Promedios	Letras
LA	0.26	a
LS	0.09	b
RT	0.10	b
TA	0.12	b
IS	0.12	b
LSD	0.23	

## Variación de los coliformes totales en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	20500	4100	959.17
feb-05	5	13900	2780	668.58
mar-05	5	11850	2370	164.32
abr-05	5	10150	2030	303.32
may-05	5	9300	1860	328.63
jun-05	5	8100	1620	268.33
jul-05	5	8700	1740	330.53
ago-05	5	9800	1960	151.66
sep-05	5	11200	2240	198.12
oct-05	5	10600	2120	261.25
nov-05	5	9850	1970	614.00
dic-05	5	14500	2900	824.62
ene-06	5	15300	3060	549.32
feb-06	5	12250	2450	165.83
LA	14	28400	2029	449.24
LS	14	32450	2318	824.53
RT	14	39000	2786	859.21
TA	14	30900	2207	771.58
IS	14	35250	2518	781.42

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo (Meses)	28334857	13	2179604	13.49	2.23E-12	1.91
Puntos de Muestreo	4766786	4	1191696	7.38	8.77E-05	2.55
Error	8401214	52	161562			
Total	41502857	69				

MDS o LSD **304.85**

LA - LS	-289.29	no
LA - RT	-757.14	si
LA - TA	-178.57	no
LA - IS	-489.29	si
LS - RT	-467.86	si
LS - TA	110.71	no
LS - IS	-200.00	no
RT - TA	578.57	si
RT - IS	267.86	no
TA - IS	-310.71	si

Áreas	Promedios	Letras
LA	2029	a
LS	2318	a, c
RT	2786	b
TA	2207	a
IS	2518	b, c
LSD	304.85	

## Variación de los coliformes fecales en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	19500	3900	1009.95
feb-05	5	11700	2340	134.16
mar-05	5	11400	2280	268.33
abr-05	5	10050	2010	292.40
may-05	5	9200	1840	313.05
jun-05	5	8100	1620	268.33
jul-05	5	7900	1580	189.08
ago-05	5	9500	1900	141.42
sep-05	5	11100	2220	207.97
oct-05	5	10150	2030	171.76
nov-05	5	9500	1900	506.21
dic-05	5	12750	2550	430.12
ene-06	5	11550	2310	387.94
feb-06	5	11450	2290	181.66
LA	14	27250	1946	375.94
LS	14	31250	2232	769.52
RT	14	34850	2489	705.52
TA	14	29650	2118	778.96
IS	14	30850	2204	493.99

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo (Meses)	20772179	13	1597860	13.20	3.36E-12	1.91
Puntos de Muestreo	2180571	4	545143	4.50	3.37E-03	2.55
Error	6294429	52	121047			
Total	29247179	69				

MDS o LSD **263.88**

LA - LS	-285.71	si
LA - RT	-542.86	si
LA - TA	-171.43	no
LA - IS	-257.14	no
LS - RT	-257.14	no
LS - TA	114.29	no
LS - IS	28.57	no
RT - TA	371.43	si
RT - IS	285.71	si
TA - IS	-85.71	no

Áreas	Promedios	Letras
LA	1946	a
LS	2232	b
RT	2489	c
TA	2118	a
IS	2204	a
LSD	<b>263.88</b>	

### Variación de cianobacterias totales en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ene-05	5	295840	59168	256.38
feb-05	5	192290	38458	110.00
mar-05	5	266410	53282	110.21
abr-05	5	223150	44630	68.97
may-05	5	109490	21898	109.60
jun-05	5	24730	4946	85.28
jul-05	5	10440	2088	22.60
ago-05	5	12380	2476	31.96
sep-05	5	258280	51656	287.41
oct-05	5	272400	54480	262.22
nov-05	5	114120	22824	83.81
dic-05	5	277740	55548	259.64
ene-06	5	152250	30450	78.32
feb-06	5	179600	35920	129.47
				0.00
LA	14	340410	24315	126.95
LS	14	351250	25089	129.47
RT	14	526180	37584	213.74
TA	14	527640	37689	220.69
IS	14	643640	45974	239.51

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Meses	2.739E+10	13	2106638972	1.36	0.21	1.91
Puntos de Muestreo	4.801E+09	4	1200329774	0.78	0.55	2.55
Error	8.04E+10	52	1546059351			
Total	1.126E+11	69				

### Variación de *Microcystis sp.* en función del tiempo

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ene-05	5	125120	25024	104.31
feb-05	5	140750	28150	70.20
mar-05	5	254200	50840	114.52
abr-05	5	220320	44064	67.73
may-05	5	83010	16602	84.44
jun-05	5	16540	3308	80.39
jul-05	5	4930	986	27.24
ago-05	5	2690	538	25.21
sep-05	5	4300	860	43.85
oct-05	5	185600	37120	267.45
nov-05	5	54050	10810	95.81
dic-05	5	70597	14119	104.11
ene-06	5	104720	20944	88.12
feb-06	5	145230	29046	114.28
				0.00
LA	14	249610	17829	128.09
LS	14	256002	18286	134.42
RT	14	242870	17348	142.27
TA	14	224785	16056	130.95
IS	14	438790	31342	203.69

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Meses	1.7565E+10	13	1351189670	3.24	1.26E-03	1.91
Puntos de Muestreo	2222284220	4	555571055	1.33	2.71E-01	2.55
Error	2.1707E+10	52	417446806			
Total	4.1495E+10	69				