

Cianobacterias y Cianotoxinas

Identificación,
Toxicología,
Monitoreo y
Evaluación de Riesgo

Editado por Leda Giannuzzi



Cianobacterias y Cianotoxinas

Identificación,
Toxicología,
Monitoreo y
Evaluación de Riesgo

Leda Giannuzzi

Cianobacterias y cianotoxinas : identificación, toxicología, monitoreo y evaluación de riesgo /
Leda Giannuzzi ... [et.al.]. - 1a ed. - Buenos Aires : el autor, 2009.

238 p. ; 29x21 cm.

ISBN 978-987-05-5749-4

1. Toxicología. I. Giannuzzi, Leda
CDD 614.3

Foto de Tapa:

Floraciones cianobacterias en el Río de la Plata. *Andrinolo*.



ISBN N° 978-987-05-5749-4

Editado por los autores

Derechos reservados. Prohibida su reproducción, total o parcial
y por cualquier método.

Queda hecho el depósito que previene la Ley 11723

Impreso en **Moglia S.R.L.**, La Rioja 755

3400 Corrientes, Argentina

moglia@gigared.com

www.mogliaediciones.com

Enero de 2009



**AUTORIDADES DEL SUPERIOR
GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CORRIENTES**

GOBERNADOR DE LA PROVINCIA
Ing. Arturo Alejandro Colombi

VICE GOBERNADOR DE LA PROVINCIA
Dr. Tomás Rubén Pruyas

MINISTRO DE PRODUCCION, TRABAJO y TURISMO
Cdor. Alfredo Horacio Aùn

ADMINISTRADOR GENERAL
DEL INSTITUTO CORRENTINO DEL AGUA Y EL AMBIENTE
Ing. Mario Rubén Rujana

MINISTRO DE OBRAS y SERVICIOS PUBLICOS
Dr. Marcelo Atilio Falcione

INTERVENTOR DE LA ADMINISTRACION OBRAS SANITARIAS CORRIENTES
M.M.O. Juan Pedro Zubieta

Prólogo

Como si fuese una ironía de la naturaleza, los primeros organismos fotosintéticos que iniciaron el fenómeno de la vida en el planeta, las cianobacterias o algas azules, al menos parte de ellas, parecen avanzar en contra del otro extremo del árbol evolutivo.

En la actualidad están poniendo en peligro esa vida, ya que el ambiente acuático en el que se desarrollan es alterado en su calidad, favoreciendo el desarrollo de sus poblaciones, llegando a producir floraciones, muchas de ellas nocivas por su alta toxicidad.

Y se dan estas circunstancias en coincidencia con el alto grado de eutrofización antropogénica que sufren principalmente los ambientes acuáticos continentales, como ríos, lagos, lagunas, etc. y que en gran parte satisfacen la necesidad de agua del hombre y demás seres vivos.

No obstante el cambio ambiental que se está experimentando desde hace menos de un siglo, es el resultado también de la desaprensión del hombre al volcar en los cuerpos de agua una multiplicidad de residuos que alteran la calidad de las mismas.

En cuanto a los autores de este manual, tal vez, en un primer momento, a través de un intercambio de ideas casi casual, el grupo interdisciplinario, biólogos, químicos, bioquímicos ... coincidió en la necesidad de investigar sobre el tema. Luego, la charla se transformó en un desafío que tomaron como un compromiso, para iniciar el camino del encuentro de una solución a estos problemas, que sin ninguna duda, son de gran importancia para la salud y economía del hombre.

Esta obra consta de tres secciones; la primera, una introducción al tema, la segunda sobre metodología analítica y una tercera relacionada al manejo de las floraciones nocivas. La sección sobre aspectos metodológicos abarca las técnicas de recolección de las muestras de algas, la caracterización de las especies halladas y el análisis de las sustancias que producen efectos nocivos sobre la vida. Seguramente representará una guía importante que estimulará el interés de otros científicos, para seguir avanzando en el tema.

Pero no solamente son los científicos los que harán base en este trabajo.

Serán también beneficiarias de éste, las empresas que actualmente, tal vez por ignorancia o negligencia, no sepan como resolver los problemas de contaminación que producen sus establecimientos.

Y serán fundamentalmente, las autoridades políticas, (las que por mandato – recordemos- tienen la obligación de proteger las vidas que pueblan el territorio), quienes encontrarán en esta obra un primer paso importantísimo, una guía para iniciar las acciones de protección que devuelvan el tan necesario equilibrio para el mantenimiento de una vida sana y armoniosa entre nosotros, los hombres y el resto de la naturaleza.

Sebastián Alberto Guarrera

A modo de presentación

El planeta tierra tiene 1.400 km³ de agua de los cuales un 97 % es agua salada y sólo el 3% es agua dulce. De esta masa de agua dulce el 79 % se encuentra congelada, el 20 % bajo la superficie terrestre (en acuíferos subterráneos) y sólo el 1 % en cursos de agua superficiales.-

El crecimiento de los conglomerados urbanos a la vera de los cursos de agua, así como el desarrollo de actividades productivas e industriales que conviven con el recurso "agua" , deben diariamente enfrentar el desafío de una adecuada utilización y cuidado del mismo.

En su cotidiano accionar, los organismos técnicos de aplicación en materia de recursos hídricos y saneamiento deben extremar esfuerzos para que ninguna de las actividades del hombre, pongan en riesgo a nuestro ecosistema.

En esta tarea, el aporte de la investigación científica es indispensable como soporte de los profesionales y técnicos que en el día a día, deben tomar decisiones cuyo sustento se fortalece cualitativa y cuantitativamente cuando además del cumplimiento de las normas, se agrega el resultado de una tarea de investigación.

El trabajo que hoy se exhibe es el fruto de 3 años de investigación de la red CYANOSUR, que complementa la recopilación de datos y estadísticas y que seguramente tendrá un efecto multiplicador en los profesionales y técnicos de todo el país, que conviven diariamente con la problemática de las floraciones algales.

El Gobierno de la Provincia de Corrientes, con el convencimiento de que la disponibilidad de los recursos hídricos, posiciona a la provincia en una situación privilegiada para todo tipo de emprendimientos, ha entendido el cuidado y preservación de sus recursos naturales como una cuestión de estado y como tal lo ha incluido en la reforma constitucional del año 2007.

En nuestro carácter de titulares de los organismos provinciales con competencia sobre los recursos hídricos y el medio ambiente, y sobre el agua potable y el saneamiento, el Instituto Correntino del Agua y del Ambiente y la Administración de Obras Sanitarias Corrientes, respectivamente, presentamos este Manual a partir del compromiso asumido en las Jornadas "Floraciones Algales en Argentina", realizadas en las ciudades de Corrientes y Santo Tomé el 16 y 17 de septiembre de 2008.

Consideramos humildemente, que es una obra valiosa, y un serio y oportuno aporte al esclarecimiento de muchos problemas relacionados con las floraciones algales. Se trata con seguridad, de un aporte para el estudiante o para cualquier persona interesada en abordar la complejidad del tema involucrado.

Asimismo, permitirá profundizar y actualizar conocimientos ya adquiridos y a la vez, confiamos que esta edición se enriquecerá con la contribución intersectorial e interdisciplinaria de muchos especialistas de diversos organismos públicos y privados.

Entendemos que la tarea iniciada no finaliza aquí. Las mejoras que surjan, podrán ser tema de otras jornadas similares a las realizadas en Corrientes, para lograr así su profundización.

Finalmente agradecemos a los investigadores y docentes de las distintas Universidades Nacionales que han contribuido para enriquecer esta obra.



Ing. Hidr. y Civil Mario Rubén Rujana
Administrador General
I.C.A.A.



M.M.O. Juan Pedro Zubieta
Interventor
A.O.S.C:

Prefacio

Los problemas en la calidad de aguas en los reservorios utilizados para suministro público, irrigación y recreación son un hecho alarmante en nuestro país y en todo el mundo. En los últimos años se ha observado un aumento en la aparición de floraciones cianobacterianas en distintos sistemas fluviales de la región del Conosur.

Con esa preocupación se comenzó a trabajar en el año 2005 en Talleres interdisciplinarios denominados Cianobacterias tóxicas en el Conosur con el objetivo de encontrar estrategias multidisciplinarias para determinar los alcances e impactos a fin de desarrollar medidas de prevención y manejo de sus riesgos.

Desde entonces se han realizado dos Talleres de discusión sobre la problemática focalizado en los problemas del agua relacionados con la presencia de cianobacterias productoras de cianotoxinas. Se generó un espacio de reunión donde expertos e interesados en el tema provenientes de diferentes partes del país y de países vecinos presentaron el estado actual del conocimiento y la situación de cada lugar. Asimismo, estas reuniones permitieron intercambiar experiencias frente al problema de la presencia de cianobacterias y cianotoxinas en aguas en diferentes partes de Argentina y de Uruguay, Brasil y Paraguay.

Una de las metas de los Talleres fue concretar la elaboración de guías –teórico prácticas para laboratorios e instituciones que trabajen en el tema de calidad de agua a fin de armonizar técnicas para la caracterización de toxinas e identificación de especies tóxicas y esbozar conceptos y prácticas en el manejo de floraciones.

Con estos lineamientos fue pensado el presente Manual que constituye un aporte relevante hacia la identificación y manejo de floraciones tóxicas. El material presentado en el Manual resulta del compilado del trabajo realizado por profesionales expertos que han brindado su reconocida experiencia.

El libro está dividido en tres secciones.

La Primera sección introduce el tema de las floraciones de cianobacterias y cianotoxinas, describe los casos más relevantes registrados en nuestro país así como el estado actual de la situación en Argentina.

El aporte de fitólogos especialistas en el tema de la taxonomía de cianobacterias se visualiza en los capítulos que tratan sobre su clasificación e identificación de los géneros planctónicos de Cianobacteria y Cianobacterias tóxicas.

Presenta también un detalle de los efectos en la salud humana y animal de las cianotoxinas profundizando sobre los mecanismos de acción tóxica producidos. Finalmente esta sección aborda el tema de olores y sabores en el agua que se generan en las floraciones así como detalla la metodología de detección de los metabolitos volátiles producidos.

La Segunda sección se centra en los aspectos metodológicos de la detección de floraciones tóxicas. Para ello se ha incluido un capítulo de fundamentos de técnicas analíticas que se utilizan en la determinación de células, toxinas, parámetros químicos

de importancia a la hora de abordar el análisis de floraciones de cianobacterias. Un capítulo detallado de la metodología incluye los pasos a seguir desde la toma de muestra de agua en diferentes ambientes, los análisis realizados como ser la detección y cuantificación de cianotoxinas utilizando técnicas de alta performance así como la metodología de bioensayo. En esta sección también se ha incluido un capítulo de técnicas moleculares para la detección de estirpes de Cianobacterias productoras de toxinas que son relevantes y constituyen las tendencias futuras en este campo.

La tercera sección trata del manejo de floraciones nocivas y de los tratamientos realizados en plantas potabilizadoras. Estos capítulos constituyen un aporte a organismos de control, plantas potabilizadoras, organismos de gobierno que sienten con preocupación en avance de los problemas generados por las cianobacterias y cianotoxinas y están a la espera de posibles soluciones y tratamientos que los expertos pueden brindar. Están planteadas las diferentes estrategias de manejo de floraciones y tratamientos en plantas potabilizadoras que se aplican con éxito en el mundo. Se presentan también las principales normas de protección para la comunidad que es de esperar sea de gran utilidad para los organismos de gobierno en su conjunto.

Este libro es el inicio de un largo camino que emprendemos en conjunto profesionales, expertos, organismos vinculados con la calidad de agua en general y esperamos sea solo el disparador que promueva discusiones nacionales en lo referente a los peligros para la salud y el ambiente que causan las cianobacterias y cianotoxinas. Asimismo, sería deseable generar marcos de gestión que permita fortalecer la investigación, las técnicas de detección temprana de floraciones tóxicas así como fomentar la implementación de las líneas de manejo de floraciones para la protección de la salud humana.

Leda Giannuzzi

Octubre 2008

Cianobacterias y Cianotoxinas

Identificación,
Toxicología,
Monitoreo y
Evaluación de Riesgo

Leda Giannuzzi

Comite Editor

Dario Andrinolo
Ricardo Echenique
Noma Meichtry de Zaburlin
Ana Laura Ruibal
Graciela Salerno

Sumario

Cianobacteria y Cianotoxinas

SECCIÓN I: INTRODUCCIÓN AL TEMA DE CIANOBACTERIA Y CIANOTOXINAS. FUNDAMENTOS TOXICOLÓGICOS

Capítulo 1: Cianobacteria planctónicas: su impacto en ambientes acuáticos continentales. Descripción de los géneros más frecuentes.
Norma Meichtry de Zaburlín, Irmgard Sandra Martens y Víctor Llano

Capítulo 2: Cianobacteria toxigenas. Aspectos generales para su identificación taxonómica.
Ricardo O. Echenique y Anabella Aguilera

Capítulo 3: Las floraciones de Cianobacteria en Argentina. Estado de la situación actual en distintas zonas de nuestro país.
Ricardo Echenique y Anabella Aguilera

Capítulo 4: Efectos sobre la salud humana y animal de cianotoxinas. Mecanismos de acción tóxica.
Dario Andrinolo y Mariela Caneo

Capítulo 5: Olores y sabores en agua.
Funny Busso

SECCION II: METODOLOGÍA ANALÍTICA

Capítulo 6: Fundamento de las técnicas analíticas utilizadas para detectar células, toxinas y parámetros físico-químicos relevantes.
Cristian Oliver y Alejandra Rasile

Capítulo 7: Toma de muestra de agua en diferentes ambientes para determinaciones de algas y toxinas. Procedimientos analíticos. Métodos de detección de cianotoxinas.
Darío Andrinolo, Ricardo Echenique y Daniela Sedan

Capítulo 8: Herramientas moleculares para la detección de estirpes potencialmente tóxicas de cianobacterias.
Graciela Salerno, Fabiana Cansolo y Corina Berón

SECCIÓN III: MANEJO DE FLORACIONES NOCIVAS, TRATAMIENTOS EN PLANTAS POTABILIZADORAS

Capítulo 9: Enfoques para la evaluación y manejo del riesgo de cianobacterias.
Niveles de alerta.

Ana Laura Ruibal, Marcia Ruiz y Silvia Otaño

Capítulo 10: Tratamientos para disminuir la incidencia de cianobacterias y cianotoxinas en plantas potabilizadoras.

Carmen Izaguirre, Nancy Roman y Cinthia G. Bogarin

Glosario de términos

Curriculum de los autores

Sección I: Introducción al tema de Cianobacterias y Ciano- toxinas. Fundamentos Toxicológicos

Capítulo 1

Cyanobacteria planctónicas: su impacto en ambientes acuáticos continentales. Descripción de los géneros más frecuentes

Norma Meichtry de Zaburlín
Irmgard Sandra Martens
Víctor Llano

1. 1. Introducción

En aguas dulces el término “alga” se refiere a un grupo muy diverso de organismos fotoautótrofos, procariotas o eucariotas, en general microscópicos, que se encuentran dispersos en la masa de agua constituyendo el fitoplancton o adheridos a algún sustrato (perifiton) o integrando las comunidades del fondo (bentos). Comprende a los talófitos y protistas con clorofila, así como a sus derivados no pigmentados, cuyos órganos de reproducción no están envueltos por un conjunto de células estériles.

En general a las algas se las clasifica de acuerdo a los pigmentos y otras características en: algas verde azules, verdes, doradas, rojas y pardas. Entre ellas, las Cyanobacteria en agua dulce y los dinoflagelados (organismos en general unicelulares y móviles por dos flagelos) en el mar se han destacado por la capacidad de reproducirse rápidamente y originar floraciones tóxicas.

Las Cyanobacteria, Cyanophyta, Cyanoprokaryota o algas verde azules son organismos procariotas, autótrofos, que realizan fotosíntesis con liberación de oxígeno al igual que las plantas superiores. Se encuentran entre los seres vivos más primitivos cuyo origen se estima en unos 3500 millones de años, desde el surgimiento de la vida en la tierra.

Las células de las Cyanobacteria no presentan núcleo delimitado por carecer de una membrana nuclear y el color verde azulado se debe a la presencia de pigmentos especiales como las ficobilinas que suelen enmascarar el color verde de la clorofila-*a*.

Las Cyanobacteria son productores primarios de la comunidad planctónica, el carbono orgánico y la energía producida por ellas durante la fotosíntesis son transferidas a otros organismos a través de las cadenas alimentarias. El tamaño de sus células

varía desde 0,5 micrones, similar al de las bacterias, hasta células grandes, de cerca de 40 micrones.

Se incluyen dentro de este grupo aproximadamente 2400 especies, comprende formas unicelulares, coloniales o filamentosas, provistas o no de una vaina mucilagino-sa, muchas de ellas presentan vesículas de gas o aerótopos, que les permiten regular su profundidad en la columna de agua y un mejor acceso a la disponibilidad de luz y nutrientes.

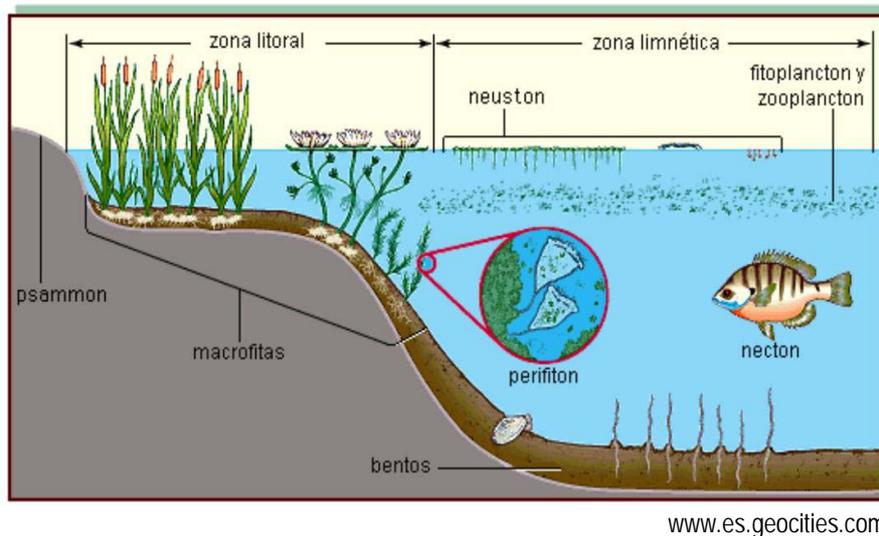


Fig. 1. Esquema de un cuerpo de agua donde se señalan las diferentes comunidades

Se distribuyen en los más variados hábitats, agua dulce, salobre o marina; en ambientes extremos: aguas termales, nieve o desiertos. Los ecosistemas de agua dulce son los ambientes en los que puede hallarse la mayor riqueza específica e incluso la mayor diversidad de adaptaciones al medio, encontrando organismos libremente flotantes formando parte del fitoplancton; adheridos a sustratos vegetales o formando parte del fitobentos e incluso a sustratos inorgánicos (bioderma).

Algunas Cyanobacteria, tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, fundamentalmente en los organismos heterocistineos, lo que favorece su desarrollo masivo en ambientes con baja relación nitrógeno/fósforo (N:P).

En los últimos años, este grupo se ha destacado especialmente por los problemas que causan en los ambientes acuáticos y en los sistemas de abastecimiento de agua potable, por la alteración de las características organolépticas, cambios de olor y sabor y especialmente por la producción de toxinas (cianotoxinas).

Las Cyanobacteria, bajo ciertas condiciones ambientales, tales como: temperaturas elevadas, alta carga de nutrientes, baja relación N:P, pH alcalino, y por su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, presencia de vesículas de gas, capacidad para crecer y reproducirse bajo distintas condiciones de luz, calma ambiental, bajo caudal, entre otras, resultan un grupo competitivamente exitoso en relación a otros del fitoplancton. Estas características posibilitan la formación de densas poblaciones que pueden ser evidentes por acumulación en la superficie del agua, siendo detectables a simple vista y pudiendo producir un cambio de color en el agua. A estas proliferaciones se las conoce con el nombre de floraciones, *blooms* algales o desarrollos masivos.

Estos fenómenos, especialmente los de especies que poseen aerótopos, pueden agruparse en la superficie formando espumas o "natas", las cuales pueden ser trans-

portadas por el viento y acumularse en las orillas, constituyendo aglomeraciones muy densas que lucen como pintura o gelatina azul verdosa. Sin embargo, no siempre las floraciones son visibles, ya que algunas poblaciones pueden presentarse dispersas en toda la masa de agua y/o concentrarse a cierta profundidad, por lo que no resultan evidentes. Por otra parte, se han registrado floraciones de Cyanobacteria en aguas con escasez de nutrientes, como en determinados lagos alpinos.

Las formas planctónicas productoras de floraciones de aparición más frecuente, son las especies coloniales que presentan aerótopos y pueden efectuar migraciones en la columna de agua, entre ellas el género *Microcystis*, especialmente *M. aeruginosa* es la más ampliamente distribuida a nivel mundial. También en este grupo se destacan *Aphanocapsa*, *Woronichinia*, *Snowella*, *Coelosphaerium*, y *Gomphosphaeria*. Entre las formas filamentosas los géneros más conocidos son *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Phormidium* y *Planktothrix*.



Fig. 2. Floración de *Microcystis aeruginosa* en el río Alto Paraná.

En el caso de aguas utilizadas para el abastecimiento público y/o para recreación, la floración puede ser definida en términos de la concentración de células que resultan perjudiciales para la salud pública. En este caso, algunos autores consideran floración a la ocurrencia de más de 20000 células por mililitro de una población o más de 10 mg m⁻³ de clorofila-*a* con dominancia de Cyanobacteria. La ocurrencia de floraciones, generalmente son más frecuentes desde mediados de primavera hasta mediados de otoño. El viento persistente, condiciones de turbulencia o el aumento del flujo (caudal) inducen a la desestratificación y mezcla del agua, lo que provoca que la floración pueda desintegrarse rápidamente.

Los problemas de cambios de características organolépticas del agua, son causados por varios compuestos solubles liberados por las Cyanobacteria. Entre ellos, la geosmina y el metilisoborneol (MIB) otorgan al agua olor a tierra, moho o a un conocido insecticida "gamexane". Estos metabolitos volátiles son identificados como los responsables de la mayoría de episodios nocivos de presencia de olores y sabores desagradables en cuerpos de agua, fundamentalmente en aquellos utilizados para abastecimiento de agua potable y en estanques para piscicultura. Cuando estas sustancias son liberadas al agua, son absorbidas rápidamente por los peces y suelen acumularse en los tejidos grasos, proporcionándoles los conocidos sabores mohosos, terrosos o arbolados.

Las floraciones o *blooms* de Cyanobacteria toxígenas afectan la calidad del agua, los recursos pesqueros, animales y la salud humana. Además, alteran el equilibrio acuático y las cadenas tróficas, producen excesiva biomasa, inhiben la capacidad fotosintética de otras algas por el sombreado, producen toxinas, sabor y olor desagrada-

ble, hipoxia, lo que afecta a otros organismos consumidores por la escasa disponibilidad de oxígeno para la respiración. Su crecimiento y muerte provoca un aumento de la materia orgánica en los ambientes acuáticos, cuya descomposición disminuye el oxígeno disuelto, pudiendo ocasionar la muerte de peces y otros organismos. Por otra parte, estos fenómenos, ejercen un fuerte impacto sobre la economía humana, ya que provocan la disminución del aprovechamiento del ecosistema acuático, por interferir con su posible uso recreacional (baño, pesca, actividades deportivas) o para consumo (potabilización).

Las cianotoxinas son clasificadas, farmacológicamente, por los efectos perjudiciales que causan tanto a seres humanos como animales. Las más relevantes son las neurotoxinas, las hepatotoxinas y las dermatotoxinas. Por convención y, según la Organización Mundial de la Salud, toda floración de Cyanobacteria debe ser considerada, en principio, como potencialmente tóxica.

Las toxinas son liberadas al medio por ruptura de la pared celular debido a la muerte de las células, como consecuencia del uso de alguicidas o por senescencia de la floración. Ellas pueden causar una rápida mortalidad del zooplancton herbívoro, así como efectos crónicos sobre el crecimiento y reproducción de estos organismos. Las cianotoxinas se pueden acumular en los consumidores, incluyendo: almejas, cangrejos de agua dulce, zooplancton, peces. En aves y mamíferos que beben en aguas con presencia de cianotoxinas suelen observarse serios trastornos, incluso la muerte. Al hombre pueden afectarlo tanto por el contacto como por la ingesta.

Las mortandades de peces y animales originadas por floraciones de Cyanobacteria son fenómenos recurrentes en ambientes de Argentina, sin embargo, los casos documentados son escasos. Entre ellos podemos citar: la mortandad de miles de patos registrada en la Laguna Bedetti, provincia de Santa Fe; de peces y animales en la Laguna San Miguel del Monte; de ganado vacuno en la localidad de Goyena; de aves silvestres y vacas en la Laguna Portmann, cuenca inferior del río Salado; de peces en dos lagunas de Buenos Aires.

En la ciudad de Santa Fe, en el Lago del Parque General Belgrano se registró una floración de *Microcystis aeruginosa* (verano 1973/1974) que provocó, además de una mortandad masiva de peces, dermatitis, conjuntivitis, otitis y trastornos gastrointestinales en los bañistas.

1.2. Eutrofización, floraciones y calidad del agua

El hombre interfiere intensamente en los ambientes acuáticos, el crecimiento de los centros urbanos, la ocupación sin planeamiento de las cuencas hidrográficas, junto al desarrollo industrial y la expansión agrícola-ganadera, llevan a un aumento del vertido de efluentes ricos en nutrientes. Una alta carga de nutrientes, principalmente de nitrógeno y/o fósforo, determinan importantes cambios en la calidad de los cuerpos de agua, desencadenando fenómenos de eutrofización. Estos se ponen en evidencia, fundamentalmente por la generación de floraciones de algas planctónicas y en particular de Cyanobacteria, así como por un incremento en el desarrollo de macrófitas acuáticas flotantes y sumergidas. Estos fenómenos, que amplifican los procesos de producción biológica, están ligados a la degradación de los recursos hídricos.

La eutrofización puede ser definida como la producción excesiva de materia orgánica en un cuerpo de agua debido a una gran abundancia de nutrientes. En sentido original, es un proceso natural de envejecimiento de un cuerpo de agua como resultado de la descarga normal de nitrógeno y fósforo, aportados por lluvias y/o aguas su-

perficiales, que lavan y erosionan la superficie terrestre. La eutrofización cultural, artificial o antropogénica es causada por el vertido de efluentes domésticos, industriales y de la descarga de fertilizantes utilizados en la agricultura, que acelera el proceso de enriquecimiento tanto de las aguas superficiales como subterráneas.

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 cubierta 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.

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

	Fósforo Total (μL^{-1})		Clorofila a (μL^{-1})		Profundidad Secchi (m)	
	Vollenweider (2001) & Kerekes (1982)		Vollenweider & Kerekes (1982)		Vollenweider & Kerekes (1982)	
	<i>Media</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>Máximo</i>
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

El deterioro de la calidad del agua de lagos, ríos y embalses por la eutrofización representa un grave problema ambiental en todo el mundo, por los efectos indeseables que provoca. Entre ellos podemos citar: elevada producción primaria, aparición de floraciones algales, crecimiento de la vegetación acuática, malos olores, disminución de la concentración de oxígeno disuelto, de la diversidad y riqueza de especies, muerte de peces y dominio de Cyanobacteria. Este grupo de algas está ampliamente distribuido en ambientes lóticos y lentos de nuestro país y del mundo. En los últimos años se registró una serie de floraciones de Cyanobacteria toxigenas, principalmente *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena spiroides* y *A. circinalis*, en distintos sistemas fluviales del país, Río de la Plata, río Uruguay, embalse de Salto Grande, en el río Paraná, embalse de Yacyretá, en embalses de la región semiárida de Córdoba, en diversos ambientes del Chaco, entre otros.

Sin embargo, el monitoreo y control de las fuentes de agua potable (ríos, embalses, lagunas) para detectar la presencia de Cyanobacteria nocivas y sus toxinas no es todavía una práctica común en Argentina. En general, no existen normativas en materia de calidad del agua que contemple la obligatoriedad del recuento de Cyanobacteria y de medición de la concentración de toxinas en agua potable. Por lo tanto, la incertidumbre relacionada con la presencia de Cyanobacteria y sus toxinas en el agua utilizada para el consumo humano, en nuestro país, es alta.

1.3. Reconocimiento de las Cyanobacteria

En primer lugar las Cyanobacteria se caracterizan por su color verde azulado, que se debe a los pigmentos tipo ficobilinas, especialmente la ficocianina, que enmascaran el color verde de la clorofila.

En el ambiente es importante el exámen visual en la masa de agua para reconocer cualquier cambio, especialmente de color, la aparición de “espumas” o “natas” en la superficie, de olores desagradables, mortandad de peces.

Las células de las Cyanobacteria se pueden diferenciar de las algas eucariotas porque al observarlas al microscopio óptico no presentan plastos, los pigmentos y demás componentes celulares están dispersos en el protoplasma. Las Cyanobacteria muestran una considerable diversidad morfológica, el tamaño de las células varía entre 0,5 y 40 micrones, el talo puede ser unicelular (como *Synechococcus*), colonial (*Microcystis*) o filamentoso (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis*).

Los organismos cocales unicelulares pueden presentar forma esférica, elíptica, alargada, fusiforme. Las células pueden tener o no una envoltura gelatinosa, simple o estratificada. Los pluricelulares (colonias) pueden estar formadas por pocas células (2-16) o centenares y pueden presentar una morfología muy variada, redondas, alargadas, irregulares, cúbicas, generalmente rodeadas por un mucilago homogéneo o estratificado, en general hialino, incoloro.

Las especies filamentosas tienen, en general, un grado de diferenciación mayor que las coloniales. Los filamentos pueden ser simples o presentar ramificaciones, microscópicos o formar masas macroscópicas sobre el sustrato o flotando en el agua. El término tricoma es utilizado para denominar el conjunto de células dispuestas linealmente y filamento para el conjunto de vaina mucilaginoso y tricoma. La vaina puede contener uno o varios tricomas.

Los tricomas pueden presentar una organización celular homogénea, con un sólo tipo de morfología celular o presentar algunas células diferenciadas, como las células terminales hialinas, en forma de pelo. En el mismo sentido, podemos encontrar organismos estructurados solo por células vegetativas, o presentar células modificadas: los heterocistos y/o los acinetos.

En los heterocistos ocurre la fijación de nitrógeno atmosférico. Se originan a partir de una célula vegetativa que pierde su contenido, espesa sus paredes y forma unos poros en los extremos que le permiten la comunicación con las células vegetativas vecinas (nódulos polares). La formación de los heterocistos está correlacionada con la concentración de nitrógeno en el agua.

Cuando las condiciones del medio no son favorables algunas especies producen estructuras denominadas acinetos, a partir de células vegetativas. Estas células de resistencia o esporos, con paredes gruesas, donde se acumulan reservas proteicas (cia-

noficina), soportan la desecación y pueden persistir en los sedimentos por muchos años y al restablecerse las condiciones germinan dando origen a una nueva población.

1.4. Taxonomía. Descripción de los géneros más frecuentes

Las Cyanobacteria son divididas en dos grandes grupos: formas no filamentosas y filamentosas. El primero incluye a los organismos cocales, unicelulares o coloniales en el orden de las **Chroococcales** y el segundo contiene a las formas filamentosas, distribuidas en tres Ordenes: **Oscillatoriales**, **Nostocales** y **Stigonematales**.

CHROOCOCALES

Comprende organismos cocoides, unicelulares o coloniales, con escasas o numerosas células incluidas en vainas mucilaginosas. Colonias de forma definida o indefinida, libres, flotantes o fijas, tabulares, compactas o huecas, en general sin polaridad. División celular simple, principalmente por fisión binaria, en 2, 3 o más planos, formación facultativa de exocistos y nanocistos (endosporas). Ej: *Aphanocapsa*, *Chroococcus*, *Coelosphaerium*, *Merismopedia*, *Microcystis*, *Snowella*, *Woronichinia*.

OSCILLATORIALES

Formas filamentosas, uniseriadas, con o sin vaina, talos homocistíneos (sin heterocistos o acinetos), sin ramificaciones verdaderas; células de longitud uniforme a lo largo de todo el filamento, a excepción de las células terminales que son redondeadas en el ápice. Reproducción por hormogonios, los cuales se liberan de su vaina cuando las condiciones de crecimiento son óptimas. Ej: *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktolyngbya*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*.

NOSTOCALES

Talos filamentosos, heterocistíneos (presencia de acinetos y/o heterocistos) sin ramificaciones verdaderas, pueden poseer ramificaciones falsas; las células se dividen siempre perpendicularmente al eje del tricoma, solo en una dirección. Reproducción principalmente por hormogonios u hormocistos. Ej: *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Raphidiopsis*.

STIGONEMATALES

Formas filamentosas, heterocistíneas, multiseriadas, con ramificaciones verdaderas, excepcionalmente encontrados en el plancton (no se incluyen en este manual).

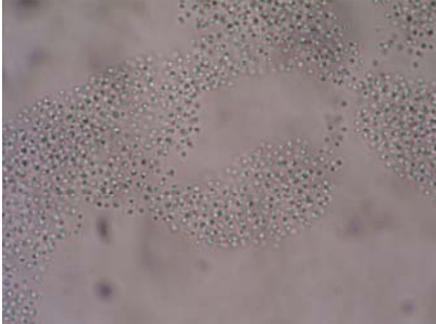
A continuación se presenta una clave de identificación de los géneros planctónicos más comunes en aguas continentales del país. Para utilizar la clave se debe observar primero las características del organismo en estudio, si el talo es unicelular, colonial o filamentosos. Esta definición es la entrada principal a la clave y nos conduce a la elección de una alternativa 1 o 1'. A partir de ahí las opciones siguientes van detallando las características de los géneros de Cyanobacteria siguiendo la secuencia numérica.

**Clave de identificación de los géneros planctónicos
más frecuentes de Cyanobacteria**

1. Células solitarias o reunidas en colonias	2
1'. Células formando filamentos (tricomas)	9
2. Células irregularmente dispuestas en la colonia	3
2'. Células regularmente dispuestas en la colonia	6
3. Células con vainas gelatinosas nítidas, dispuestas unas general- mente dentro de otras, colonias de pocas células.....	4
3'. Células sin vainas, o estas no nítidas y nunca dispuestas una de- ntro de otra, colonias formadas por un gran número de células.....	5
4. Células redondeadas	<i>Chroococcus</i>
4'. Células elípticas hasta cilíndricas.....	<i>Rhabdoderma</i>
5. Células esféricas, con aerótopos	<i>Microcystis</i>
5'. Células esféricas, sin aerótopos.....	<i>Aphanocapsa</i>
6. Células dispuestas en colonias planas, rectangulares o cua- dráticas.....	<i>Merismopedia</i>
6'. Células dispuestas en la periferia de las colonias, esféricas u ovoides.....	7
7. Células de la colonia reunidas por pedicelos .mucilaginosos	8
7'. Células de la colonia sin pedicelos gelatinosos.....	<i>Coelosphaerium</i>
8. Células ovoides que permanecen juntas luego de la división celular mostrando un aspecto cordiforme.....	<i>Snowella</i>
8'. Células alargadas, separándose luego de la división celular	<i>Woronichinia</i>
9. Filamentos con heterocistos	10
9'. Filamentos sin heterocistos.....	16
10. Filamentos dispuestos radialmente y terminados en un pelo, heterocistos siempre terminales	<i>Gloeotrichia</i>
10'. Filamentos dispuestos de otra manera, no terminados en un pelo, heterocistos intercalares o terminales	11
11. Filamentos atenuados, generalmente terminados en células in- coloras, heterocistos y acinetos subterminales. Filamentos aislados o agrupados en paquetes.....	<i>Aphanizomenon</i>
11'. Todas las células vegetativas de igual configuración, heterocistos y acinetos frecuentes. Filamentos agrupados en conjuntos gelatinosos o solitarios.....	12
12. Filamentos generalmente reunidos en conjuntos globosos consistentes	<i>Nostoc</i>
12'. Filamentos solitarios o en conjuntos no consistentes	13
13. Células vegetativas cortas y heterocistos en forma de discos.....	<i>Nodularia</i>

13'. Células de otra forma	14
14. Heterocistos terminales	15
14'. Heterocistos intercalares, a menudo con acinetos adyacentes.....	<i>Anabaena</i>
15. Heterocistos esféricos a ambos extremos del filamento y acinetos globosos localizados lejos de los heterocisto	<i>Anabaenopsis</i>
15'. Heterocistos, en forma de gota, acinetos oblongos subterminales	<i>Cylindrospermopsis</i>
16. Filamentos rectos o curvados en S.....	18
16'. Filamentos de otra forma, nunca presentan acinetos	17
17. Células con aerótopos	<i>Planktothrix</i>
17'. Células sin aerótopos	<i>Phormidium</i>
18. Filamentos atenuándose hacia ambos extremos a veces con acinetos subterminales	<i>Raphidiopsis</i>
18'. Filamentos de otra forma, sin acinetos	19
19. Filamentos sin vaina, sólo tricoma presente	20
19'. Filamentos con vaina.....	22
20. Tricomas espiralados	<i>Spirulina</i>
20'. Tricomas rectos, no espiralados.....	21
21. Tricomas catenados, células adyacentes unidas por un puente gelatinoso	<i>Pseudanabaena</i>
21'. Tricomas no catenados, células adyacentes unidas por gran parte de la superficie de contacto.....	<i>Oscillatoria</i>
22. Filamentos siempre solitarios.....	23
22'. Filamentos formando masas	<i>Leptolyngbya</i>
23. Vaina mucilaginosa delgada y transparente.....	<i>Planktolyngbya</i>
23'. Vaina mucilaginosa evidente	<i>Lyngbya</i>

ORDEN CHROOCOCCALES



Aphanocapsa Nägeli

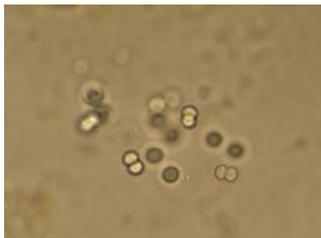
Colonia micro o macroscópica, planctónica, con las células distribuidas irregularmente en su interior. Colonias esféricas, raramente aplanadas, con gran número de células, irregular y densamente agregadas. Células esféricas de 0,5 a 2 μm de diámetro, sin aerótopos. Mucílago indistinto en el margen de la colonia, comúnmente incoloro y homogéneo.



www.keweenawalgae.mtu.edu

Coelosphaerium Nägeli

Colonias microscópicas planctónicas, pueden formar subcolonias, esféricas, irregulares u ovals, rodeadas por un mucílago incoloro mayormente indistinto rodeando a las células, de 2 a 7 μm de diámetro, las cuales se hallan dispuestas en la periferia de la colonia, con o sin aerótopos, mucílago homogéneo nunca estructurado. División celular en dos planos perpendicular a la superficie de la colonia.



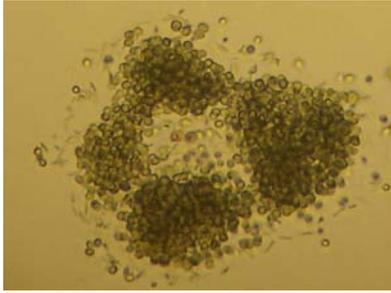
Chroococcus Nägeli

Unicelulares o pequeños grupos de células (2-4-8 o más) rodeadas por una envoltura mucilaginoso hialina. Células esféricas, ovals o hemiesféricas, de tamaño variable desde 0,5 μm . Contenido celular verde azulado, a veces con aerótopos. División celular en tres planos perpendiculares.



Merismopedia Meyen

Colonias microscópicas, de vida libre, tabulares, con una capa de células agrupadas densamente o más esparcidas en el plano de la colonia, cuadradas o rectangulares. Vaina mucilaginoso colonial transparente. Células esféricas o elípticas, de <2 a 10 μm , contenido celular comúnmente homogéneo, a veces pueden tener aerótopos.



Microcystis Kützing

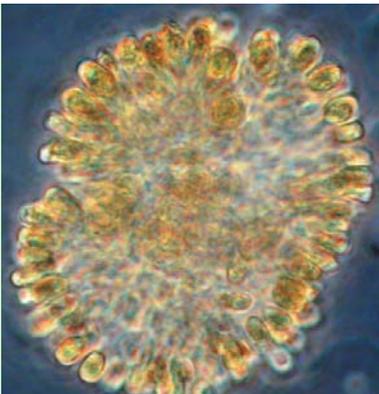
Género colonial, típicamente planctónico. Colonias macro o microscópicas, esféricas, irregulares, alargadas, a veces formadas por subcolonias, algunas especies clatradas. Envoltura mucilaginosa incolora, amplia o estrecha, difluente o firme, desde homogénea a lamelada. Células esféricas distribuidas irregularmente en el interior de la colonia, con aerótopos. División celular por fisión en tres planos.



www.bretagna-environment.org

Snowella Elenkin

Colonias más o menos esféricas o irregularmente ovales, planctónicas. Vaina homogénea incolora, distinguible o no. Células esféricas a ligeramente alargadas, reunidas entre si por tractos mucilaginosos y distribuidas radialmente hacia la periferia de la colonia, con o sin aerótopos. División celular en dos planos, por fisión binaria.



www.ymparisto.fi

Woronichinia Elenkin

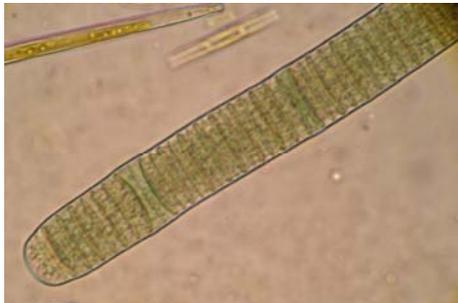
Colonias globosas, esféricas o irregularmente ovales, comunmente compuestas por subcolonias, de vida libre, usualmente con una envoltura mucilaginosa incolora, células esféricas o ligeramente alargadas dispuestas en el extremo de tractos mucilaginosos que parten radialmente desde el centro de la colonia. División celular en dos planos perpendiculares, formando diferentes niveles, con o sin vacuolas gaseosas.

ORDEN OSCILLATORIALES



Lyngbya Agardh

Filamentos rectos o ligeramente curvados, solitarios, o formando matas finas o gruesas, largas y postradas sobre el sustrato. Presentan movimiento de deslizamiento. Tricomas cilíndricos de células pequeñas, discoideas (siempre más anchas que largas), ausencia de aerótopos. Vaina mucilaginososa evidente, firme, lamelada o no, incolora, amarilla o castaña. Célula terminal redondeada, con o sin caliptra. Reproducción por hormogonios.



Oscillatoria Vaucher

Tricomas solitarios o más comúnmente formando talos macroscópicos con diversos aspectos. Tricomas cilíndricos, rectos o ligeramente curvos, vaina mucilaginososa ausente. Con movimientos de oscilación. Células dos veces más anchas que largas, discoideas. Contenido celular verde azulado, castaño o violeta, homogéneo granulado, sin aerótopos. Célula apical redondeada, puede o no tener un espesamiento apical o caliptra. Reproducción por hormogonios con formación de necridios.



www.galerie.sinicearasy.cz

Phormidium Kütz. ex Gomont

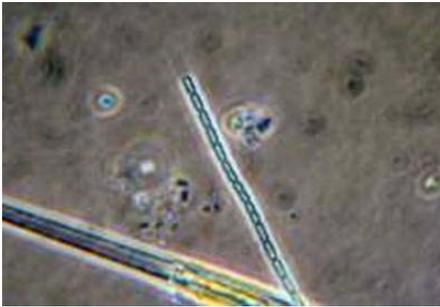
Talo usualmente expandido, fino, delgado, gelatinoso, unido al sustrato, cilíndricos, rectos hasta curvados, constrictos o no a nivel de los tabiques, vainas mucilaginosas firmes no lameladas, raramente forma masas flotantes. Células apicales convexas, cónicas, capitadas o no, con o sin caliptra. Reproducción por desintegración de los tricomas, sin aerótopos.



www.cyanobacteria-plataform.com

Planktothrix Anagnostidis et Komárek

Tricomas solitarios libreflotantes, rectos o levemente ondulados o curvados, isopolares, cilíndricos, no constrictos o menos frecuentemente constrictos a nivel de las uniones celulares. Tricomas levemente atenuado o no hacia los extremos, ausencia de envolturas gelatinosas. Células cilíndricas, raro en forma de barril, más cortas que anchas, con aerótopos, células apicales redondeadas o cónicas, a veces con caliptra o con pared celular exterior gruesa. División celular perpendicular al tricoma, reproducción por disgregación de los tricomas.



www.members.shaw.ca

Planktolyngbya Anagnostidis et Komárek

Filamentos libre flotantes, solitarios, rectos, flexuosos, ondulados o espiralados, irregularmente enrollados, vaina mucilaginosa delgada y transparente, muy raramente con falsas ramificaciones. Tricomas inmóviles, cilíndricos, isopolares, uniseriados, no constrictos o levemente constrictos en las uniones celulares, no atenuado a los extremos, célula apical redondeada no capitada, células cilíndricas usualmente más largas que anchas, sin aerótopos o con aerótopos polares solitarios. Todas las células son capaces de dividirse, reproducción por hormogonios.



Pseudanabaena Leuterborn

Tricomas solitarios o en pequeñas agrupaciones, rectos o flexuosos, constrictos a nivel de los septos, no atenuados. Presentan pocas células (2-3) a varias (más de 10). Vaina mucilaginosa inconspicua o ausente. Presentan movimiento de deslizamiento. Células más largas que anchas, cilíndricas o en forma de barril, ligeramente deprimidas en el centro. Célula apical cilíndrica con polos redondeados, contenido celular puede presentar gránulos, sin aerótopos.



Spirulina Turpin

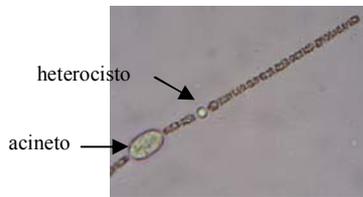
Tricomas espiralados, solitarios o formando pequeños agregados. Espiras bien condensadas o más flojamente agrupadas, vaina mucilaginosa ausente. Los tricomas presentan movimiento intenso. Células normalmente de cuadráticas a más anchas que largas, los septos son difíciles de observar. Contenido celular verde azulado, homogéneo, sin aerótopos. Reproducción por hormogonios.

ORDEN NOSTOCALES



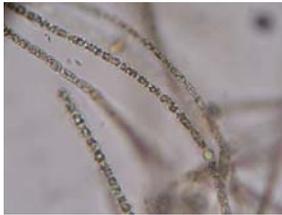
Anabaena Bory ex Born. & Flah.

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.



Aphanizomenon Morr. ex Born. & Flah.

Talos microscópicos, formados por filamentos aislados o agrupados paralelamente. Tricomas rectos, a veces pueden ser curvos, sin vaina mucilaginosa firme, algunas especies pueden presentar un mucílago amorfo. Tricomas isopolares, sub-simétricos. Células cilíndricas o en forma de barril, célula apical generalmente más larga que las intercalares, puede ser acuminada e hialina. Contenido celular verde azulado, con aerótopos. Heterocistos solitarios, intercalares. Acinetos elípticos o cilíndricos.



Cylindrospermopsis Seenayya & Subba Raju

Talo filamentoso, microscópico. Tricomas aislados, pueden ser rectos, curvos o espiralados, no poseen vaina mucilaginosa. Tricomas isopolares, célula apical cónica atenuada o acuminada. Contenido celular verde azulado, con aerótopos. Heterocistos cónico-redondeados (en forma de gota), siempre terminales y solitarios, no forman cadenas. Acinetos elípticos, oblongos o cilíndricos, únicos o en series, intercalares.





Nostoc Vaucher *ex* Born. & Flah.

Talos gelatinosos, mucilaginosos o coriáceos, redondeados, lobados o irregulares, macro o microscópicos. Colonias densas o laxas, presentan vaina mucilaginoso. Tricomas numerosos; isopolares, generalmente constrictos, no atenuados hacia el ápice. Células redondeadas, elípticas, en forma de barril. Contenido celular verde azulado, sin aerótopos. Heterocistos globosos, terminales e intercalares. Los acinetos pueden ser redondeados, elípticos o cilíndricos, forman cadenas entre dos heterocistos.



Raphidiopsis Fritsch & Rich

Talo microscópico, filamentoso. Tricomas aislados, rectos o curvos, isopolares, subsimétricos, levemente constrictos o no a nivel de los septos, atenuados hacia los extremos. Vaina mucilaginoso ausente. Células intercalares cilíndricas, apical cónica o acuminada. Presencia o no de aerótopos. Heterocisto ausente. Acinetos elípticos u oblongos.

En las tablas siguientes se presentan las características diferenciales de las especies de *Microcystis* y *Anabaena* encontradas más frecuentemente en el país.

Tabla 2: Características distintivas de las especies más frecuentes del género *Microcystis*

	Diámetro celular	Forma de la colonia	Características
<i>M. aeruginosa</i>	4-7 (9,4) μm	Colonia joven redondeada y compacta; adulta: irregular o lobada, clatrada. Mucilago homogéneo, distinguible.	Colonias micro o macroscópicas, a veces clatradas. Células con aerótopos, densa e irregularmente aglomeradas.
<i>M. botrys</i>	5-7 μm	Más o menos esféricas a alargadas, mucilago formando protuberancias.	Microscópicas, células con aerótopos densamente agregadas en el mucilago en subcolonias, no clatradas.
<i>M. flos-aquae</i>	3-4,8 μm	Compacta, esférica, elipsoidal o alargada, no clatrada. El borde del mucilago no excede al agrupamiento celular.	Colonia microscópica, raramente macroscópica. Células con aerótopos, densamente agrupadas en la colonia.
<i>M. novacekii</i>	3-5,5 μm	Irregularmente esféricas o alargadas, compuesta por subcolonias. Mucilago amplio, claro a débilmente amarillento, a veces irregular.	Micro a macroscópicas. Células con aerótopos densamente agrupadas en el centro de la colonia, con varias células solitarias esparcidas en la periferia del mucilago. No clatradas.
<i>M. panniformis</i>	3-4,6 μm	Jovenes: irregulares, adultas: redondeadas o alargadas	Macro o microscópica. Células con aerótopos, densamente ordenadas en la superficie de la colonia, no clatradas.
<i>M. protocystis</i>	4-6 μm	Contorno irregular, sin lóbulos distintivos y nunca con huecos. Mucilago indistinto con el margen difuso.	Microscópicas. Células con envoltura individual distribuidas de manera dispersa en la colonia. Se desintegra fácilmente en células individuales.
<i>M. pulverea</i>	0,5-2 (3) μm	Esférica o lobada, envueltas por un mucilago delgado	Colonias pequeñas, constituidas por gran número de células densamente agrupadas, ausencia de aerótopos.
<i>M. viridis</i>	3,5-7 μm	Redondeadas a cúbicas (como empaquetadas). Mucilago incoloro, borde refractivo, no esférico.	Colonias micro o macroscópicas, formadas por subcolonias. Agregados celulares no muy densos, a veces claramente tridimensional. Células con aerótopos.
<i>M. wesenbergii</i>	4-8,5 μm	Esférica cuando joven, al envejecer alargadas, lobadas y clatradas. Vaina firme, bien delimitada, contorno refringente.	Colonias microscópicas, a veces compuesta por subcolonias alcanzando un tamaño macroscópico.

Tabla 3: Características distintivas de las especies más frecuentes del género *Anabaena*

	Célula vegetativa	Heterocistos y acinetos	Características
<i>A. circinalis</i>	Células en forma de barril a esféricas, con aerótopos. 4-14 μm diámetro.	Heterocistos esféricos, del mismo tamaño que las células vegetativas; acinetos alargados ovoides a cortos y cilíndricos a veces con extremos cónicos. Heterocistos 8-12 μm diámetro. Acinetos 16-21 μm diámetro x 20-28.	Tricomas solitarios, a veces agrupados, espirales amplios (altura de la espira de 75 a 100 μm), mayormente sin mucílago.
<i>A. flos-aquae</i>	Células esféricas, con aerótopos, 4-5 (8) μm diámetro.	Heterocistos esféricos a ligeramente ovalados, acinetos ovoides a cilíndricos, distantes de los heterocistos. Heterocistos 4-5 (9) μm diámetro. Acinetos 8-9 μm diámetro x 13-35.	Tricomas irregularmente curvados, sin mucílago, espirales de diferentes tamaños.
<i>A. lemmermannii</i>	Esféricas a subcilíndricas 4-8 μm diámetro, 6-12 μm de largo	Heterocistos globosos o con depresiones en los extremos 7-9 μm diámetro, 6-10 μm largo; acinetos usualmente adyacentes a los heterocistos, 6-13 μm diámetro, 20-50 μm de largo.	Tricomas plactónicos, flexuosos, contorneados, a veces espiralados, solitarios o en masas.
<i>A. planctonica</i>	Células esféricas o en forma de barril, más cortas que anchas, con aerótopos. 9-15 μm diámetro.	Heterocistos esféricos del mismo tamaño que las células vegetativas; acinetos ovoides a cilíndricos. Heterocistos 9-16 μm diámetro. Acinetos 9-21 μm diámetro x 15-35.	Tricomas solitarios rectos rodeados por una amplia vaina mucilaginosa, difluente.
<i>A. solitaria</i>	Células esféricas a elipsoidales con aerótopos. 6,5-10 μm diámetro x 6,5-12 μm largo.	Heterocistos esféricos a forma de limón, del mismo tamaño que las células vegetativas; acinetos cilíndricos largos, más anchos que el filamento. Heterocistos 8-16 μm diámetro. Acinetos 10-16 μm diámetro x 20-45.	Tricomas solitarios rectos con vaina mucilaginosa amplia.
<i>A. spiroides</i>	Células esféricas a ampliamente elipsoidal o en forma de barril, con aerótopos. 6,5-9 μm diámetro.	Acinetos ovoides a veces curvados, distantes de los heterocistos, solitarios o en pares. Heterocistos 7-14 μm diámetro. Acinetos 10-15 μm diámetro x 17-22.	Tricomas solitarios espiralados (altura de la espira de 30-40 μm), rodeados de mucílago.

Bibliografía

- APHA. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (18th edn), American Public Health Association, Washington, DC.
- CALIJURI, M. C.; ADRIANI ALVES, M. S. & A. C. ALVES DOS SANTOS. 2006. Cianobacterias e Cianotoxinas em Aguas Continentais. Sao Carlos: RiMa 118 p.
- CARVAJAL, G.; CONTARDI, L.; FLORES, D.; GUERELLO, N.; LUDICA, M.; RODRÍGUEZ, J.; GIANUZZI, L.; ECHENIQUE, R. & D. ANDRINOLO. 2005. *Microcystis aeruginosa* en el Río de la Plata y cianotoxinas en el agua potable. Primera evaluación de la situación. Resúmenes Taller Internacional sobre enfoques Regionales para el Desarrollo y Gestión de Embalses en la Cuenca del Plata. Salto Grande, Entre Ríos. Pág. 3.
- CHALAR, G.; DE LEON, L.; BRUGNOLI, E.; CLEMENTE, J. & M. PARADISO. 2002. Antecedentes y nuevos aportes al conocimiento de la estructura y dinámica del Embalse de Salto Grande. El agua en Sudamérica: de la Limnología a la Gestión en Sudamérica. Fernández-Cirelli, A. & Chalar, G. (eds.). CYTED Aprovechamiento y Gestión de los Recursos Hídricos. 123-142. Bs. As.
- DE LEÓN, L. & J. S. YUNES. 2001. First report of a Microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Envir. Toxicol.* 16 (1): 110-112.
- DEVERCELLI, M. & M. O. GARCIA de EMILIANI. 2002. Fitoplancton y floración de cianobacterias en el Lago Parque General Belgrano. En Protección y restauración del Lago del Parque del Sur, Municipalidad de Santa Fe y CERIDE, Santa Fe. Cap. IV, p. 1-14.
- GARCIA de EMILIANI, M. O. & F. EMILIANI. 1997. Mortandad de Ganado y de aves silvestres por *Anabaena spiroides* Kleb. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* 28, 150-157
- GROSMAN, F. & P. SANZANO. 2002. Mortandades de Pejerrey *Odontesthes bonariensis* originadas por floraciones de cianobacterias em dos ambientes de Argentina. *Rev. Acuatic*, 17.
- GUARRERA, S. 1962. Estudios Limnológicos en La Laguna San Miguel del Monte (Pcia de Buenos Aires, República Argentina) con especial referencia al fitoplancton. *Rev. N.S.* IX, 40: 125-174.
- GUARRERA, S. A. & O. KÜHNEMANN. 1949. Catálogo de las Chlorophyta y Cyanophyta de agua dulce de La República Argentina. *Lilloa* 19: 219-318.
- IBELINGS, B. W.; BRUNING, K.; DE JONGE, J.; WOLFSTEIN, K.; PIRES, L. M.; POSTMA, J. & T. BURGER. 2005. Distribution of microcystins in a lake food web: no evidence for magnification. *Microb. Ecol.* 49: 487-500.
- INSTITUTO NACIONAL DEL AGUA (INA). 2004. Informe sobre Cianobacterias en el Río de la Plata. 49 p.
- KOMAREK, J. & K. ANAGNOSTIDIS. 1998. Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales. In: H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig & D. Möllenhauer (eds). *Sübwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 1-548.
- KOMAREK, J. & K. ANAGNOSTIDIS. 2005. Cyanoprokaryota. 1. Teil Oscillatoriales. In: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds). *Sübwasserflora von Mitteleuropa*. Elsevier: Spektrum Akademischer Verlag, Munique, pp. 759.
- LUND, J. W. G.; KIPLING, C. & E. D. LE CREN. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 11: 143-170.
- LÜRLING, M. 2003. *Daphnia* growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the Green alga *Scenedesmus obliquus*. *Limnol. Oceanogr.* 48: 2214-2220.
- MEICHTRY DE ZABURLIN, N.; GARRIDO, G. & J. G. PESO. 2004. Informe Final. Programa Calidad de Agua del embalse Yacyretá. Tomo IV, Capítulo I. Evaluación de la Calidad del Agua mediante parámetros Biológicos (comunidades planctónicas y bentónicas). Convenio EBY-FCEQN-UNaM. Posadas, Misiones, Argentina. 136 p.
- MEICHTRY DE ZABURLIN, N.; GARRIDO, G. & J. G. PESO. 2006. Informe Anual. Programa de calidad de agua del embalse Yacyretá. Tomo IV, Capítulo I. Estructura de las comunidades planctónicas y bentónicas del embalse Yacyretá y evaluación de la Calidad del Agua mediante parámetros Biológicos. Convenio EBY-FCEQN-UNaM. Posadas, Misiones, Argentina. 135 p.
- MEICHTRY DE ZABURLIN, N.; LLANO, V. M. & I. S. MARTENS. 2007. Estructura del fitoplancton en el embalse Yacyretá y su relación con variables físicas y químicas (p: 59-62). En: G. Gavazzo (Ed.) VI Jornadas Científico Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. 1 ed. Posadas: EDUNaM. 440 p.

- MEZ, K.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A.; HANSELMANN, K.; HAUSER, B.; NAEGELI, H. P. & H. R. PREISIG. 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Eur. J. Phycol.* 32: 111-117.
- MULLOR, J. B. 1945. Algas Tóxicas. *Rev. Col. Doct. Bioquímica y Farmacia*. Año 1 (2). Rosario.
- OTAÑO, S. H. 2005. Algas tóxicas en represas de la provincia del Chaco, Argentina. Resúmenes Taller Internacional sobre enfoques Regionales para el Desarrollo y Gestión de Embalses en la Cuenca del Plata. Salto Grande, Entre Ríos. Pág. 6.
- ODRIOZOLA, E.; BALLABENE, N. & A. SALAMANCO. 1984. Intoxicación en ganado bovino por algas verde-azuladas. *Revista Argentina de Microbiología* 16 (4): 219-224.
- PAERL, H. W.; FULTON, R. S.; MOISNDER, P. H. & J. DYBLE. 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World*, V. 1: 76-113.
- PIZZOLON, L.; TRACANNA, B.; PROSPERI, C. & J. M. GUERRERO. 1999. Cyanobacterial blooms in Argentinean inland Waters. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 4: 101-105.
- RINGUELET, R.; OLIVIER, S.; GUARRERA, S. & R. ARAMBURU. 1955. Observaciones sobre antoplancton y mortandad de peces en laguna del Monte (Buenos Aires, Argentina). *Fac. Cs. Nat. y Museo. Notas del Museo XVIII. Zool.*, 159: 71-80.
- RUIBAL CONTI, A. L.; RODRÍGUEZ, M. I.; RUIZ, M.; BUSTAMANTE, M. A. & C. M. ANGELACIO. 2005. Cooperación sectorial privado estatal en el abordaje de la problemática de desarrollos masivos de algas tóxicas. Resúmenes Taller Internacional sobre enfoques regionales para el Desarrollo y Gestión de Embalses en la Cuenca del Plata. Salto Grande, Entre Ríos. Pág. 12.
- SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. de P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L. R. & R. C. R de SOUZA. 2006. Manual Ilustrado para Identificação e contagem de Cianobactérias Plancónicas de Aguas Continentais Brasileiras. Interciencia, San Pablo, SBFic. 58 p.
- TELL, G. 1985. Catálogo de las Algas de Agua Dulce de la República Argentina. *Bibliotheca Phycologica* 70. J. Cramer. 283 p.
- TUNDISI, J. G. 2005. Agua no Século XXI: Enfrentando a Escassez. Sao Carlos: RiMa, IIE.
- UTERMÖHL, H. 1958. Zur vervollkommnung der Quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 9: 1-38.
- VOLLENWEIDER, R. A. & J. KEREKES. 1982. *Eutrophication of Waters. Monitoring Assessment and Control*. Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), Paris. 156 p.
- WETZEL, R. G. 2001. *Limnology*. Academic Press, New York. 1006 p.
- ZALOCAR de DOMITROVIC, Y. & M. FORASTIER, 2005. Biodiversidad de Cyanophyceae (Cyanobacteria) y especies toxigénicas del litoral fluvial argentino. *INSUGEO, Miscelánea*, 14: 213-228.

Capítulo 2: Cyanobacteria toxígenas. Aspectos generales para su identificación taxonómica

Ricardo O. Echenique
Anabella Aguilera

2.1. Introducción

Dada su naturaleza jerárquica, la clasificación biológica incluye una serie de niveles o rangos subordinados, denominados categorías taxonómicas, en los cuales se ubican los grupos de organismos considerados como unidad, los taxones. La identificación de un organismo es asignarlo al grupo o taxón al que pertenece de acuerdo a un sistema clasificatorio previamente establecido, de modo que se pueda llegar a conocer el nombre científico del ejemplar en estudio. En determinados casos esta tarea se realiza utilizando una clave dicotómica que es un esquema diseñado para facilitar la identificación de los organismos. Se trata de una expresión tabular que sigue una secuencia ordenada de opciones alternativas, en las cuales se expresan los caracteres diagnósticos o discriminatorios de los taxones. Un carácter diagnóstico debe estar definido con precisión y ser fácilmente reconocible y constante, ser independiente de otros y no proporcionar información redundante (Lanteri & Cigliano, 2004).

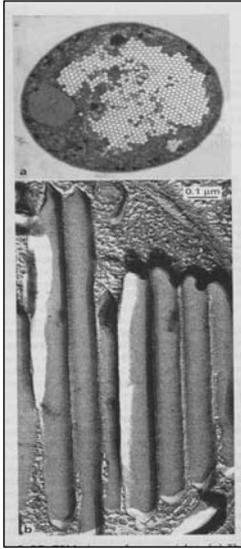
Uno de estos niveles taxonómicos es el de especie. En el caso particular de una especie de Cyanobacteria, Anagnostidis & Komárek (1985) la definen como un complejo de poblaciones que ocupa un espacio multidimensional propio delimitado por requerimientos ecológicos específicos (concepto de nicho). Otros autores indican que la unidad básica en taxonomía de procariontes se ajusta al concepto denominado filo-fenético (Rosselló-Mora & Amann, 2005), y entienden una especie como una categoría que circunscribe a un grupo de cepas de origen monofilético y que se muestran coherentes tanto desde el punto de vista genómico como fenotípico, y que por ello se pueden distinguir de otros grupos semejantes (Rosselló-Mora, 2001)

La importancia de definir especie radica, precisamente, en las características propias de cada una de ellas. Podemos encontrar especies de características fenotípicas similares, pero sensiblemente disímiles en sus requerimientos ecológicos e incluso en su "relación" con el hombre. Es muy frecuente encontrar especies de aspecto similar dentro de un mismo género y una de ellas ser toxígena y la otra totalmente inocua.

Las Cyanobacteria, Cyanophyta, Cyanoprokaryota o vulgarmente algas verde-azules, presentan tanto caracteres propios de las Bacteria como de las plantas eucariotas. Al igual que las bacterias carecen de un núcleo y plástidos delimitados morfológicamente así como de reproducción sexual. La presencia de clorofila *a*, la estructura de tilacoides y la posibilidad de realizar fotosíntesis, las relacionan con las algas eucariotas (Anagnostidis & Komárek, 1985).

En las Cyanobacteria, la fotosíntesis es el principal modo de obtención de energía para su metabolismo y los pigmentos presentes son clorofila *a*, *b*, xantofilas, *c*-ficocianina, *c*-ficoeritrina y carotenos. Como reserva asimilan una sustancia semejante

al glicógeno. En algunas especies las células contienen vacuolas, vesículas gaseosas o aerotopos.



Las **vacuolas, vesículas gaseosas o aerotopos**, son estructuras compuestas por una serie de cilindros que se agrupan y que pueden variar en número, lo que puede modificar el tamaño vacuolar.

Su presencia/ausencia, número y distribución en las células, resulta un carácter taxonómico.

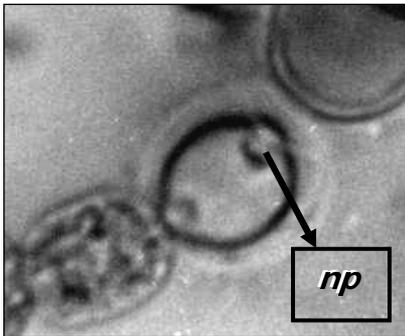
Son estructuras que regulan la altura de flotación de las células dentro de la columna de agua, en los períodos en los que la producción de vacuolas es muy importante, las células flotan quedando expuestas directamente a las condiciones propias de la superficie de los cuerpos de agua. En tales condiciones (alta luminosidad y mayor temperatura), la presión interna del gas de las vacuolas se incrementa y provoca el estallido de las mismas e incluso la ruptura celular.

De Graham & Wilcox, 2000

El grupo varía en su conjunto presentando una gran heterogeneidad morfológica. Incluye formas coccas (unicelulares o coloniales), filamentosas (homocistineos o heterocistineos; ramificadas o no).

No se observan formas móviles (cilios o flagelos).

En los organismos filamentosos heterocistineos pueden encontrarse células modificadas: los heterocistos y/o los acinetos.

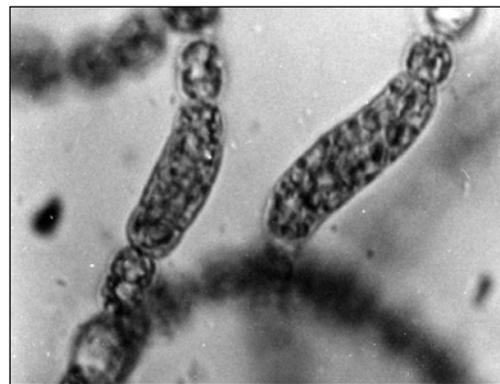


Los **heterocistos** son células modificadas de colores refringentes y morfología variada. Poseen un engrosamiento polar en el extremo celular (*nódulo polar- np*) que se encuentra en contacto con la célula contigua. Pueden o no tener vaina.

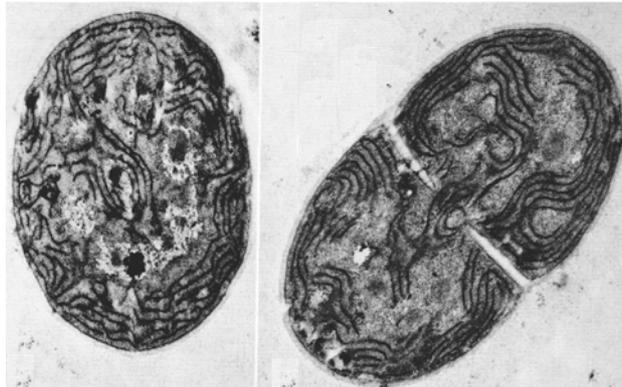
Están relacionados con la fijación de nitrógeno atmosférico.

Los **acinetos** son células modificadas de formas y tamaños variados y de contenido granular. Pueden o no poseer vaina. Su función principal es la de asimilar sustancias de reserva, actuando como estructura de resistencia ante situaciones de estrés. Ante condiciones favorables, germinan dando origen a una nueva población.

Para la clasificación, son fundamentales su morfología y/o ubicación en el tricoma.



La reproducción es solo vegetativa. La membrana plasmática se pliega centripetamente y la célula se divide en dos partes (división binaria), que puede ser simétrica o asimétrica y hasta irregular.

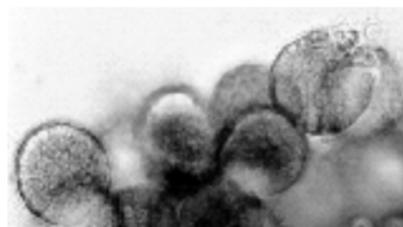


División celular en Cyanobacteria (según Komárek & Anagnostidis, 1986)

En los organismos cocales, otra forma de división es por formación de exocitos (exosporas). En este caso una célula sésil sufre una división binaria asimétrica, simple o múltiple y las esporas se liberan por separación desde el extremo libre. En otros casos, la célula sufre múltiple división en tres planos, produciendo nanosporas endógenas (baecitos) que se liberan por ruptura de la pared materna.

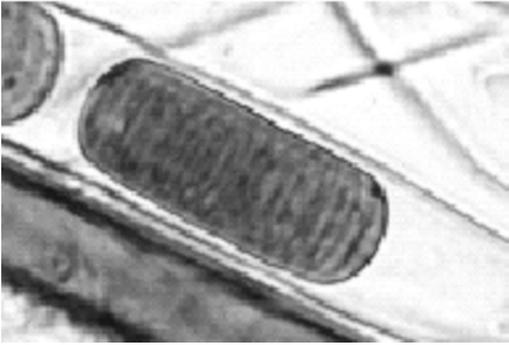


Formación de endosporas

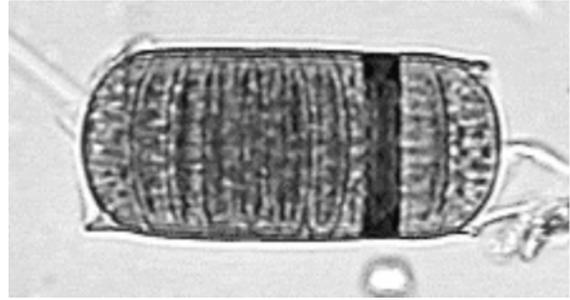


Baecitos (según Sant'Anna 2004)

Entre los organismos homocistíneos, la forma de reproducción es, además del crecimiento de los tricomas por división celular centripeta, por fragmentación. El resultado de esta fragmentación resulta en dos diferentes estructuras reproductivas: hormocistos (con vaina) ú hormogonios (sin vaina).



Hormocisto (según Sant'Anna 2004)

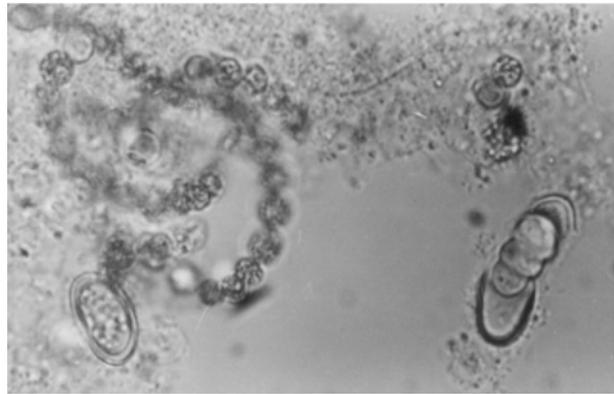


Hormogonio

Por último, como ya se comentó mas arriba, las especies heterocistineas pueden reproducirse por "germinación" del acineto dividiéndose transversalmente dando así origen a un nuevo organismo.



Anabaena lemmermannii
Acineto dividiéndose (en ambiente natural)



Anabaena circinalis
Acineto dividiéndose (en cultivo)
(Gentileza D. González)

2. 2. Taxonomía

Según Komárek y Anagnostidis (1986, 1998, 2005) y Anagnostidis y Komárek (1988, 1989) las Cyanobacteria (en su concepto las Cyanoprokaryota) se clasifican en 4 Ordenes: **Chlorococcales**, **Oscillatoriales**, **Nostocales** y **Stigonematales**.

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

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

Nostocales: talo filamentoso heterocistineo, no ramificado o con falsas ramificaciones; reproducción por hormogonios u hormocistos.

Stigonematales: talo filamentoso heterocistineo, con ramificaciones verdaderas; reproducción por hormogonios u hormocistos.

En tres de ellos, Chlorococcales, Oscillatoriales y Nostocales, se encuentran especies mencionadas como toxígenas.

2. 3. Principales géneros toxígenos presentes en Argentina

Orden **Chroococcales**

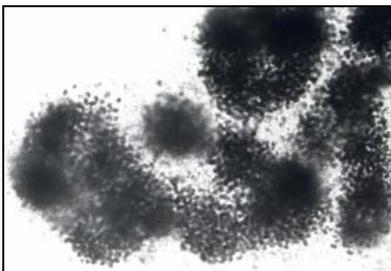
1.- Género **Microcystis** Kützing, 1833

Colonias micro a macroscópicas, esféricas, ovales a irregulares; algunas especies clatradas. Vaina general mucilaginoso, incolora, desde homogénea a lamelada, indistinguible a evidente por refracción. Células esféricas a hemiesféricas luego de la división celular, sin vaina propia, con o sin vacuolas gaseosas. División celular por fisión en tres planos perpendiculares. Reproducción vegetativa por desintegración de las colonias. Planctónicas.

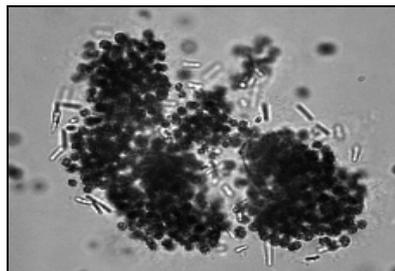
Las especies toxígenas de este género son las más ampliamente conocidas y distribuidas a nivel mundial, siendo *M. aeruginosa* la más difundida.

Especies mencionadas como toxígenas: *M. aeruginosa* (Kütz.) Kützing; *M. botrys* Teiling; *M. farlowiana* Drouet & Daily; *M. flos-aquae* (Wittr.) Kirchner, *M. ichthyoblabe* Kützing, *M. lamelliformis* Holsinger; *M. viridis* Lemmermann; *M. wesenbergii* (Kom.) Komárek. (según Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998; Komárek & Anagnostidis, 1998; Sivonen & Jones, 1999)

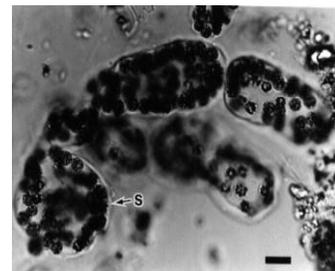
Las toxinas descritas para los taxa pertenecientes a este género son hepatotoxinas, siendo las más importantes las microcystinas.



M. aeruginosa



M. viridis



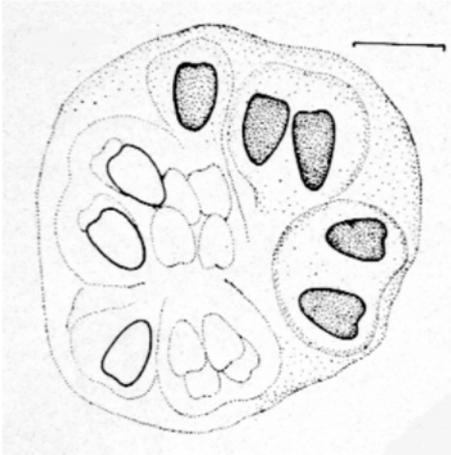
M. wesenbergii

2.- Género **Gomphosphaeria** Kützing, 1836

Colonias esféricas o irregulares, comúnmente compuestas por subcolonias. Vaina general fina y difluente. Células oviformes, cuneiformes o cordiformes, reunidas entre sí por tractos mucilaginosos y distribuidas radialmente hacia la periferia de la colonia, formando varios niveles a medida que crece la misma. Tractos difluentes hacia el centro de la colonia. Sin vacuolas gaseosas. División celular en dos planos perpendiculares y reproducción de la colonia por desintegración. Planctónicas.

Especies mencionadas como toxígenas: *G. aponina* Kützing (según Falconer, 1998)

Las toxinas son desconocidas (según Skulberg *et al.*, 1993)



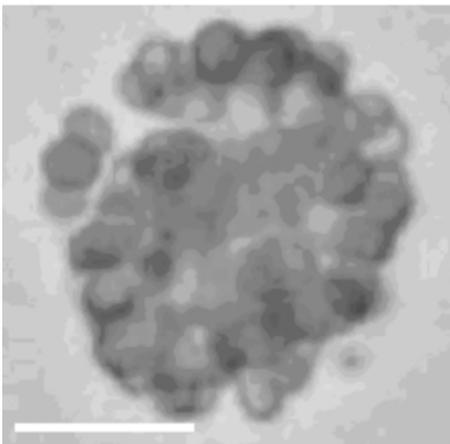
G. aponina (según Guarrera *et al.*, 1987)

3.- Género **Snowella** (Gomphosphaeria) Elenkin, 1938

Colonias más o menos esféricas o irregularmente ovals, ocasionalmente compuestas, con vaina homogénea, incolora, distinguible o no. Células esféricas a ligeramente alargadas, reunidas entre si por tractos mucilaginosos y distribuidas radialmente hacia la periferia de la colonia; con o sin vacuolas gaseosas. División celular por fisión binaria en dos planos perpendiculares. Reproducción de la colonia por desintegración. Planctónicas.

Especies mencionadas como toxígenas: *S. lacustris* (Chod.) Komárek & Hindák.

Las toxinas son desconocidas. (según Skulberg *et al.*, 1993)



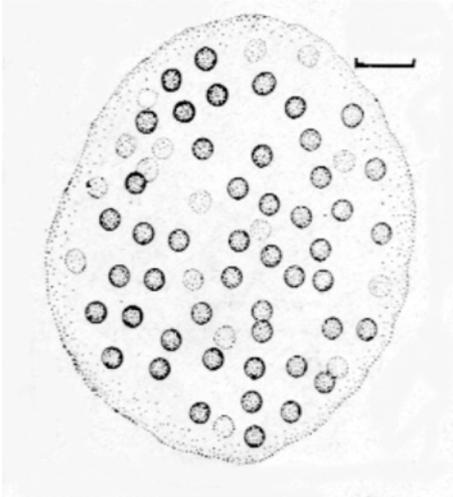
S. lacustris

4.- Género **Coelosphaerium** Nägeli, 1849

Colonias microscópicas, globosas, en ocasiones compuestas por subcolonias; cubiertas por una vaina mucilaginosa fina e incolora. Células esféricas o hemiesféricas, ubicadas en una única capa, en la periferia de la colonia. Con o sin vacuolas gaseosas. Mucilago no estructurado en el centro de la colonia, formando pequeños pedúnculos hacia el margen. División celular por fisión binaria en dos planos perpendiculares. Reproducción de la colonia por desintegración. Planctónicas.

Especies mencionadas como toxígenas: *C. kuetzingianum* Nägeli (según Falconer, 1998).

Las toxinas son desconocidas. (según Skulberg *et al.*, 1993)



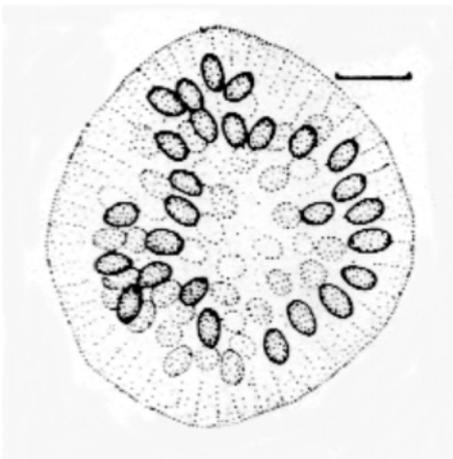
C. kuetzingianum (según Guarrera *et al.*, 1987)

5.- Género **Woronichinia** Elenkin, 1933

Colonias globosas, comúnmente compuestas por subcolonias, rodeadas por una delgada e incolora vaina mucilaginosa general. Células ligeramente alargadas, ovales a ovoides, raramente esféricas, dispuestas en el extremo de tractos mucilaginosos que parten radialmente desde el centro de la colonia. Con o sin vacuolas gaseosas. División celular en dos planos perpendiculares, formando diferentes niveles, quedando las células más antiguas en las capas más internas de la colonia. Reproducción por fragmentación de la colonia. Planctónicas.

Especies mencionadas como toxígenas: *W. naegeliana* (Unger) Elenkin (según Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998)

Las toxinas son desconocidas. (según Skulberg *et al.*, 1993)



W. naegeliana (según Guarrera *et al.*, 1987)

Clave géneros:

- 1.- Colonias globosas con células ordenadas radialmente y más o menos en la periferia de la colonia. A veces con un sistemas de pedúnculos mucilaginosos organizados desde el centro de la colonia **2**
- 2.- Células ordenadas más o menos en la periferia de la colonia en un único nivel. Sin sistemas de pedúnculos organizados desde el centro de la colonia **Coelosphaerium**
- 2'.- Células ordenadas hacia la periferia de la colonia, a distintos niveles y dispuestas en el extremo de pedúnculos mucilaginosos, organizados desde el centro de la colonia **3**
- 3.- Células dispuestas en el extremo de pedúnculos, claramente evidentes **Snowella**
- 3'.- Células dispuestas en el extremo de pedúnculos, poco evidentes y en ocasiones invisible..... **4**
- 4.- Células de hasta 6 µm (raramente 7 µm), esféricas, ovoides u ovoides, agrupadas densamente hacia el margen de la colonia **Woronichinia**
- 4'.- Células usualmente de mas de 6 µm, ovoides, cuneiforme o cordiforme, dispuestas laxamente hacia el margen de la colonia **Gomphosphaeria**
- 1.- Colonias globosas con células dispuestas irregularmente, esparcidas en el interior de una matriz mucilaginosa. Nunca presenta células asociadas a sistemas de pedúnculos mucilaginosos **Microcystis**

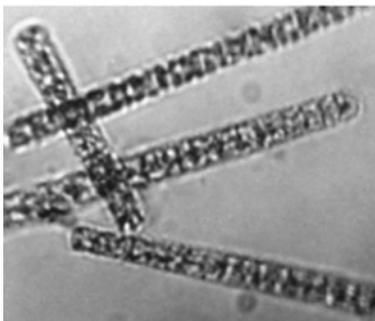
Orden ***Oscillatoriales***

- 1.- Género **Planktothrix (*Oscillatoria* 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-discoides 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 tóxicas: *P. agardhii* (Gom.) Anagnostidis & Komárek; *P. rubescens* (DeCandolle ex Gom.) Anagnostidis & Komárek.

Las toxinas mas conocidas son microcystinas y neurotoxinas. (según Skulberg et al, 1993; Sivonen & Jones, 1999).



P. agardhii

2.-Género **Phormidium (Oscillatoria pp.)** Kützing ex Gomont, 1982

Tricomas cilíndricos, rectos hasta curvados, constrictos o no a nivel de los tabiques, formando agregados o solitarios. Vainas firmes no lameladas. Células aproximadamente isodiamétricas; las apicales convexas, cónicas, capitadas o no, con o sin caliptra. Vacuolas gaseosas, ausentes. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción del tricoma por disgregación a partir de necridios. Epífitos a planctónicos.

Especies mencionadas como toxígenas: *P. formosum* (Bory ex Gom.) Anagnostidis & Komárek.

Las toxinas mas conocidas son neurotoxinas (según Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999)



P. formosum (según Guarrera et al., 1995)

3.- Género **Pseudanabaena** Lauterborn, 1915

Tricomas, uniseriados, flexibles, solitarios. Vaina ausente. Células aproximadamente cilíndricas, rectas, dolioliformes o ligeramente deprimidas en el centro con polos aproximadamente rectos o convexos y unidas entre sí por cordones intercelulares ("puentes hialinos"). La célula apical convexa. Con o sin vesículas gaseosas. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción del tricoma por hormogonios o por disgregación. Planctónicas o metafísicas.

Especies mencionadas como toxígenas: *P. catenata* Lauterborn.

Las toxinas mas conocidas son neurotoxinas (según Skulberg *et al.* 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999).



P. catenata

Clave géneros:

1.- Tricomas solitarios o raramente formando "matas", cilíndricos y de pocas células, isopolares. Vaina general ausente, ocasionalmente rodeado de difluente envoltorio mucilaginoso. Células con o sin aerotopos o vesículas gaseosas, las apicales sin caliptra o engrosamiento polar. Células unidas entre sí por cordones intercelulares ("puentes hialinos") **Pseudanabaena**

1'.- Tricomas solitarios o raramente formando "matas", cilíndricos y de gran número de células, generalmente isopolares. Vaina facultativa, cuando presente fina no lamelada e incolora. Células con o sin aerotopos o vesículas gaseosas, las apicales con o sin caliptra y/o engrosamiento polar. Células nunca unidas entre sí por cordones intercelulares ("puentes hialinos") **2**

2 .- Tricomas solitarios, sin vaina distinguible. Células con aerotopos o vacuolas gaseosas. Mayormente planctónicas **Planktothrix**

2' .- Tricomas solitarios agrupados formando talos expandidos. Vaina facultativa, cuando presente fina e incolora. Células sin aerotopos o vacuolas gaseosas. Mayormente adnados, ocasionalmente planctónicas **Phormidium**

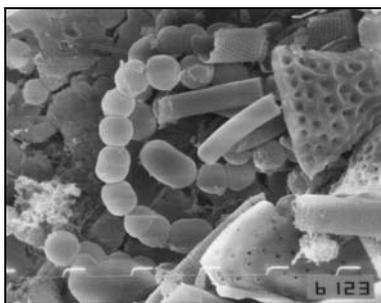
Orden **Nostocales**

1.-Género **Anabaena** Bory, 1822

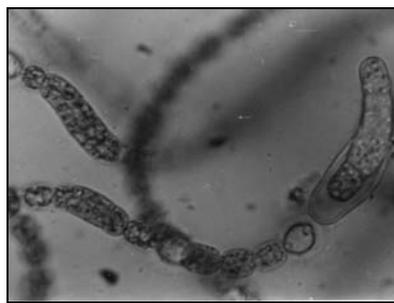
Tricomas rectos o mas o menos curvados, hasta flexuosos y/o espiralados; no atenuados o ligeramente atenuados hacia los extremos; solitarios o agrupados en clusters e incluso formando matas. Con o sin vaina. Células redondeadas o redondeado-cónicas a dolioliformes; con o sin vacuolas gaseosas. Heterocistos y acinetos intercalares, diferenciados a partir de células vegetativas. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción del tricoma por disgregación. Planctónicas o adnadas, fijas a suelos o sustratos sumergidos.

Especies mencionadas como toxígenas: *A. affinis* Lemmerman; *A. baltica* J. Schmidt; *A. circinalis* (Kütz.) Hansgirg; *A. flos-aquae* (Lyngb.) Brébisson; *A. hassallii* (Kütz.) Wittrock; *A. lemmermannii* P. Richter; *A. planctonica* Brunthaler; *A. spiroides* Klebahn; *A. spiroides* var. *contracta* Klebahn; *A. torulosa* (Carm.) Lagerheim; *A. variabilis* Kützing. (según Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999)

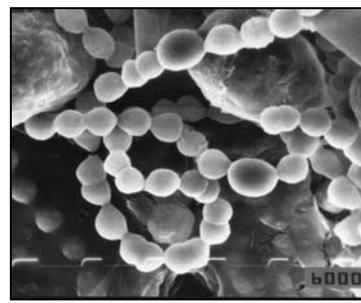
Las toxinas descritas para los taxa pertenecientes al género *Anabaena* son péptidos (microcystinas) y alcaloides. Entre los alcaloides con propiedades neurotóxicas, se encuentran los más potentes, tales como *Anatoxinas a*, *Anatoxinas a(s)* y *Saxitoxinas*. (Skulberg *et al* 1993; Falconer 1998; Sivonen & Jones, 1999).



A. circinalis



A. lemmermannii



A. spiroides

2.-**Anabaenopsis** V. Miller 1923

Tricomas solitarios, curvos a espiralados; células esféricas o elípticas, constrictas a nivel de los tabiques, con o sin vacuolas gaseosas. Heterocistos esféricos, situados en los extremos de los tricomas y acinetos, únicos o en series, intercalares. Planctónicas.

Especies mencionadas como toxígenas: *A. milleri* Woronichin; *A. abijatae*

Las toxinas descritas para los taxa pertenecientes al género, son hepatotoxinas (microcistinas) (Lanaras *et al.*, 1989; Sivonen & Jones, 1999; Dow & Swoboda, 2000; Ballot *et al.*, 2005).



Anabaenopsis sp.

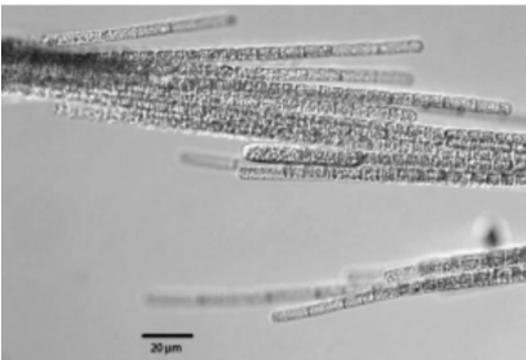
3.-Género **Aphanizomenon** Morren 1838

Tricomas rectos o levemente arqueados, atenuados hacia los extremos, solitarios o reunidos formando masas, sin vaina. Células cilíndricas de extremos redondeados; las de los extremos alargadas y en ocasiones terminadas en forma de pelo. Con vacuolas gaseosas. Heterocistos intercalares oblongos o cilíndricos, con a sin vaina prominente. Acinetos esféricos o cilíndrico-alargados, alejados del heterocisto. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción del tricoma por disgregación. Planctónico.

Especies mencionadas como toxígenas: *A. flos-aquae* (L.) Ralfs; *A. ovalisporum* Forti. (según Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999)

Las toxinas descritas para los taxa pertenecientes al género *Aphanizomenon* son cylindrospermopsinas, saxitoxinas y anatoxinas. (Skulberg *et al.* 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999).

Una particularidad de esta especie es que en algunos países, se utilizan cultivos de sepas no tóxicas como suplementos dietarios.



A. flos-aquae

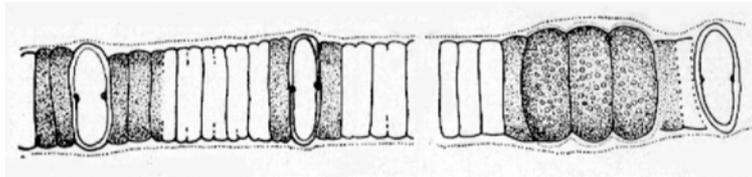
4.- Género **Nodularia** Mertens, 1822

Tricomas uniseriados, constrictos a nivel de los tabiques. Vaina hialina, tenue e incolora. Células discoides más o menos infladas. Heterocistos intercalares, discoides, algo más anchos que las células vegetativas. Acinetos globosos, subglobosos o disciformes, intercalares, de mayor tamaño que los heterocistos, comúnmente dispuestos en series, contiguos o no al heterocisto. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción del tricoma por disgregación. Planctónico.

Especies mencionadas como toxígenas: *N. spumigena* Mertens (según Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999).

La principal toxina descrita para los taxa pertenecientes al género *Nodularia* es una hepatotoxina, la nodularina. (Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999).

La primer mención de muerte de animales por intoxicación con Cyanobacteria está relacionada con la presencia de *Nodularia spumigena* como responsable del suceso (Francis, 1878).



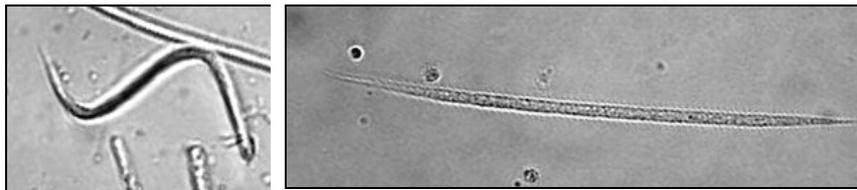
N. spumigena (según Guarrera *et al.*, 1968)

5.- Género **Rhaphidiopsis** Fritsch & Rich., 1929

Tricomas solitarios, rectos o ligeramente curvados, hasta sigmoides, que se agudizan hacia ambos extremos. Células cilíndricas o ligeramente tronco-cónicas, la de los extremos largamente aciculares, constrictas o no a nivel de los tabiques. Tabiques intercelulares, a veces indistinguibles. Heterocistos ausentes. Acinetos intercalares, oblongos. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción del tricoma por disgregación. Planctónicos.

Especies mencionadas como toxígenas: *R. curvata* Fritsch; *R. mediterranea* Skuja

Las toxinas descritas para los taxa pertenecientes al género son hepatotoxinas (cylindrospermopsina) (Hawkins *et al.*, 1985, según Skulberg *et al.*, 1993) y paralizantes (saxitoxinas) (Lagos *et al.*, 1999).



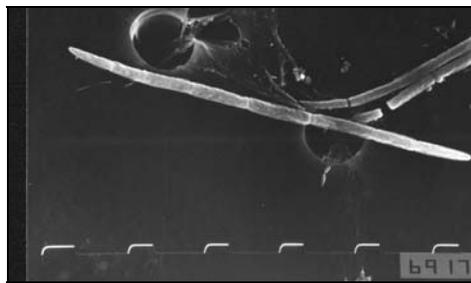
R. mediterranea

6.- Género **Cylindrospermopsis** Seenayya et Subba Raju, 1972

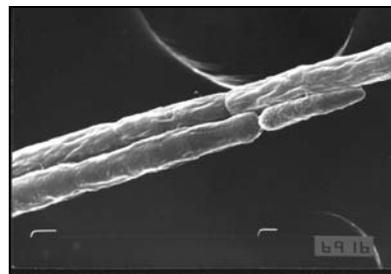
Tricomas solitarios, rectos o ligeramente curvados, hasta sigmoides, que se atenuan hacia ambos extremos. Células cilíndricas o ligeramente tronco-cónicas, constrictas o no a nivel de los tabiques. Con o sin vacuolas gaseosas. Sin Vaina. Heterocistos terminales, cónico-redondeados. Acinetos intercalares, oblongos, solitarios o seriados. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción del tricoma por disgregación. Planctónicos.

Especies mencionadas como toxígenas: *C. raciborskii* (Wolosz.) Seenayya et Subba Raju (según Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999)

Las toxinas descritas para los taxa pertenecientes al género **Cylindrospermopsis** son hepatotoxinas: cylindrospermopsina (Hawkins *et al.*, 1985, según Skulberg *et al.*, 1993) y paralizantes: saxitoxinas (Lagou *et al.*, 1999).



C. raciborskii (MEB)



C. raciborskii, detalle (MEB)



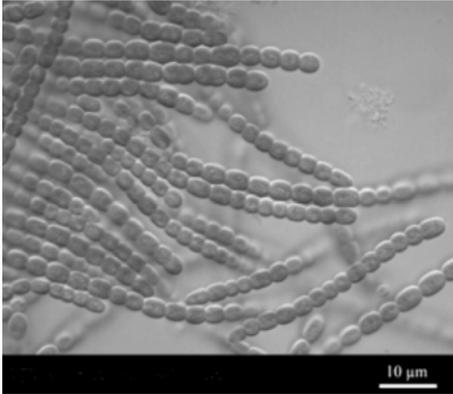
C. raciborskii (MO)

7.- Género **Nostoc** Vaucher, 1803

Talos gelatinosos, mucilaginosos o coriáceos; globosos (hueco o compacto), foliosos, filiformes o lobulados; generalmente macroscópicos. Peridermo más o menos denso y rígido. Tricomas, generalmente numerosos, uniseriados, entrelazados o dispuestos radialmente. Vaina individual de los tricomas difluente o visibles, incoloras o coloreadas. Células esféricas o subsféricas hasta cilíndricas. Heterocistos globosos, intercalares. Acinetos esféricos u oblongos hasta cilíndricos, solitarios o en series, cercanos o alejados al heterocisto. División celular transversal al eje longitudinal. Reproducción del tricoma por hormogonios y de la colonia por disgregación. Acuáticos, fijos o planctónicos; subaéreos o terrestres.

Especies mencionadas como toxígenas: *N. linkia* (Roth) Bornet et Flahault; *Nostoc aff. minutum* Desmazieres ex Bornet et Flahault; *N. paludosum* Kützing; *N. rivulare* Kützing (según Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999)

Las toxinas descritas para los taxa pertenecientes al género *Nostoc* son microcystinas péptidos y alcaloides. Entre los alcaloides con propiedades neurotóxicas, se encuentran los más potentes, tales como *Anatoxinas a*, *Anatoxinas a(s)* y *Saxitoxinas*. (Skulberg *et al.*, 1993; Falconer, 1998; Sivonen & Jones, 1999).



N. minutum (según M.M. Watanabe
www.nies.go.jp/biology/mcc/class/Nostoc.html)

Clave géneros:

- 1.- Tricomas con heterocistos 2
- 2.- Tricomas con heterocistos terminales 3
- 3.- Tricomas con heterocistos esféricos..... **Anabaenopsis**
- 3'.- Tricomas con heterocistos cónicos o largamente ovoides
 **Cylindrospermopsis**
- 2'.- Tricomas con heterocistos intercalares 4
- 4.- Tricomas formando colonias definidas, rodeadas por un peridermo firme..... **Nostoc**
- 4'.- Tricomas solitarios o formando agregados, nunca rodeados por un peridermo firme 5
- 5.- Tricomas formados por células discoides **Nodularia**
- 5'.- Tricomas formados por células globosas 6
- 6.- Células vegetativas cilíndricas, las de los extremos alargadas terminadas en forma de pelo **Aphanizomenon**
- 6'.- Células vegetativas esféricas a elípticas, las de los extremos nunca terminadas en forma de pelo **Anabaena**
- 1'.- Tricomas sin heterocistos..... **Rhaphidiopsis**

Bibliografía

- ANAGNOSTIDIS, K. & J. KOMÁREK. 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1- Introduction. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 71, 1/2 Algological Studies 38/39: 291-302.
- ANAGNOSTIDIS, K. & J. KOMÁREK. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3- Chroococcales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 80/ Algological Studies 50-53: 327-472.
- ANAGNOSTIDIS, K. & J. KOMÁREK. 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4- Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82/ Algological Studies 56: 247-345.
- BALLOT, A.; L. KRIENITZ; K. KOTUT; C. WIEGAND & S. PFLUGMACHER. 2005. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 4 (2005) 139-150
- DOW, C.S & U.K. SWOBODA. 2000. Cyanotoxins. In WHITTON, B.A. & M. POTTS. The Ecology of Cyanobacteria (eds.) Kluwer Academic Publishers: 613-632.
- FALCONER, I.R. 1998. Algal toxins and human health. In: J.HRUBEC (ed.). The handbook of Environmental Chemistry. Vol.5. Part C. Quality and Treatment of Drinking Water II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 53-82.
- FRANCIS, G. 1878. Poisonous Australian Lake. *Nature* 444, 11-12.
- GRAHAM, L. E. & L. W. WILCOX (2000) *Algae*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. 640 pp.
- GUARRERA, S.A., S.M. CABRERA, F. LOPEZ & G. TELL. 1968. Fitoplancton de las aguas superficiales de la Provincia de Buenos Aires I. Área de la pampa deprimida. *Rev. Mus. La Plata* 10 (Bot. 49): 223-331.
- GUARRERA, S.A., M.A. CASCO, R.O. ECHENIQUE & H.A. LABOLLITA. 1987. Las algas del sistema del Río Limay (R. Argentina) I. Cyanophyta: Chroococcales y Chamaesiphonales. *Rev. Mus. La Plata* 14 (Bot. 96): 163-189.
- GUARRERA, S.A., R.O. ECHENIQUE, M.A. CASCO & H.A. LABOLLITA. 1995 Las algas del sistema del Río Limay (R. Argentina) I. Cyanophyta: 2- Hormogonales. *Rev. Mus. La Plata* 14 (Bot. 101): 269-305.
- KOMÁREK, J. & K. ANAGNOSTIDIS. 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2- Chroococcales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 73, Algological Studies 43: 157-226.
- KOMÁREK, J. & K. ANAGNOSTIDIS. 1998. Cyanoprokaryota 1: Chroococcales. In Ettl, H., G. GÄRTNER, H. HEYNIG & D. MOLLENHAUER (eds.) Süßwasserflora von Mitteleuropa: 548 pp.
- KOMÁREK, J. & K. ANAGNOSTIDIS. 2005. Cyanoprokaryota 2: Oscillatoriales. In BÜDEL, B., L. KRIENITZ, G. GÄRTNER, & M. SCHAGERL (eds.) Süßwasserflora von Mitteleuropa: 759 pp.
- LAGOS, N.; H. ONODERA; P.A. ZAGATTO; D. ANDRINOLO; S.M.F.O. AZEVEDO & Y. OSHIMA. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.
- LANARAS, T., S. TSITSAMIS, C. CHLICHIA, & C.M. COOK. 1989. Toxin cyanobacteria in Greek freshwaters. *J. Appl. Phycol.*: 142, 163-169.
- MARGARÍA, C. & A. LANTERI. 2004. Caracteres Taxonómicos. En LANTERI, A.A. & M.M. CIGLIANO (eds.). Sistemática Biológica: fundamentos teóricos y ejercitaciones. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata: 49-65.
- ROSELLO-MORA, R & R. AMAN. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiological Reviews*. 25:39-67.
- ROSELLO-MORA, R. 2005. El concepto de especie en Procariotas. *Ecosistemas* 14 (2): 11-16
- SANT'ANNA, C. 2004. Cyanobacteria. In Workshop IOC: The contribution of information and communication technologies to the development of education, science and culture and the construction of the knowledge society. 2-6 de junio, UNIVALI, Itajaí, Brazil.
- SIVONEN, K. & G. JONES. 1999. Cyanobacterial Toxins. In CHORUS, I. & J. BARTRAM, (eds.) Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, London: 41-112.
- SKULBERG O.M., W.W. CARMICHAEL, G. A. CODD & R.R. SKULBERG. 1993. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In FALCONER I.R. (ed.) Algal toxins in seafood and drinking water: 145-164. Academic Press.

Capítulo 3: Floraciones de *Cyanobacteria* toxígenas en la República Argentina: antecedentes

Ricardo O. Echenique
Anabella Aguilera

El constante incremento de la población humana trae como consecuencia un aumento de ciertas actividades que ejercen un alto impacto sobre los cuerpos de agua continentales provocando el deterioro de los mismos. Muchas de estas actividades fuerzan los sistemas acuáticos al incorporar un exceso de nutrientes y materia orgánica, lo que altera las condiciones originales. De esta manera se inician los procesos de eutrofización con el correspondiente desarrollo masivo de poblaciones algales planctónicas (floraciones o "blooms" algales). Esta eutrofización artificial o también denominada "eutrofización cultural" altera significativamente las características naturales de los ecosistemas y trae aparejada la disminución de la calidad del agua para la fauna y flora asociadas lo que conlleva, entre otras cosas, a una disminución y pérdida de la biodiversidad.

Con relación al hombre, los procesos de eutrofización son un verdadero problema y generan importantes consecuencias: el deterioro paisajístico de los cuerpos de agua afectados conlleva una disminución en el valor estético y recreativo; los costos de procesamiento para potabilización de agua se incrementan significativamente y la disminución de la calidad del agua trae asociados graves problemas sanitarios, entre ellos el desarrollo de condiciones propicias para el asentamiento de vectores de enfermedades.

Si bien el reconocimiento de los fenómenos de eutrofización se inició aproximadamente en la década de 1950, no fue hasta alrededor de cuatro décadas atrás que éstos comenzaron a asociarse con la proliferación masiva de *Cyanobacteria* planctónicas, en muchos casos productoras de sustancias nocivas de diversa naturaleza química. (Chorus & Bartram. 1999)

Un aspecto negativo relacionado con las floraciones de cianobacterias, es la alteración de las características organolépticas del agua (gusto y sabor) que estas algas pueden provocar. Esto se debe a la liberación de metabolitos volátiles olorosos por parte de ciertas especies. Compuestos tales como la geosmina y/o el metilisoborneol, no son tóxicos (Falconer et al., 1999; Falconer, 1998), pero suelen generar trastornos respiratorios y/o digestivos a personas sensibles. La presencia de geosmina en los ambientes acuáticos de uso recreativo tiene un efecto negativo ya que el olor de este compuesto es muy similar al que produce el insecticida organoclorado, comercialmente denominado "Gamexane".

Otra situación nociva esta relacionada con su potencial capacidad de generar sustancias tóxicas (hepatotóxicas, neurotóxicas y/o dermatotóxicas), las cuales son liberadas al ambiente produciendo serios efectos negativos. La primera referencia mundial relacionada con estos aspectos de toxicidad de cianobacterias en ambientes acuáticos continentales se remonta al año 1878, cuando en el lago Alexandrina (Australia)

se produjo la mortandad de animales, entre ellos vacas, caballos, perros, ovejas y cerdos, luego de que estos bebieran agua del mencionado cuerpo de agua donde se desarrollaba una floración de *Nodularia spumigena* (Francis, 1878).

Desde ese momento y, principalmente en las últimas décadas, el registro de sucesos similares se ha incrementado a nivel mundial tanto en el número de especies responsables, como frecuencia, intensidad y extensión geográfica.

Las intoxicaciones de poblaciones humanas por ingesta de agua contaminada por cepas tóxicas de cianobacterias ya han sido descritas, entre otros, en países como Australia, Inglaterra, China y Sudáfrica (Carmichael & Falconer, 1993). El primer registro de muertes humanas causadas por cianotoxinas ocurrió en 1996, en una clínica de la ciudad de Caruaru (Brasil). En esa ocasión, 130 pacientes renales crónicos, luego de ser sometidos a sesiones de hemodiálisis, presentaron un cuadro clínico compatible con una grave hepatotoxicosis. Del total, aproximadamente 60 pacientes fallecieron antes de los 10 meses posteriores al inicio de los síntomas. Los análisis confirmaron la presencia de microcistinas y cylindrospermopsina en el carbón activado utilizado en el sistema de purificación del agua de la clínica y de microcistinas en muestras de sangre e hígado de los pacientes intoxicados (Carmichael, 1996; Jochimsen *et al.*, 1998; Falconer, 1998; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999; Azevedo, com. pers.). Asimismo, las observaciones microscópicas de muestras de agua del embalse que proveía de agua a la clínica así como al resto de la ciudad, indicaban una significativa dominancia de Cianobacteria toxígenas.

En Argentina, el primer evento cianotóxico se remonta a 1944 en la laguna Betti (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 Cyanobacteria 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). Efectuados ensayos de toxicidad aguda, sobre el contenido ruminal y estomacal de las vacas, 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 Cyanobacteria 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 Cyanobacteria y evaluar los posibles planes de manejo de situaciones de riesgo. Dentro de

esta recopilación, se incluyeron los antecedentes de la 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 Cyanobacteria toxígenas, son frecuentes en diferentes cuerpos de agua continentales de casi todo nuestro país (mapa, Tabla).

La información general se encuentra disponible en la página de internet: www.cyanonet.org.

Más recientemente, en nuestro país se han ampliado, tanto la lista de taxa nocivos, como de 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 en el agua de red domiciliaria.

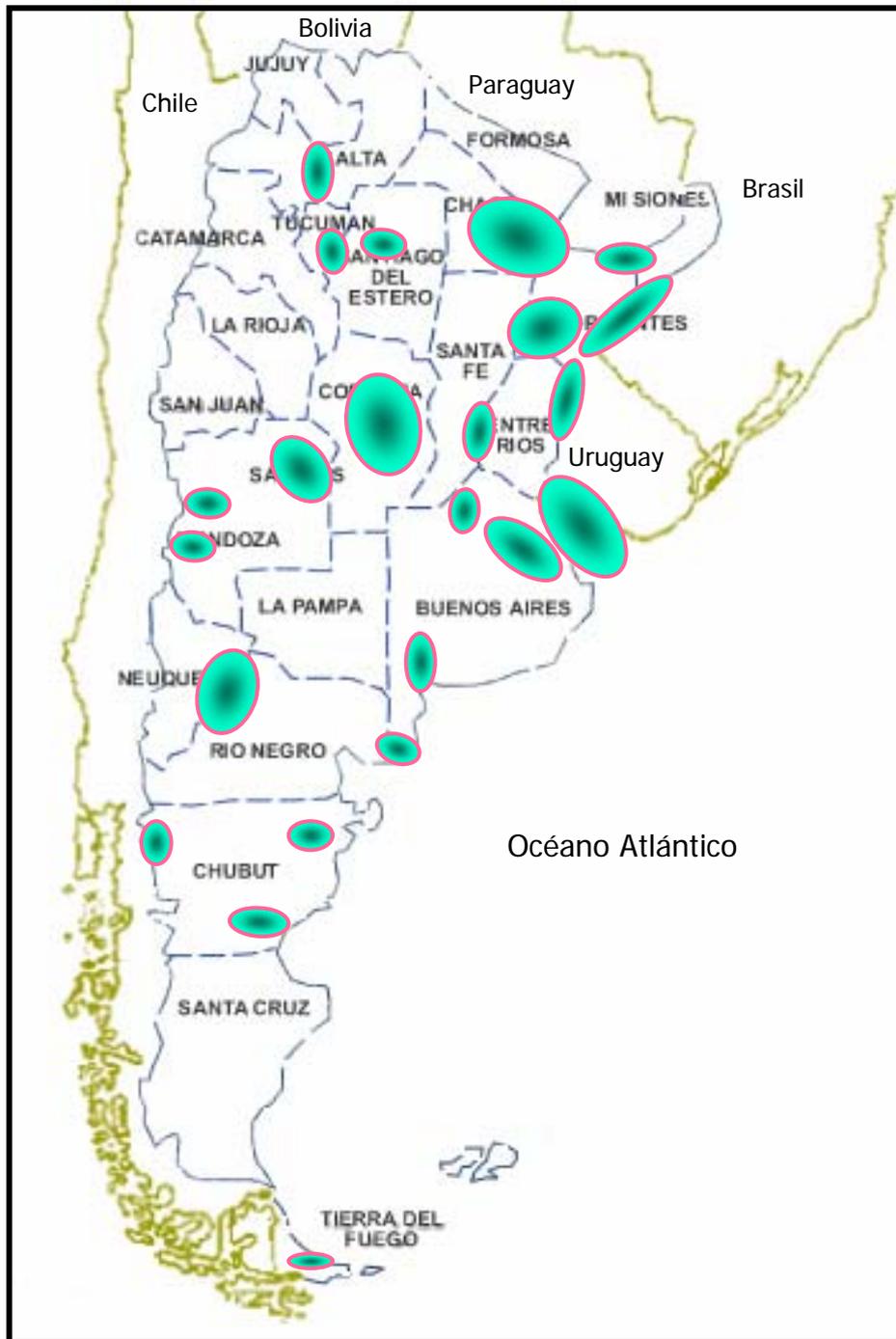
Como consecuencia de los estudios llevados a cabo en esta temática se destaca el desarrollo de reuniones de discusión entre distintos actores de la sociedad. La primera de ellas fue la llevada a cabo en el Museo de La Plata en 2004, organizada por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y FREPLATA. En esta oportunidad, la reunión estuvo centrada en analizar la problemática generada por la presencia de floraciones tóxicas de *Microcystis aeruginosa* en el Río de la Plata. Poco tiempo después, en el mismo año, se realizó una nueva reunión en la Cámara de Diputados de la Nación. En esta ocasión, la discusión sobre los problemas provocados por la acción de las cianobacterias fue a nivel nacional y participaron investigadores, miembros de Gendarmería Nacional y políticos, prácticamente, de todo el país.

Por otra parte, se han desarrollado conferencias y mesas redondas en distintas reuniones científicas en las que se abordó la problemática de las Cyanobacteria toxígenas como tema central.

Si bien es cierto que a nivel nacional e internacional distintos especialistas están llevando a cabo investigaciones científicas relacionadas con los diversos aspectos nocivos de las Cyanobacteria, este tema de considerable importancia sanitaria y económica, no ha sido igualmente considerado por la mayoría de las autoridades responsables de asegurar la calidad del agua de consumo domiciliario. Esta situación que resulta un potencial riesgo para la población, sería deseable sea considerado como tema prioritario en un futuro no muy lejano.

Bibliografía

- CARMICHAEL, W.W. & I.R. FALCONER. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In Falconer I.R. (Ed.) *Algal toxins in seafood and drinking water*: 187-209. Academic Press.
- 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.
- CHORUS, I. & J. BARTRAM. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN Spon London. 416 pp.
- ECHENIQUE R.; L. GIANNUZZI; L. FERRARI & D. GONZÁLEZ. 2003. Estudio sobre la calidad del agua de red de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. *Anales 13º Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente* 30: 1-18.
- ECHENIQUE, R; L GIANNUZZI & L FERRARI. 2006. Drinking water: Problems related to water supply in Bahía Blanca, Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 14 (2): 2-9.
- FALCONER, I.R. 1998. Algal toxins and human health. In J. HRUBEC (ed.) *The handbook of Environmental Chemistry*. Vol.5. Part C. Quality and Treatment of Drinking Water II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 53-82.
- FALCONER, I.R.; J. BARTRAM; I. CHORUS; T. KUIPER-GOODMAN; H. UTKILEN; M. BURCH & G. CODD. 1999. Safe levels and safe practices. In CHORUS, I. & J. BARTRAM (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN Spon London: 155-178.
- FRANCIS, G. 1978. Poisonous Australian Lake. *Nature* 444 (18): 11-12.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL W.W.; A.N.J. CARDO D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES C.E.M.; ANTUNES B.C.; MELO FILHO D.A., LYRA T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO S.M.F.O. & JARVIS W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystin at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 338: 873-878.
- KUIPER-GOODMAN, T., I.R. FALCONER & J. FITZGERALD. 1999. Human health aspects. In CHORUS, I. & J. BARTRAM (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN Spon London: 113-153.
- MULLOR, J.B. 1945. Algas tóxicas. Su estudio. *Revista del Colegio de Doctores en Bioquímica y Farmacia*. Año 1 – nº2 Rosario.
- ODRIOZOLA, E., BALLABENE, N. Y SALAMANCO A., 1984. Intoxicación en ganado bovino por algas verde-azuladas. *Revista Argentina de Microbiología* 16: 219-224.
- RINGUELET R.A. OLIVIER S. R. GUARRERA S. A. & ARAMBURU R. H. 1955. Observaciones sobre antoplankton y mortandad de peces en la Laguna del Monte (Buenos Aires, República Argentina). *Notas Mus. La Plata* 18 (Zool. 159), 71-80.
- SILVA J.H., LUCO J. M., GONZÁLEZ D. M. & BAUDINO O. M. 1995. Detección de compuestos biogénicos-volátiles en un lago eutrófico de San Luis-Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 3, 38-42.



Mapa: Principales áreas estudiados con registro de floraciones de cianobacterias nocivas en la República Argentina

Tabla: Presencia de Cyanobacteria nocivas en la República Argentina. Información enviada a CYANONET (2004).
*Referencias bibliográficas relacionadas con la tabla.

Provincia	Cuerpo de agua	Ocurriencia de cianotoxinas	Incidentes reportados de efectos adversos en la salud	Impactos adversos en: abastecimiento de agua, uso del cuerpo de agua, estatus ecológico	Acciones de manejo para reducir los efectos adversos	Entrenamiento educativo disponible y material de concientización, practicas necesarias	Referencias *
Buenos Aires	Estuario Río de la Plata (<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i> , <i>M. flos-aquae</i> .)	Microcystinas (biensayo ratón , ELISA) Microcystinas LR y YR (HPLC)	»Mortandad de peces »Irritaciones en piel en guardavidas »Desordenes digestivos y hepáticos en personas que tuvieron contacto con el agua.	»Olores desagradables »Reducción de act turísticas en playas de Ensenada »Reducción de los ingresos económicos por reducción de turismo	»Monitoreo quincenal de la fuente. Nivel de alerta temprana (2000 cel/ml) en dos plantas de tratamiento. »Comunicación a las Plantas de Tratamiento de Agua y dueños de sitios de uso recreativo. »Prohibición de pesca y actividades de playa.	Posters informativos distribuidos por la Prefectura Naval Argentina y Secretaría de Política Ambiental	1,2,3,4,5,7,8,9,10,11,12,13,14,17,6
	Arroyo San Miguel y canal próximo a la planta de tratamiento de residuos cloacales (Pila)				»Prohibición de acceso a las áreas afectadas por presencia masiva de cianobacterias		15,16
	Cava Mídula (ciudad de Quilmes)		»Hospitalización de un niño por desordenes respiratorios y una persona mayor sufrió fuertes dolores de cabeza y vómitos				17
	Embalse Paso de las Piedras (<i>M. aeruginosa</i> & <i>A. circinalis</i>)	Microcystinas (ELISA)		»Olores desagradables	»Monitoreo mensual de fitoplancton del agua cruda", con incremento de la frecuencia durante las floraciones de cianobacterias. Niveles de Alerta Tempranos (2000 cel/ml) en las plantas de tratamiento de agua. Durante floraciones de <i>A. circinalis</i> y <i>M. aeruginosa</i> , se dosificó carbón activado en polvo en el acueducto que lleva el agua cruda a la Planta Potabilizadora.		22,23,24,25,26,27,28,72,73,74,75
	Ríos, arroyos y lagunas		trastornos en peces y caballos				19,20,21
Córdoba	Embalse San Roque (<i>Microcystis sp.</i> y <i>Anabaena sp.</i>)	MC-RR, -YR, -LR (HPLC & LC-MS)	»Irritaciones dérmicas en personas por uso domésticos de agua del lago.	»Olores desagradables en agua potable. »Trastornos por reducción de ingresos por disminución del turismo hacia la región. »Hipolimnio anóxico	»Planta piloto con tratamiento con carbón activado y ozono »Propuesta de aireación del lago »Folletería educativa dirigida a profesores de escuelas secundarias y profesores de niveles terciarios .		22,30,31,32,33,34,35,36,37
	Embalse Río Tercero		Mortandad de peces				38,39
	Embalse Piedras Moras						40,41
	Embalse La Quebrada (<i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>A. spiroides</i> y <i>M. aeruginosa</i>)						42,43
San Luis	Embalse Cruz de Piedra	No detectable por ensayo ratón HPLC & HPTLC		Olores desagradables			44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,
	Embalse San Felipe						
	Embalse Lujan						
	Embalse La Huertita						
	Embalse La Florida				Olores desagradables		
Embalse Potrero de los Funes							
Neuquén y Río Negro	Embalse Ramos Mexia	Hepatotoxinas y neurotoxinas por bioensayo raton.		Olores desagradables	Monitoreo de Cyanobacteria durante la primavera y otoño con Alerta y Sistema de comunicación. Reporte semanal a plantas de tratamiento de agua		57,58
	Embalse Arroyito						
	Embalse Mari Menuco				Comunicación a plantas de tratamiento de agua.		
	Río Negro (Viedma)						

Provincia	Cuerpo de agua	Ocurriencia de cyanotoxinas	Incidentes reportados de efectos adversos en la salud	Impactos adversos en: abastecimiento de agua, uso del cuerpo de agua, estatus ecológico	Acciones de manejo para reducir los efectos adversos	Entrenamiento educativo disponible y material de concientización, practicas necesarias	Referencias *	
Provincia	Cuerpo de agua	Ocurriencia de cyanotoxinas	Incidentes reportados de efectos adversos en la salud	Impactos adversos en: abastecimiento de agua, uso del cuerpo de agua, estatus ecológico	Acciones de manejo para reducir los efectos adversos	Entrenamiento educativo disponible y material de concientización, practicas necesarias	Referencias *	
Chubut	Laguna Zeta (sitio recreacional)	Cinco tipos de microcystinas MC-RR, -YR,-LR & dos no identificadas (LC-MS)		Muerte de perro	Programa informal de identificación de ambientes con problemas con Cyanobacteria	Es necesario: material educativo, entrenamiento y folletería informativa	59, 60	
	Laguna Willimanco (fuente de agua potable)				Prohibición como fuente de agua potable.			61
	Lago Rivadavia							
	Embalse Florentino Ameghino y cuenca baja del Río Chubut				Monitoreo semanal en tres plantas de tratamiento. Monitoreo quincenal del agua cruda proveniente del embalse Charlas técnicas destinadas a técnicos de cooperativas de potabilización.			62,63,64,65
Entre Ríos	Río Uruguay			»Mortandad de peces »Irritación dérmica y desórdenes respiratorios				
	Río Paraná (M. aeruginosa) Río Uruguay, Embalse Salto Grande	Microcystinas (ELISA)			Apoyo de la empresa hidroeléctrica para la construcción de plantas de tratamiento de residuos cloacales en dos ciudades aguas arriba del lago.			
Misiones-Corrientes	Embalse El Tunal (A. spiroides)							
Salta	Embalse Santa Sylvina- (fuente de agua potable)							
	Embalse Villa Berthet (fuente de agua potable)							
	Embalse Hemoso Campo (fuente de agua potable)							
	Río Paranacito (sitio recreativo)							
	Río Bermejito (sitio recreativo)							
	Arroyo El Malhá (fuente de agua potable)							
	Laguna La Verde (fuente de agua potable)							
	Laguna El Moncholo (sitio recreativo y fuente de agua)							
Chaco	Laguna Colussi (recreativo)	Microcystina LR & RR (HPLC)		Mal olor y sabor		Programas provinciales para el seguimiento y el Control de Algas Nocivas (2004-2005) Charlas técnicas dirigidas a APC Es necesario: estándares analíticos Artículos en diarios	66,67,68,69,70	
	LagunaEl Yacaré							
	Laguna El Totoral							
Mendoza	Lago Pque Gral Belgrano (M. aeruginosa)						71	
Santa Fe	Río Paraná (M. aeruginosa) Embalse Yacyretá			Muerte de animales			68, 69, 77	

- 1.- ZACCARO, M.C.; OUAHID, Y.; ZULPA, G.; STORNI, M.M.; STELLA, A.M.; BOSSIO, J.C. TANUZ, M. & FERNÁNDEZ DEL CAMPO F. 2003. (Enviado para su publicación a una revista internacional) Toxicity of a *Microcystis* bloom from Río de la Plata, Argentina. Actas del 5º Congreso Ibérico y 2º Iberoamericano de Contaminación y Toxicología Ambiental, Sociedad Iberoamericana de Toxicología y Contaminación Ambiental. Porto, Portugal. 22-24 de septiembre de 2003.
- 2.- ZULPA, G.; ZACCARO, M.C. & STORNI, M. 2001. Recomiendan evitar el agua de los diques. Prefectura Naval Argentina y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales: La Nación, Información General.
- 3.- ZACCARO, M.C.; ZULPA, G. & STORNI, M. 2001. Informe para Prefectura Naval Argentina sobre la toxicidad de la floración de *Microcystis* sp. en Puerto Madero. Bioensayo de toxicidad. Exped. N° 471912, FCEN, UBA.
- 4.- 2003. El problema de las floraciones algales o manchas verdes http://www.laguarderia.com.ar/ecologia_cianobacterias.htm.
- 5.- Estudio de la concentración de toxinas algales (microcystinas) en el Río de la Plata. 2004. Informe INA-CIRSA para la Secretaría de Política Ambiental de la Pcia de Buenos Aires.
- 6.- ECHENIQUE, R. & BLETA, S. 2002. Análisis de muestras de fitoplancton del Río de la Plata, en el área de influencia de las ciudades de La Plata, Berisso y Ensenada. Informe presentado a la Dirección de Ecología y Recursos Naturales; Secretaría de Política Ambiental de la Prov. de Buenos Aires.
- 7.- ECHENIQUE, R. & BLETA, S. 2002/2004. Evaluación de contaminación con algas en sistema de agua potable. Informe presentado a Refinería de La Plata de REPSOL-YPF (Ensenada).
- 8.- ECHENIQUE, R. & BLETA, S. 2004. Análisis de tres muestras de fitoplancton del Río de la Plata, en relación a una floración de *Cyanobacteria* potencialmente toxigénicas. Informe presentado a la Dirección Provincial de Control Ambiental; Subsecretaría de Política Ambiental de la Prov. de Buenos Aires.
- 9.- ECHENIQUE, R. 2004. Análisis de muestras de agua de consumo, en relación a una floración de *Cyanobacteria* potencialmente toxigénicas en el Río de la Plata. Informe presentado a la Dirección Provincial de Control Ambiental; Subsecretaría de Política Ambiental de la Prov. de Buenos Aires.
- 10.- GÓMEZ N. & BAUER, D. 1998. Phytoplankton from the Southern Coastal Fringe of the Río de la Plata (Buenos Aires) Argentina. *Hydrobiologia* 380:1-8.
- 11.- CANO, M.G. & ECHENIQUE, R.O. 2001. Cyanophyta de interés toxicológico en cuerpos de agua urbanos de La Plata y Berisso. En Libro de Resúmenes de las XXVIII Jornadas Argentinas de Botánica, Santa Rosa (La Pampa), 21 al 25 de octubre.
- 12.- GÓMEZ, N. & BAUER D. 2000. Diversidad fitoplanctónica en la Franja Costera Sur del Río de la Plata. *Biología Acuática* 19:7-26.
- 13.- GÓMEZ, N., BAUER, D.E., LICURSI, M. & HUALDE, P.R. 2002. Planktonic and periphytic coastal algae of the Río de la Plata, Argentina. *Verh. Internat. Verein. Limnol* 28:250-253.
- 14.- ANDRINOLO, D., PEREIRA, P., GIANNUZZI, L., AURA, C., MASSERA, S., LAGOS, N., GARCÍA, C., ZARITZKY, N. & ECHENIQUE, R. 2004. *Microcystis aeruginosa* and microcystins in the Río de la Plata (Argentina). Trabajo enviado a Harmful Algae
- 15.- COLAUTTI, D., REMES LENICOV, M., GÓMEZ, N. & CLAPS, C. 1998. Mortandad de peces en el arroyo San Miguel (Partido de Pila, Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Gayana Serie Zoológica*. 62(2):191-197.
- 16.- ECHENIQUE, R., ANDRINOLO, D. & GIANNUZZI, L. 2004. Análisis de muestras de fitoplancton y evaluación de la toxicidad de una floración de *Cyanobacteria* en la localidad de Pi-

la, Provincia de Buenos Aires. Informe presentado a la Municipalidad de la Ciudad de Pila (Bs. As.).

17.- ECHENIQUE, R. & CANO, M.G. 1998. Evaluación de presencia de Cyanobacteria toxigénicas en la Cava Midula, Quilmes (Provincia de Buenos Aires). Informe presentado a la Dirección de Fiscalización y Saneamiento Urbano, de la Secretaría de Política Ambiental de la Prov. de Buenos Aires.

18.- ECHENIQUE, R. & BLETA, S. (2004) Análisis de muestras de fitoplancton de la laguna Los Patos (Ensenada, Prov. Buenos Aires), en relación a una floración de Cyanobacteria potencialmente toxigénicas. Informe presentado a la Dirección Provincial de Control Ambiental; Subsecretaría de Política Ambiental de la Prov. de Buenos Aires.

19.- ECHENIQUE, R. 1998. Evaluación de presencia de Cyanobacteria toxigénicas en materiales provenientes de la localidad de San Isidro, Provincia de Buenos Aires. Informe presentado al Departamento de Uso y Administración de Recursos Naturales, de la Secretaría de Política Ambiental de la Prov. de Buenos Aires.

20.- ECHENIQUE, R. 1998. Evaluación de presencia de Cyanobacteria toxigenicas en la laguna de San Miguel de Monte, Provincia de Buenos Aires. Informe presentado a la Estación Hidrobiológica de Chascomús (Ministerio de Asuntos Agrarios de la Prov. de Buenos Aires).

21.- ECHENIQUE, R. 2004. Análisis de la taxocenosis fitoplanctónica en el Río Salado, Provincia de Buenos Aires, en relación con una mortandad masiva de peces. Informe presentado a la Dirección de Ecología y Recursos Naturales; Subsecretaría de Política Ambiental de la Prov. de Buenos Aires.

22.- RUIBAL CONTI, A.L. 2003. Seasonal Variation of microcystins in Argentina Inland Waters. Master of Science Thesis. Kyoto University. Japan.

23.- ECHENIQUE R.; GIANNUZZI, L.; FERRARI, L. & GONZÁLEZ, D. 2003. Estudios sobre la calidad del agua de red en Bahía Blanca, Argentina. Anales del 13° Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente, Buenos Aires, Argentina, Trabajo N° 30: 1-18.

24.- ECHENIQUE R.O.; FERRARI, L.A.; MASTRANTONIO, G.; GIANNUZZI, L.; GONZÁLEZ, D.; BOCH, A.; NARDO, C.; COLANGELO, C.; ARADO, M. & NIETO, R. 2001. Cyanobacteria y compuestos de relevancia toxicológica en aguas de consumo en Bahía Blanca, Argentina. En Libro de Resúmenes del 1° Seminario Latino Americano sobre Cianobacterias Tóxicas, Rio de Janeiro (Brasil), 5 al 7 de noviembre.

25.- FERRARI L.A.; ECHENIQUE, R.O.; MASTRANTONIO, G.; GIANNUZZI, L.; BOCH, A.; NARDO, C.; COLANGELO, C.; ARADO, M. & NIETO, R. 2000. Identificación de cianofitas y compuestos de relevancia toxicológica en aguas de consumo en Bahía Blanca. En libro de Resúmenes de las XX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, Buenos Aires, 18 al 20 de septiembre.

26.- ECHENIQUE, R.O.; FERRARI, L. & GONZÁLEZ, D. 2001. Cyanobacterial blooms in Paso de las Piedras reservoir (Buenos Aires, Argentina). Harmful Algae News (UNESCO) 22: 3.

27.- ECHENIQUE, R.O. & GIANNUZZI, L. 2000. Evaluación de presencia de Cyanobacteria toxigénicas en el embalse Paso de las Piedras, plantas potabilizadoras Patagonia y Grünbein y en agua de red de la ciudad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires). Informe presentado al Laboratorio de Toxicología y Química Legal (Dirección General de Asesoría Pericial de la Suprema Corte de Justicia), de la Provincia de Buenos Aires.

28.- ECHENIQUE R., GIANNUZZI, L. & FERRARI, L. 2006. Drinking water: problems related to water supply in Bahía Blanca, Argentina. Acta Toxicológica Argentina. 14(2): 2-9.

29.- PROSPERI, C. 2000. Las algas microscópicas y su efecto sobre el ambiente. - Funam online: (www.funam.org.ar)

30.- RUIBAL, A; YAMASHITA, N; TOMONARI, M; MATSUI, S; GRANERO, M; YAMASHIKI, Y; D'ANGELO, R; PROSPERI, C. 2001. Phytoplankton variation and toxic Cyanobacterial blooms in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). Conservation and Management of Lakes 3(1): 59-62.

- 31.- AMÉ, M.V.; DÍAZ, M.P. & WUNDERLIN, D.A. 2003. Occurrence Of Toxic Cyanobacterial Blooms In San Roque Dam (Córdoba – Argentina): A Field And Chemometric Study. *Environ. Toxicol.* 18(3): 192-201.
- 32.- AMÉ, M.V.; WUNDERLIN, D. & PFLUGMACHER, S. 2000. Aislamiento e Identificación de Toxinas de Cianobacterias en el Lago San Roque (Pcia. de Córdoba). En libro de Resúmenes del XXIII Congreso Argentino de Química – AQA, Corrientes – Setiembre.
- 33.- AMÉ, M.V., PFLUGMACHER, S. & WUNDERLIN, D.A. 2002. Presencia de Microcistina y otros metabolitos secundarios de cianobacterias en el Lago San Roque (Córdoba – Argentina). En libro de Resúmenes del XIX Congreso Nacional del Agua. Carlos Paz (Córdoba), Agosto.
- 34.- AMÉ M.V. & WUNDERLIN D.A. 2003. Effect of Ammonium, Iron and Temperature on the Production of Microcystins by *Microcystis aeruginosa*. A Laboratory Study. En libro de Resúmenes del VI Congreso Internacional SETAC, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Buenos Aires, Octubre
- 35.- WIEGAND, C., CAZENAVE, J. & WUNDERLIN, D.A. 2004. Benefits and cost of microcystins detoxication. En libro de Resúmenes del VI International Conference on Toxic Cyanobacteria. Bergen – Noruega, 21-27 Junio.
- 36.- PFLUGMACHER S., WIEGAND C., BALLOT, KRIENITZ, METCALF, MORRISON, CODD J., KRAUSE, KOTUT, CAZENAVE J., WUNDERLIN D.A., WOLFSTEIN. 2004. Detection of cyanobacterial toxins in the brain of birds and fish. En libro de Resúmenes del VI International Conference on Toxic Cyanobacteria. Bergen – Noruega, 21-27 Junio.
- 37.- AMÉ, M.V. 2003. Microcistinas en el Embalse San Roque (Córdoba) – Presencia, ecotoxicidad, regulación y biodegradación. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas- Universidad Nacional de Córdoba.
- 38.- GÓMEZ, N. 1995. Changes in the phytoplankton of Embalse Río Tercero reservoir (Prov. Córdoba, Argentina) as result of the influence of the nuclear power plant operating there. *Acta Hydrobiologica* 36 (3): 129-139.
- 39.- DIARIO LA VOZ DEL INTERIOR. 1999. Mueren peces en el lago del Embalse. 31 de Mayo.
- 40.- RODRIGUEZ, C. & PROSPERI, C. 2004. Water quality variations in Piedras Moras Dam (Córdoba, Argentina). Aceptado en *Biocell*.
- 41.- RODRIGUEZ, C; PROSPERI, C. 2001. Seasonal variations on the water quality of Lake Piedras Moras (Córdoba, Argentina). *Conservation and Management of Lakes* 3(1): 534-537.
- 42.- PIEROTTO, M.; RINCÓN, A.; GONELLA, M.; DAGA, C. & PROSPERI, C. *Hidrobiología del Embalse La Quebrada. Saneamiento y Medio Ambiente*. Buenos Aires. 2003.
- 43.- CIOCCALE, M.A., FERRI, M., FILARDO J.J., INGARAMO, R., LADO, G., MONTIVERO, N. & MOREO, R. 1998. Estudio integral de la problemática del agua en la cuenca del Río Ceballos. Córdoba Argentina. En libro de Resúmenes del XVII Congreso nacional del Agua. II Simposio de Recursos Hídricos del Conosur. Santa Fe Argentina 3-7 de Agosto
- 44.- GONZÁLEZ D. 2000. Estudio de cianobacterias con efectos nocivos (deletéreos y tóxicos) en ambientes acuáticos de la provincia de San Luis. Doctoral Thesis. Resolución N° 1103-00 del 14 de Diciembre
- 45.- SILVA, H.J., LUCO, J.M., GONZÁLEZ, D.M. & BAUDINO O.M. 1995. Detección de Compuestos Biogénicos Volátiles en un Lago Eutrófico de San Luis. Argentina. *Acta Toxicológica Argentina*, 3(2): 38-42.
- 46.- GONZÁLEZ, D.M.; ECHENIQUE, R.O.; SILVA, H.J. 1999. Estudio del fitoplancton de tres embalses próximos a la ciudad de San Luis, Argentina. Aislamiento de cepas de interés toxicológico. *Bioquímica y Patología Clínica*, 63(1): 36-42.

- 47.- GONZÁLEZ, D.M., ECHENIQUE, R.O. & SILVA H.J. 2002. Cyanophyta o algas verdeazuladas: Toxicidad y producción de metabolitos volátiles. Acta Toxicológica Argentina. 9(2): 68-81
- 48.- GONZÁLEZ D., ECHENIQUE, R., AGUILAR, E. & SILVA, H. 1996. Perfil fitoplanctónico de ambientes acuáticos de San Luis. En libro de Resúmenes de la XIV Reunión Científica Anual de la Soc. de Biología de Cuyo. Potrerillos, Mendoza, 13 y 14 de diciembre.
- 49.- GONZÁLEZ DE CID, D., ECHENIQUE, R. & SILVA, H. 1997. Relevamiento fitoplanctónico de los embalses próximos a la ciudad de San Luis, con especial referencia a las Cyanophyta potenciales productoras de toxinas. En libro de Resúmenes de las Jornadas de Comunicaciones Científicas, La Plata, 25 al 29 de agosto.
- 50.- GONZÁLEZ D., AGUILAR, E., SILVA, H. & ECHENIQUE R. 1997. Utilización de la microalga *Dunaliella* en la evaluación de toxicidad de *Microcystis*. En libro de Resúmenes de las XVII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, Buenos Aires, 11 y 12 de septiembre.
- 51.- ECHENIQUE R., GONZÁLEZ DE CID, D. & SILVA, H. 1997. Estudio fitoplanctónico en reservorios de agua de la Provincia de San Luis. Aislamiento de cepas de Cianofíceas de interés toxicológico. En libro de Resúmenes del II Congreso Argentino de Limnología, I Reunión de la Asociación Argentina de Ficología, I Reunión Argentina sobre Sistemas Costeras Mixohalinos, Buenos Aires, 18 al 24 de septiembre.
- 52.- GONZÁLEZ D.M.; AGUILAR E.G.; ECHENIQUE, R. & SILVA, H. 1998. Toxicidad en *Nostoc aff. minutum* (Cyanophyta) Utilizando *Dunaliella* sp. (Chlorophyta) como bioindicador. En libro de Resúmenes de las XVIII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología. Buenos Aires, 25 de septiembre.
- 53.- GONZÁLEZ D.M.; SILVA, P.G.; AGUILAR, E.G.; ECHENIQUE, R. & SILVA, H. 1998. Toxinas y metabolitos volátiles producidos por algas Cyanophyta en lagos eutróficos de San Luis, Argentina. En libro de Resúmenes de la Primera Reunión de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Buenos Aires, 28 - 30 de octubre.
- 54.- ECHENIQUE R., GONZÁLEZ DE CID, D. & SILVA, H. 1998. Cyanophyta de interés toxicológico en embalses de San Luis. En libro de Resúmenes de las XXVI Jornadas Argentinas de Botánica, Río Cuarto, 22 - 27 de noviembre.
- 55.- GONZÁLEZ, D.M., AGUILAR, E.G., MOHAMED, F., ECHENIQUE, R.O., SILVA, P.G. & SILVA, H.J. 1999. Estudio morfológico de los efectos de *Nostoc aff. minutum* (Cyanophyta) en hígado de rata. En libro de Resúmenes del III Congreso de las Sociedades de Ciencias Morfológicas de La Plata y I Congreso Internacional. La Plata, 23-25 de junio.
- 56.- GONZÁLEZ, D.M., AGUILAR, E.G., MOHAMED, F., ECHENIQUE, R.O., SILVA, P.G. & SILVA, H.J. 1999. Observaciones preliminares sobre hepatotoxicidad de *Nostoc aff. minutum* (Cyanophyta) en animales de experimentación. En libro de Resúmenes del XI Congreso Argentino de Toxicología, XIX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología. La Plata, 27 al 29 de septiembre.
- 57.- PIZZOLON, L. 1997. Inventario de ambientes dulceacuícolas de la Argentina con riesgo de envenenamiento por cianobacterias. Rev. de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, AIDIS, 33: 26-34.
- 58.- GUARRERA, S.A. & ECHENIQUE, R. 1995-2003. Monitoreo de las Cyanophyta potencialmente tóxicas, en el embalse E. R. Mexía. Informes presentados a la Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquen y Negro (AIC).
- 59.- PIZZOLON, L. 1996. Características e importancia de las cianobacterias como factor potencial de toxicidad en las aguas continentales. Interciencia, 21(6):239-245.
- 60.- PIZZOLON, L., TRACANNA, B., PRÓSPERI, C. & GUERRERO, J. 1999. Cyanobacterial blooms in argentinian freshwaters. Lakes & Reservoirs, Research & Management, 4: 101-105.
- 61.- PIZZOLON, L., OTAÑO, S. & SANTINELLI, N. 1993. Limnología de la cuenca del río Futaleufú. II. Futaleufú Alto. PID 1290/89 CONICET. Informe Final.

62.- IVANISSEVICH, M.E.; OTAÑO, S.H.; AYESTARAN, M.G.; PANGARO, M.F.; REINOSO, R.; RIVERA, S.; SANTINELLI, N. & SASTRE, V. 1991. Fitoplancton y Factores Físico-químicos del Curso Inferior del Río Chubut. Notas Científicas de la II Reunión Argentina de Limnología. *Biología Acuática*, 15 (1): 100-101.

63.- SASTRE, V.; OTAÑO, S.; SANTINELLI, N.; PANGARO, M.; AYESTARAN, G. & IVANISSEVICH, M.E. 1994. Fitoplancton, nutrientes y manejo del embalse Florentino Ameghino y su influencia en el río Chubut. Notas del I Congreso y III Reunión Argentina de Limnología. *Tankay*, 1: 74-75.

64.- SASTRE, A.V.; OTAÑO, S.H.; SANTINELLI, N.H.; PANGARO, M.F.; AYESTARAN, M.G. & IVANISSEVICH, M.E. 1994. Fitoplancton, nutrientes, manejo del embalse Florentino Ameghino y su influencia en el río Chubut. In extenso. *Naturalia Patagónica. Ciencias Biológicas*. Vol.2, Nº 1-2: 59-69.

65.- SASTRE, V., SANTINELLI, N., OTAÑO, S. & IVANISSEVICH, M. 1997. Water quality of lower run of Chubut River, Patagonia, Argentina. *Verh. Internat. Verein. Limnol* 26: 951-955.

66.- OTAÑO, S. & PROSPERI, C. 2004. Variación estacional de las cianobacterias tóxicas en tres lagunas de la Provincia del Chaco. Aceptado en proyectos.uncor.net.

67.- MONITOREO DE CALIDAD DE AGUA DE LA CUENCA DEL RÍO BERMEJO. 2002. Informe para el Programa Estratégico de Acción para la cuenca Binacional del río Bermejo. Fondo para el Medio Ambiente Mundial. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.

68.- MONITOREO DE CALIDAD DE AGUA DEL RÍO PARANÁ Y MONITOREO DE CALIDAD DE AGUA DEL RÍO NEGRO. Informes 2001/actualidad. Laboratorio de Aguas. Administración Provincial del Agua.

69.- CALIDAD DE AGUA DE AMBIENTES LÉNTICOS Y LÓTICOS DE LAS PROVINCIAS DEL CHACO y CORRIENTES. 1999/actualidad. Informes para el Laboratorio de Aguas. Administración Provincial del Agua.

70.- PLAN DE MONITOREO AMBIENTAL DE LAGUNAS DEL A.M.G.R. 1999/2000. Informes Banco para el Mundial. Ministerio del Interior, Programa de Protección contra Inundaciones (PPI), Programa Ambiental de Protección y Manejo de Humedales, Sub Unidad Central de Coordinación para la Emergencia (SUCCE), Sub Unidad Provincial de Coordinación para la Emergencia (SUPCE Chaco).

71.- KIEFFER, L.A & GARCÍA DE EMILIANI, M.O. 1998. Eutrofización del Lago del Parque General Belgrano (Santa Fe). II Plancton y parámetros Químicos. En *Anales del XVII Congreso nacional del Agua. II Simposio de Recursos Hídricos del Conosur*. Santa Fe, Argentina, 3-7 de Agosto.

72.- GUERRERO, J.M.; INTARTAGLIA, C. & SALA, S.E. 1988. Experiencias de coagulación de localización previa a la planta Patagonia. Informe presentado a la Administración General de Obras Sanitarias de la Provincia de Buenos Aires.

73.- GUERRERO, J.M.; INTARTAGLIA, C. & SALA, S.E. 1989. Evaluación de la remoción de algas en plantas piloto de decantación dinámica y de flotación instaladas en el embalse Paso de las Piedras. Informe presentado a la Administración General de Obras Sanitarias de la Provincia de Buenos Aires.

74.- GUERRERO, J.M.; INTARTAGLIA, C. & SALA, S.E. 1990. Dinámica fitoplanctónica en el embalse Paso de las Piedras. Informe presentado a la Administración General de Obras Sanitarias de la Provincia de Buenos Aires.

75.- GUERRERO, J.M. & LOMBARDI, L.O. 1993. Evaluación de la remoción algal en filtro piloto de microtamices y filtros de arena en el embalse Paso de las Piedras. Informe presentado a la Administración General de Obras Sanitarias de la Provincia de Buenos Aires.

76.- GUERRERO, J.M. & BAGLIVI, J.C. 2004. Monitoreo de algas en la zona costera del Río de la Plata (Partidos de Berisso y Ensenada): período enero-junio de 2004. Informe presentado a la Autoridad del Agua de la Provincia de Buenos Aires.

77.- GARCIA DE EMILIANI, M.O. & EMILIANI, F. 1997. Mortandad de ganado y aves silvestres asociada con una floración de *Anabaena spiroides* Klebh. *Natura Neotropicali* 28(2): 150-157.

Capítulo 4: Efectos sobre la salud humana y animal. Mecanismos de acción tóxica

Darío Andrinolo
Mariela Caneo

4. 1. Introducción

Las cianobacterias, producen un amplio rango de metabolitos secundarios bioactivos, algunos de los cuales son tóxicos. Las toxinas de cianobacterias (cianotoxinas) son compuestos químicamente diversos que se agrupan según su modo de acción en Hepatotoxinas, Neurotoxinas y Dermatotoxinas. Dichos tóxicos incluyen a las microcistinas (MCs), cilindrospermopsinas, saxitoxinas, nodularinas y anatoxinas.

Varios géneros de cianobacterias poseen especies toxígenas y el número de informes de nuevas especies toxígenas así como de nuevas toxinas aumenta día a día en la literatura. Algunas especies pueden producir más de una toxina y es posible detectar en un mismo cuerpo de agua al mismo tiempo la presencia de más de una toxina.

En el hombre pueden causar desde ligeros malestares digestivos hasta muerte por asfixia y deshidratación. Algunas de estas toxinas, son promotoras de tumores o probables carcinogénicos y de hecho existe una fuerte correlación entre cáncer primario de hígado y la contaminación con cianobacterias de las fuentes de agua dulce que utiliza la población (1). Por ello, es necesario revisar los riegos para la salud pública que implica la presencia de cianotoxinas en los distintos ambientes acuáticos, incluso el agua de red domiciliaria.

4. 2. Principales rutas de exposición a cianobacterias y sus toxinas

- 1- Contacto directo con las partes expuestas del cuerpo, incluyendo partes sensibles como oídos, ojos, mucosas etc.
- 2- Ingesta de agua
- 3- Inhalación de agua y aerosoles. En áreas recreaciones donde se practican deportes náuticos, durante el baño recreativo, agravado por el contacto directo con las células de cianobacterias.
- 4- Ingesta de alimentos contaminados como peces obtenidos de lagos y lagunas con presencia de cianobacterias y mas raramente vegetales regados con agua contaminadas, pastillas dietéticas a base de cianobacterias tales como *Aphanizomenon sp.* o *Spirulina sp.* contaminadas con cianotoxinas.

Es importante definir para cada caso el grado y la ruta de exposición, siendo claramente en todo el mundo, la ingesta de agua contaminada con cianotoxinas la más común de las formas de exposición.

4. 3. Niveles de Alerta propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Debido a la gran preponderancia a nivel mundial de las floraciones de cianobacterias y a que afecta un recurso vital como el agua, la Organización Mundial de la Salud (OMS), a desarrollado documentos como "Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management" donde se proponen, entre otras cosas, acciones tendientes al manejo de los Niveles de Alerta. Esto es una secuencia de acciones de monitoreo y manejo que se puede usar para proveer una respuesta adecuada a la aparición y progreso de una floración de cianobacterias. Las alternativas circunstanciales y operacionales, pueden variar dependiendo de la fuente de abastecimiento de agua y de las facilidades analíticas y de tratamiento de agua disponibles.

La OMS ha sugerido un límite de seguridad de 1 µg / litro de microcistina-LR en agua potable. Considerando que el consumo de agua con MC LR por debajo de este límite, aun por largos periodos no tendría consecuencia para la salud. Por otro lado, advierte que los datos son insuficientes para la derivación de niveles de seguridad para las demás toxinas cianobacterianas. No obstante esto, Brasil ha introducido en su legislación niveles guía para saxitoxina y cilindrospermopsina de 3 y 15 µg/l respectivamente.

Diversos métodos se han estudiado e implementado para evitar que las cianotoxinas lleguen al agua potable, esto se consigue en principio, evitando la lisis celular con una captación adecuada, una buena coagulación seguida de filtración y cloración. Aunque este tipo de tratamiento es claramente insuficiente cuando los florecimientos son intensos. Para estos casos se han desarrollado métodos basados en la utilización sola o combinada de carbón activado, ósmosis inversa, ozonización del agua e irradiación UV (Toxic cianobacteria in water). Además hay que tener en cuenta el tipo de toxina a eliminar ya que no todas poseen la misma estabilidad.

4. 4. Situación en Argentina

En Argentina están presentes la mayoría de las especies toxígenas descritas en el mundo y se han informado florecimientos de cianobacterias asociadas con muerte de peces en lagunas e intoxicaciones de animales domésticos a los que se suman las frecuentes observaciones de muerte de ganado, peces (por ejemplo la periódica muerte de sábalos en el Río de la Plata) posiblemente asociados a florecimientos de especies toxígenas informada por parte de veterinarios, productores e investigadores.

Sin embargo, hasta la fecha solo se ha descrito la presencia de microcistinas y saxitoxinas aunque se estima altamente probable que también estén presentes cilindrospermopsinas y anatoxinas.

Microcistinas (MCs)

Las microcistinas son hepatotoxinas con al menos 68 variantes, basadas en una estructura de heptapéptido cíclico. 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 (Fig. 1).

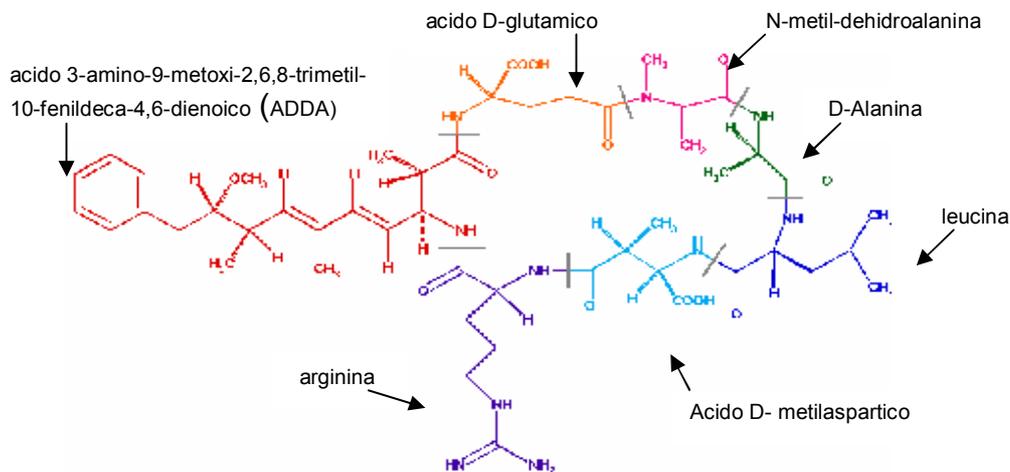


Fig.1: Molécula de microcistina-LR

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 *Planktothrix*. La producción de microcistinas, ha sido ligada también a algunas especies bénticas: *Haphalosiphon hibernicus* y *Oscillatoria limnosa*.

Intoxicaciones con Microcistinas

La dosis letal 50 descrita para microcistina-LR es de 50 µg/kg cuando se aplica por vía intraperitoneal (ip) y oscila entre 50 y 200 µg/kg para las otras variantes de microcistinas. Sin embargo, al tener una base peptídica, gran parte de las microcistinas ingeridas con el agua o alimento son degradadas e inactivadas en tracto gastrointestinal, de hecho DL50 oral es mas de 10 veces superior a la intraperitoneal.

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.

Análisis histológicos de hígados de ratones inyectados con dosis letales de microcistina-LR (100 µg/kg) revelan disrupción masiva de la arquitectura lobular y sinusoidal del hígado, dilatación de los vasos hepáticos, pérdida de hepatocitos y displasia (Fig 2).

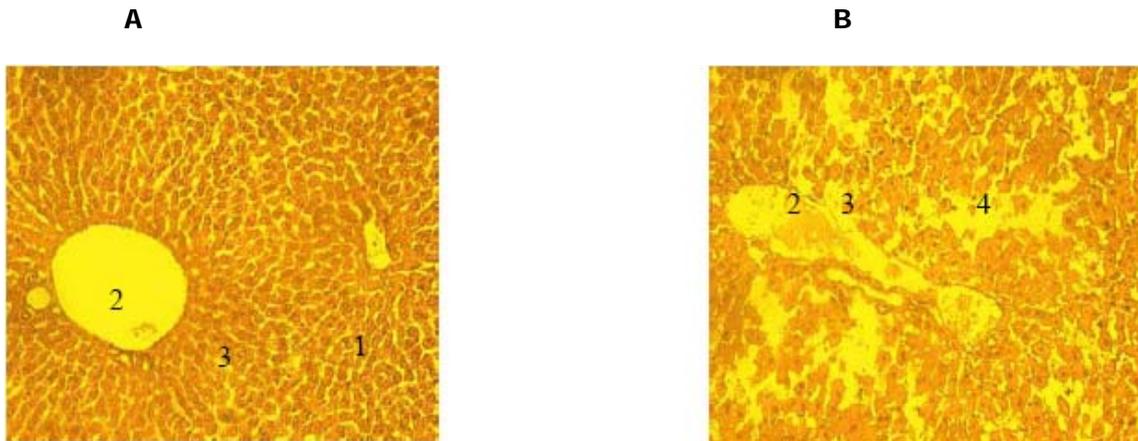


Fig. 2: Corte de hígado de ratón control (A) de un ratón inyectado con extracto acuoso de *Microcystis sp.* obtenida de un florecimiento natural de río de la Plata (B). 1- Vena hepática terminal 2- Tracto portal 3- Interface del parénquima en posición radiada. Nótese tracto portal con importante vasodilatación, disrupción de la interfase del parénquima y pérdida parénquima hepático.

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.

Farmacocinética

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 más 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 glutatión 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 pérdida del control de la fosforilación regulatoria y desarrollo de neoplasias.

Mecanismos de acción

Los mecanismos involucrados en la toxicidad de MCs no han sido aún completamente aclarados, si bien se sabe que las MCs son un potente inhibidor de serina y treonina fosfatasa (PP1A y PP2A) a las que se une irreversiblemente. Esto provoca una hiperfosforilación de ciertas proteínas, entre ellas, las citoqueratinas que cumplen su función biológica en la organización de los microfilamentos de actina. Asimismo, se ven afectados los procesos de control de la división y respiración celular.

Un aumento en la peroxidación de lípidos (LPO) se observó en cultivos celulares de hepatocitos, en microsomas hepáticos de ratas y en distintos órganos como hígado, riñón e intestino luego de la exposición de animales a MCs pura o por consumo de cianobacterias. En concordancia con estos resultados se observó una disminución en las enzimas involucradas en los sistemas antioxidantes celulares, sugiriendo que el daño oxidativo juega un papel significativo en la toxicidad de MCs en mamíferos.

Se ha postulado un efecto dual de MCs, ya que a concentraciones bajas, promueven la división celular en hepatocitos, efectos que pueden estar relacionados al aumento en el crecimiento de las lesiones precancerosas hepáticas y colónicas en modelos animales. La exposición a microcistinas, ha sido ligada a un aumento de la incidencia de cáncer de hígado y de colon. Mientras que a concentraciones altas, las MCs inducen apoptosis en distintos modelos celulares.

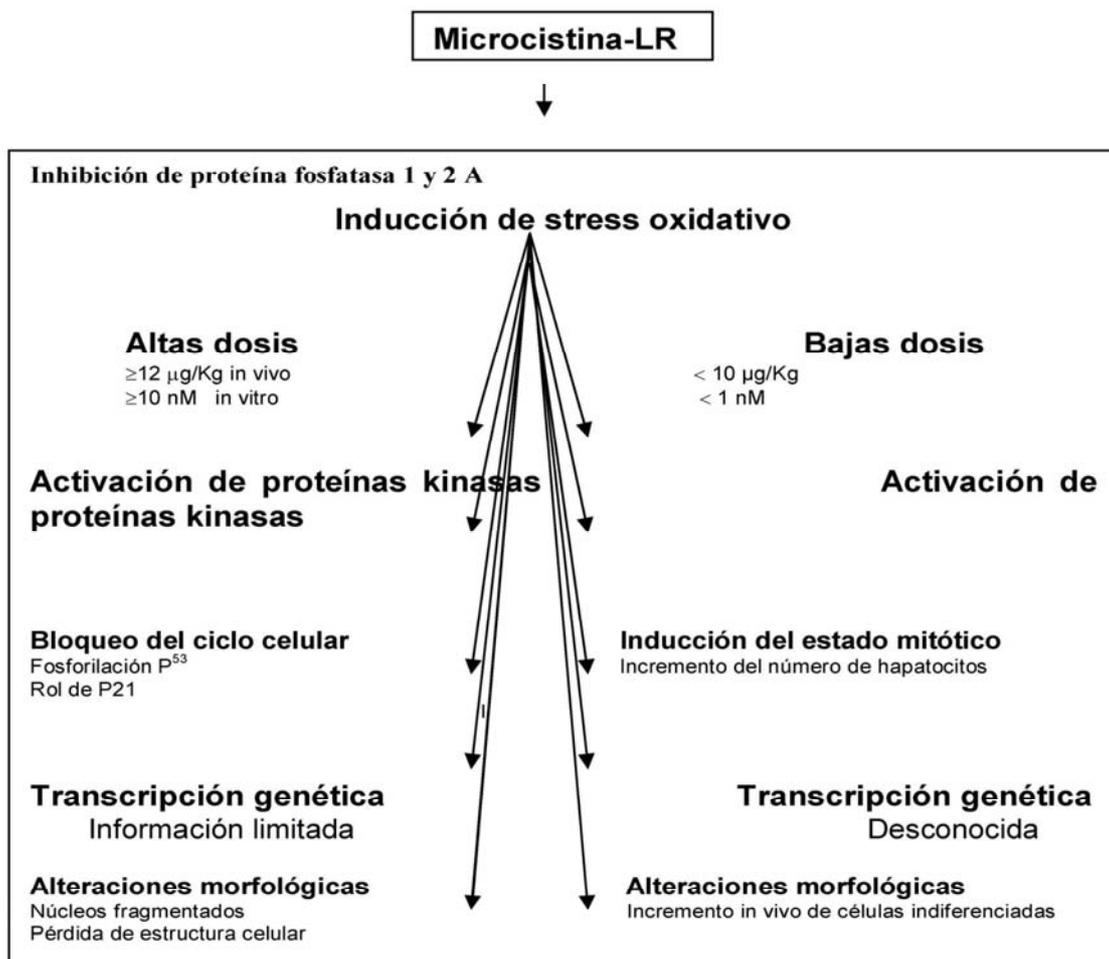


Fig. 3: Gráfico simplificado de las bases moleculares implicadas en la respuesta dual de células expuestas a MC-LR. Tomado de Gehring 2004

Valores guía y agua potable

En base a estudios con animales, se determinó el Nivel de Efectos Adversos No Observables (NOAEL según sus siglas en inglés) de 40 µg/kg. 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 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 que se redondea en el Valor Guía de 1 µg/L 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. 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.

Nodularinas

Las nodularinas son péptidos cíclicos hepatotóxicos de estructura similar a las microcistinas, excepto por que están compuestos por 5 aminoácidos en lugar de 7. Han sido descritas variantes debidas a la sustitución de arginina con homoarginina o valina, pero estas parecen ser relativamente raras. El ADDA también está presente, pero la dehidroalanina es reemplazada por N-metil-dehidrobutirina. El tamaño pequeño del anillo no permite la coordinación con un residuo de cisteína de la proteína fosfatasa, y por ello las nodularinas no se unen covalentemente a esta. De todos modos, debido a la alta afinidad del ADDA por el sitio activo, esta pérdida de la unión covalente, no afecta la potencia de esta toxina, la cual es similar a la de la MC-LR. Esta pérdida de la unión covalente puede permitir a las nodularinas, alcanzar otros sitios celulares, y esto ha sido sugerido como un mecanismo por el cual dicha toxina puede actuar como carcinogénico directo.

Cilindrospermopsinas (CYNs)

Las cilindrospermopsinas (CYNs), son alcaloides formados por una guanidina tricíclica unida vía una unión carbono hidroxilada (C7) a uracilo, con algunas variantes estructurales (fig.4). La porción uracilo, se requiere para que haya toxicidad. Es un compuesto altamente soluble en agua. La información sobre las propiedades químicas es escasa, pero se conoce su alta estabilidad frente a condiciones extremas (resiste por 15 min a 100 °C y se degrada un 25% en 8 semanas a un pH de 4, 7 y 10). La CYNs no se producen comercialmente y no se conoce un uso de estos compuestos.

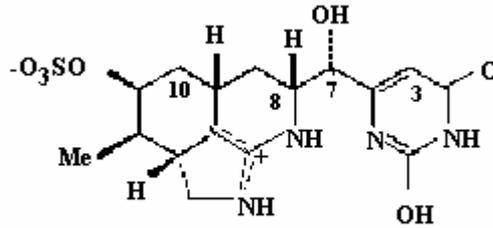


Fig.4: Estructura molecular de las cilindrospermopsinas

Las CYNs son producidas por *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena bergii*, *Umezakia natans*, *Raphidiopsis curvata* y especies no identificadas todavía.

La LD50 para CYNs indica una toxicidad retrasada (2 mg/Kg después de 24 hs, y 0,2 mg/Kg después de 5 días). El efecto tóxico primario parece ser inhibición irreversible de síntesis de proteínas. Hay también evidencia de activación metabólica, ya que los inhibidores de CYP450 son capaces de reducir la toxicidad aguda, inhibición CYN-dependiente de síntesis de glutatión y genotoxicidad. La evidencia que involucra al CYP450 en la toxicosis in vivo, es menos clara.

El envenenamiento agudo con CYNs resulta en una acumulación de lípidos en el hígado, seguida por una necrosis hepatocelular. Efectos no hepáticos incluyen destrucción de los túbulos proximales del riñón, tanto como efectos citotóxicos y trombóticos en otros tejidos. La inyección intraperitoneal de CYN radio-marcado, resulta predominantemente hepática y con menor extensión, renal. La exposición oral subcrónica, resulta en efectos renales y hepáticos predominantemente. Los efectos de envenenamiento en humanos incluyen hepatoenteritis e insuficiencia renal. También han sido demostrados efectos genotóxicos in vitro. Ocurre fractura del filamento y pérdida del cromosoma entero a concentraciones por debajo de las cuales causa abiertamente citotoxicidad. La fragmentación del DNA hepático ha sido demostrada también in vivo, después de una dosis simple intraperitoneal de CYNs. Hay alguna evidencia de carcinogenicidad in vivo, pero se requieren más trabajos para confirmarlo.

En la región, Brasil que ha propuesto un nivel de seguridad para CYNs en agua potable de 15 µg/l. Es un nivel de carácter recomendado o sea no mandatorio como en el caso de MCs pero permite ir avanzando en los controles y en la prevención de intoxicaciones.

Saxitoxinas (Veneno Paralizante de los Moluscos, VPM)

La saxitoxinas son componentes del veneno paralizante de molusco. El VPM ha sido reconocido como una entidad clínica por centurias, estableciéndose como un problema tanto de salud pública como social y económico, cada vez mas gravitante, debido a las intoxicaciones masivas con casos fatales producidos por el consumo de moluscos contaminados.

El VPM es uno de los venenos no proteicos mas tóxicos descritos. Se compone de mas de 26 toxinas descritas, que comparten un esqueleto común denominado 3,4,6,-trialquil tetrahidropurina (fig.5) y se dividen en tres grandes grupos según la carga neta que presentan a pH neutro. El grupo de las saxitoxinas con carga neta +2, el grupo de las gonyaulotoxinas con carga neta +1 y el grupo de sulfocarbamoil saxitoxinas con carga neta 0. Los grupos guanidínicos que estas toxinas poseen en posición 2 y 8 son

responsables de su carga neta positiva. La titulación de saxitoxina revela dos disociaciones protónicas a pKa 8,22 y 11,28. Así, la toxicidad de saxitoxina es relativamente constante entre pH 6,5 y 8, y disminuye marcadamente a pH básicos por encima de pH 10.

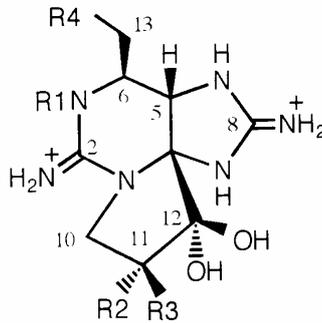


Fig.5: Estructura de las toxinas componentes del VPM

Estas toxinas, son producidas en el mar, por tres géneros de dinoflagelados (microalgas eucariotas componentes importantes del fitoplancton), *Alexandrium sp*, *Piridinium sp.*, y *Gymnodinium sp*, y en agua dulce o salobre puede ser producidas por vario géneros de cianobacterias como *Aphanizomenon sp.*, *Anabaena sp*, *Cylindrospermopsis sp*, *Lyngbya Wollei*, *Planktothix sp.*, y *Microcystis sp* entre otras.

La Saxitoxina, es la más conocida de estas toxinas, y es altamente tóxica con una dosis letal cincuenta intraperitoneal (LD₅₀) en ratones de 10 µg/kg. El esqueleto de este alcaloide puede ser carbamilado, sulfatado o N-sulfocarbamilado, para producir un rango de mas de 30 análogos, algunos de los cuales se encuentran solo en cianobacterias de agua dulce.

La ingesta de moluscos contaminados con VPM es la causa principal de intoxicación tanto para animales como personas. Sin embargo intoxicacion con estas toxinas puede darse por ingesta directa de grandes cantidades de cinobacterias.

Estas toxinas son antagonistas potentes de los canales de sodio dependientes de voltaje. El ingreso vía oral es eficiente, y la toxina se distribuye rápidamente a través del cuerpo, incluyendo al cerebro. La eliminación es vía renal, mediante simple filtración glomerular, y no hay evidencia del metabolismo de la toxina. Estudios toxicológicos en mamíferos a la fecha, han asumido el paradigma de la exposición aguda del veneno paralizante mas que el de las dosis bajas subcrónicas, más similares a lo que suele ocurrir en el agua de red domiciliaria. Disturbios en el desarrollo neurológico, han sido demostrados en peces, pero no han sido estudiados en mamíferos.

La intoxicación aguda desencadena un cuadro clínico de muy variable intensidad y duración. Los síntomas más frecuentes de menor a mayor intensidad son parestesias peribucal, facial y de manos, debilidad muscular cervical, disfonía y dificultad para deglutir, dificultad para deambular, síndrome vertiginoso, náuseas, vómitos, broncoaspiración, parálisis respiratoria, compromiso del sistema nervioso autónomo (Retención urinaria, psialorrea (salivación profusa), midriasis fina no fotorreactiva (pupilas agrandadas) y finalmente paros cardiacos en asistolia.

Anatoxinas

Las anatoxinas son neurotoxinas que tienen su lugar de acción en las sinapsis donde participa como neurotransmisor la acetilcolina. Es por esto que actúa principalmente en la placa neuromuscular provocando la contracción muscular no controlada

característica de las intoxicaciones con estas toxinas. Bajo la denominación de Anatoxinas se agrupan dos tipos de toxinas diferentes en estructura y acción molecular: las Anatoxina-a y homoanatoxinas por un lado y la Anatoxina-a(s) por otro.

Anatoxina-a/ homoanatoxina-a

La anatoxina-a (2-acetil-9-azabicyclo(4-2-1)non-2-eno) y homoanatoxina-a (residuo propionilo reemplaza al acetilo en el C2) (fig.6 y 7), son producidas por *Anabaena flos-aquae*, *A. planctónica*, *Aphanizomenon spp.*, *Plancktothrix formosa* y *Oscillatoria spp.* bénticas.

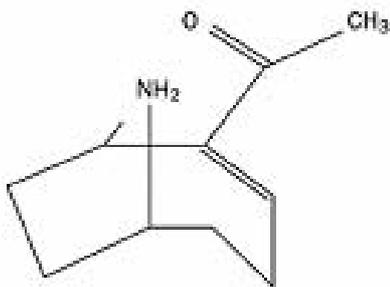


Fig.6: Estructura de la anatoxina-a

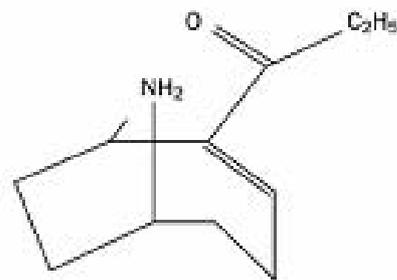


Fig.7:Estructura de la homoanatoxina-a

Estas toxinas, son agonistas del receptor nicotínico de acetilcolina, teniendo una LD50 de 200 ug/Kg. La residencia de estas toxinas en los receptores post sinápticos colinérgicos resultan en una despolarización nerviosa (fig. 8). Los síntomas típicos en ratones son pérdida de la coordinación muscular, agitación respiratoria, convulsiones y muerte en minutos por paro respiratorio. Han sido atribuidas muertes de perros que lamieron su pelaje después de nadar, al envenenamiento con estas toxinas. Una sola fatalidad humana ha sido atribuida a envenenamiento por anatoxina, luego que la víctima nadara en un bloom. Las anatoxinas no han sido ligadas a envenenamiento humano a través del consumo de agua potable.

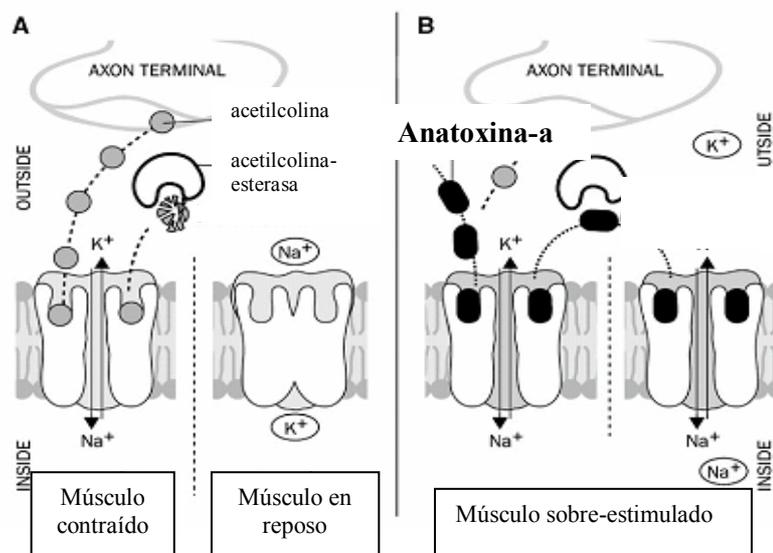


Fig.8: Esquema que muestra el efecto de la anatoxina-a sobre los receptores de acetilcolina en la placa neuromuscular. A: evento normal. B: intoxicación por anatoxina-a.

Anatoxina-a(s)

Las anatoxina-a(s) son N-hidroguanidinas cíclicas fosforiladas, con una estructura de acción similar a los pesticidas organofosforados (fig.9).

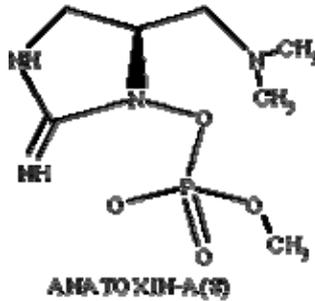


Fig. 9: Estructura de la anatoxina-a(s)

Este es un inhibidor potente de la acetilcolinesterasa con una LD50 de 20 µg/Kg. Los efectos tóxicos in vivo son similares a los de la anatoxina-a, con la adición de salivación y lacrimación. La anatoxina-a(s) es producida por *Anabaena flos-aquae* y *A. lemmermanii*, y ellas han sido implicadas en la muerte de pájaros acuáticos en Dinamarca. No se han atribuido enfermedades humanas a esta toxina.

Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son parte constituyente de la pared celular de las bacterias gram negativas, incluidas las cianobacterias. Los efectos de los LPS son conocidos ampliamente en el caso de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Los LPS cianobacterianos están constituidos por Lipido A (Fig. 10), un polisacárido central (Glucosamina), y cadenas de polisacáridos periféricos. Los LPS de cianobacterias poseen una mayor variedad cadenas de ácidos grasos insaturados y falta de grupos fosfato entre otras diferencias.

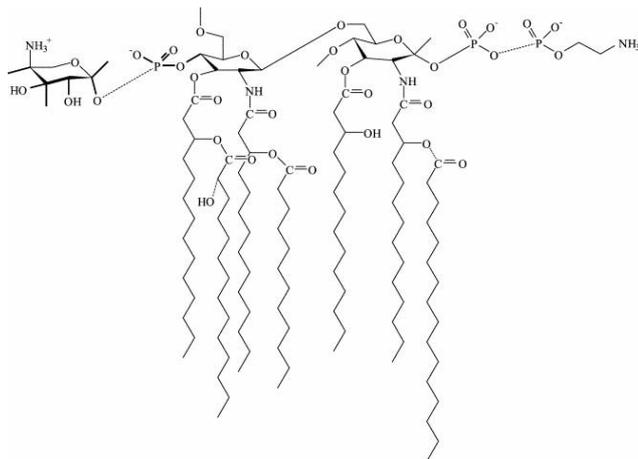


Fig. 10. Estructura de Lipido A, El componente tóxico de los LPS

Los LPS producen fiebre en mamíferos y están involucrados en síndromes de shock sépticos que podrían potenciar por ejemplo los efectos de las hepatotoxinas. Dado que LPS son componentes generales de la pared celular de las cianobacterias

habría que estudiar su contribución a la toxicidad de las cianobacterias así como su participación en la modulación de los efectos tóxicos de las cianotoxinas.

Bibliografía

- ANDRINOLO, D., MICHEA, L.F., & LAGOS, N. 1999. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of Saxitoxin, a component of Paralytic Shellfish Poison (PSP), in cats. *Toxicon*, 37: 447-464.
- ANDRINOLO D., IGLESIAS V., GARCÍA C. & LAGOS N. 2002. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon* 40: 699-709.
- ANDRINOLO D, GOMES P., TEXEIRAS S., SOARES-DA-SOUZA P. & LAGOS N. 2002. Absorption of gonyautoxin 2/3 epimers, the major component of Paralytic Shellfish Poisoning, through mammalian intestinal epithelium. *Toxicon* 40, 1387-1397.
- ANDRINOLO D., SEDÁN D., TELESE L., AURA C.; MASERA S., GIANNUZZI L., MARRA C. A. & ALANIZ M. T. 2008 Hepatic recovery after damage produced by sub-chronic intoxication with the cyanotoxin microcystin-LR. *Toxicon* 51 (3), 457-467.
- CODD GA, LF MORRISON, JS METCALF. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (2005) 264-272.
- DING W, SHEN H, ONG C. Critical role of ROS formation in microcystin-induced cytoskeletal disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 64 (2001) 507-519.
- DING WX, HM SHEN, HG SHEN, CN ONG. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Res.* 78 (1998) 12-18.
- DING WX, HM SHEN, Y SHEN, HG ZHU, CN ONG. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environm. Health Perspect.* 106 (1998) 409-413.
- ECHENIQUE R, GIANNUZZI L, FERRARI L, GONZÁLEZ D (2003) Estudios sobre la calidad del agua de red en Bahía Blanca, Argentina. *Anales 13º Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente* 30: 1-18.
- EL SAADI O, ESTERMAN AR, CAMERON S, RODER DM. Murray river water, raised cyanobacterial counts and gastrointestinal and dermatological symptoms. *Med.J.Aust.* 162 (1995) 122-125.
- FALCONER IR. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacterial) in drinking and recreational waters. *Environ. Toxicol.* 14 (1999) 5-12.
- FLOHÉ L., ÖTTING F. (1984) Superoxide Dismutase Assays, *Methods Enzymol.* 105, 93-104.
- FROSCIO S.M., A.R. HUMPAGE, W. WICKRAMASINGHE, G. SHAW, I.R. 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system *Toxicon*: 51 191-198.
- GARCIA C., LAGOS M., TRUAN D., LATTES K., VEJAR O., CHAMORRO B., IGLESIAS V., ANDRINOLO D. & LAGOS N. 2005. Human intoxication with paralytic shellfish toxins: Clinical parameters and toxin analysis in plasma and urine. *Biol. Res.* 38: no.2-3, p.197-205. ISSN 0716-9760
- GEHRINGER M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.* 27975 (2004) 1-8.
- ITO, E., KONDO, F., TERAOKA, K., HARADA, K. 1997. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 35 (9),1453-1457.
- JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., AN, J.S., CARDO, D.M., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E.M., ANTUNES, M.B.C., MELO-FILHO, D.A., LYRA, T.M., BARRETO, V.S.T., AZEVEDO, S.M.F.O., JARVIS, W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. *New Engl. J. Med.* 33, 873-878.
- LAGOS N., & ANDRINOLO D. 1999. Paralytic Shellfish Poisoning (SPS): Toxicology and Kinetics. In: *Seafood Toxicity: Mode of Action, Pharmacology and Physiology*. Ed. L. M. Botana. Marcel Dekker, Inc., New York. pp 203-216.
- LAGOS N., ONODERA, H., ZAGATTO, P.A., ANDRINOLO, D., AZEVEDO, S.M.F.O. & OSHIMA, Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.

- MAC KINTOSH C, BEATTIE KA, KLUMPS S, COHEN P, CODD GA. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264 (1990) 187-192.
- MARDONEZ P, ANDRINOLO D, CSENDES A AND LAGOS N. 2004. Gonyautoxins human jejunal permeability measured by Ussing Chamber Technique. *Toxicon* 44: 521-528.
- MOLICA R., ONODERA H., GARCÍA C., RIVAS M., ANDRINOLO D., NACIMIENTO S., MEGURO H., OSHIMA Y., AZEVEDO S. & LAGOS N. 2002. Toxins in the freshwaters cyanobacterium *Cylindrocapsa raciborskii*, isolated in Tabocas reservoir in Caruaru. Pernambuco. Brasil. *Phycologia* 41: 606-611.
- NORRIS R. L. G., A. A SEAWRIGHT, G. R SHAW, P SENOGLES, G. K EAGLESHAM, M. J SMITH, R. K CHISWELL, M. R MOORE. 2002. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse. *Toxicon*, 40: 471-476.
- ONODERA H, OSHIMA Y, HENRIKSEN P, YASUMOTO T. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish Lakes *Toxicon*, 35: 1645-1648
- PEREIRA P, ONODERA H, ANDRINOLO D, FRANCA S, ARAUJO F, LAGOS N & OSHIMA Y. 2000. Co-occurrence of PSP toxins and microcystins in Monteargil freshwater reservoir, Portugal. Proceedings VIII Conferencia Internacional sobre algas nocivas Febrero de 2000. Tasmania, Australia.
- PEREIRA, P., ONODERA, H., ANDRINOLO, D., FRANCA, S., ARAUJO, F., LAGOS, N. & OSHIMA, Y. 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38: 1689-1702.
- UENO, Y., NAGATA, S., TSUTSUMI, T., HASEGAWA, A., WATANABE, M.F., PARK, H., CHEN, G.C., CHEN, G., YU, S., 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.
- WHO 2004 Guidelines for Drinking-Water Quality. Recommendations Chemical Fact. Sheets, vol 1. Third ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 407-408.

Capítulo 5: Olores y Sabores en Agua

Fanny Busso

5. 1. Introducción

La presencia de sabores y olores en agua de bebida es la principal queja de los consumidores, junto con la dureza y la turbidez del agua, quienes tienden a creer que si el agua huele mal, probablemente no es segura.

El problema de sabores y olores es uno de los más difíciles de controlar en el ámbito de la producción y de la distribución del agua potable. En general se trata de eventos fugaces que en ocasiones no permiten la identificación de los productos responsables para controlar el fenómeno. También ocurren la sinergia, enmascaramiento y antagonismo entre distintas sustancias sápidas que aumentan la dificultad de identificación.

Existen varios tipos de olores y sabores como cloro, putrefacción, medicinal, frutado-floral, tierra, moho, etc., que corresponden a un número muy importante de sustancias químicas de origen humano o natural. Algunas de estas sustancias químicas presentan un umbral de detección por el olfato o el gusto a concentraciones muy bajas, del orden del nanogramo por litro.

Estas sustancias pueden generarse a tres niveles:

- En los recursos de agua por contaminación química, metabolitos originados por microorganismos, transformación de compuestos químicos por actividad microbiana, etc.
- En las cadenas de tratamiento de las plantas potabilizadoras: los productos químicos usados durante la potabilización e interacciones de éstos con sustancias preexistentes en el agua.
- En el sistema de distribución de agua por fenómenos de corrosión, transformación de los desinfectantes residuales, etc.

Controlar el problema de sabores y olores en los suministros de agua implica conocer las sustancias que lo provocan, los tipos de gustos y olores y los mecanismos de abatimiento en el proceso de producción y distribución de agua potable.

Los principales sabores y olores percibidos en el agua de bebida son a cloro y tierra y, en menor medida, pescado, medicinal, sulfhídrico y metálico.

5. 2. Clasificación de olores y sabores

La evaluación sensorial del agua cruda y potabilizada siguiendo la rueda de sabor y olor y sus descriptores es un valioso punto de partida para caracterizar organolépticamente el agua. El análisis químico permite la identificación de los compuestos odorantes y asociarlos con los descriptores. Esta información es imprescindible a la hora de encarar las medidas de remediación.

La Tabla 1 (modificada de Suffet y Mallevalle, 1998) muestra los compuestos químicos odorantes, su origen y el olor.

Tabla 1. Compuestos que causan olores y sabores en agua (modif. de Suffet y Mallevalle, 1998)

Compuesto	Fuente	Olor
Geosmina	Actinomycetes Cianobacterias	Tierra
2-Metil Isoborneol	Actinomycetes Cianobacterias	Moho
Cloroanisol	Metilación del clorofenol	Moho
Trans,2-cis,6-nonadienal	Algas	Pepino
Aldehídos de alto peso molecular	Ozonización, Diatomeas	Frutal-Fragante
2-isopropil-3-metoxi-pirazine	Algas y vegetación en descomposición	Vegetación en descomposición
n-Hexanal	Algas flageladas. Ej <i>Ceratium hirundinella</i>	Pescado
n-Heptanal	Diatomeas. Ej <i>Synedra rumpens</i>	Pescado
Hepta- y Deca-dienal	<i>Dinobryon sp.</i>	Pescado
2-trans,4-cis,7-cis-decatrienal	<i>Synura y Dinobryon cylindricum</i>	Pescado
Decadienal	Algas flageladas. Ej <i>Synura uvella</i>	Aceite de hígado de bacalao
Mercaptanos	Cianobacterias vivas o en descomposición	Sulfuroso
Acido sulfhídrico	Bacterias anaeróbicas	Huevo podrido
Aldehídos de bajo peso molecular	Cloración de amino-ácidos	Pantano – Pileta
Trans, trans-2,4-heptadienal y trans, 4-heptenal		Pescado – Pantano
Dimetil trisulfito y Indol	Descomposición bioquímica de la vegetación	Séptico
Clorofenoles	Cloración de fenoles	Medicinal
Iodoformos	Cloraminación	Medicinal
Cloroanisoles	Metilación bioquímica de clorofenoles	Hongos
Antioxidantes fenólicos	Cañerías de polietileno	Plástico
Cloro libre	Desinfección del agua	Cloro
Monocloraminas	Desinfección del agua	Cloro
Dicloraminas	Desinfección del agua	Pileta
Ozono	Desinfección del agua	Ozono

5. 2. 1. Geosmina

La geosmina o trans-1,10-dimethyl-trans,9-decanol fue identificada por Gerber et Lechaevallier (1965) a partir de cultivos de actinomicetos.

La geosmina posee un carbono asimétrico (ligado a cuatro grupos diferentes) lo que induce a la existencia de dos estereoisómeros, la D(+) geosmina y la L(-) geosmina. Estos dos isómeros tienen propiedades olfativas muy diferentes: la detección de esta última está en el orden de los ng/l mientras la primera en pg/l.

Los patrones comerciales disponibles son una mezcla de los dos isómeros.

Es el principal compuesto que causa problemas de calidad del agua con relación a sabores y olores ya que a menudo está presente con bajas concentraciones de células de *Anabaena*. Jones and Korth (1995) demostraron la estrecha relación de *Anabaena* y la concentración de geosmina en dos sitios muy distantes entre sí y en las distintas estaciones del año en New South Wales. La concentración de geosmina por célula fue de 10^{-14} g/cél constante a través del año en ambos sitios. Sobre la base de que el umbral de olor en humanos es de 10-20 ng/l estos autores establecieron que pueden esperarse problemas de olor y sabor con concentraciones tan pequeñas como 1000-2000 cél/ml.

Los géneros de Cianobacterias que producen geosmina son: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Schizotrix*, *Planothrix* y *Simploca* (Perrson, 1983). Silva & Silva (1998) describieron la alta producción de Geosmina a partir de un cultivo puro de *Nostoc muscorum* bajo altas intensidades lumínicas.

5. 2. 2. 2-MIB

El 2-metilisoborneol (MIB) o 2-exo1,2,7,7-tetramethyl-bicyclo-(2,2,1)-heptan-2-ol fue recuperado por Gerber (1969) a partir de cultivos puros de Actinomicetes y a partir de aguas naturales. *Oscillatoria tenuis*, *Oscillatoria sp.*, *Uroglena americana*, *Pseudonabaena* y *Phormidium* han sido identificadas como organismos productores de 2-MIB.

5. 2. 3. β -cyclocitral

Otros compuestos identificados durante blooms algales de cianobacterias son el β -cyclocitral y el β -ionone y son producidos a concentraciones similares a la geosmina, pero el umbral humano de olor de estos compuestos es demasiado alto y casi nunca causan problemas de olor y sabor.

Jüttner (1988) señaló que varias especies de *Microcystis* producen grandes cantidades de β -cyclocitral, sustancia con olor a tabaco.

El límite de detección con CG-FID (flame ionization detection) fue de 0.5 μ g/l (Kenefick et al. 1992), muy por debajo del umbral de 19 μ g/l.

La producción de β -cyclocitral y microcistina-LR tiene una correlación muy alta pero este compuesto no puede usarse como alerta temprana debido a su alto umbral de olor.

5. 2. 4. Trichloroanisol

Mientras que los olores y sabores producidos en las fuentes de agua o durante los procesos de tratamiento han sido extensivamente estudiados, los generados en los sistemas de distribución han recibido poca atención. Entre varios descriptores, el sabor a tierra/moho es a menudo detectado y se ha explicado por la detección de la presencia de trichloroanisol (TCA). Actinomicetos aislados desde los sistemas de distribución, Pirou (2000), son capaces de producir TCA por metilación de triclorofenoles (TCP) formados durante la cloración del agua de bebida o presentes naturalmente.

5. 3. Eliminación de olores y sabores

Oxidantes como el ozono, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, cloro son efectivos para la remoción de olores como así también el carbón activado granular (CAG) y el carbón activado en polvo (PAC). La elección del tratamiento a aplicar depende de los compuestos involucrados en la generación de olores y sabores y las instalaciones de las plantas de tratamiento.

El PAC puede ser efectivo para mitigar los olores producidos por 2-MIB y Geosmina en fuentes de aguas dependiendo de la calidad del agua y las condiciones de operación. El punto de adición del PAC tiene un impacto significativo para la remoción, Chen et al (1998). La condición ideal es dosificar en la toma de agua para lograr el mayor tiempo de contacto y antes de la dosificación de coagulantes y oxidantes. También influye el tipo de PAC usado: bituminoso, lignita o madera. Este último puede tener muy buena performance adicionado con el coagulante y con largo tiempo de contacto.

5. 4. Análisis sensorial

Los análisis sensoriales son utilizados ampliamente para evaluar las características organolépticas del agua ya que permiten estimar la aceptabilidad por parte de los consumidores. Varios países tienen normas de estándares sensoriales a las que deben ajustarse.

Este tipo de ensayo se ajusta a la realidad de lo que percibe el consumidor ya que usa el mismo instrumento de medición: el gusto y el olfato.

En forma rápida y simple se pueden detectar compuestos generadores de sabores y olores presentes en el agua, en concentraciones muy bajas, en muchos casos con mayor sensibilidad que los métodos instrumentales, los que requieren pretratamiento de la muestra. El alerta dado por la detección de un episodio de olor y sabor permite tomar las medidas preventivas cuando el problema se origina en la fuente de agua o medidas correctivas si son ocasionadas en el proceso de tratamiento o en el sistema de distribución.

De acuerdo al perfil de sabor y olor, puede inferirse la presencia de las sustancias relacionadas a ese perfil, utilizando posteriormente métodos instrumentales para confirmación o identificación más específica.

Puede detectarse la presencia de compuestos de distinta naturaleza química en un único ensayo.

5. 4. 1. Herramientas fisiológicas

Las herramientas en que se basan los análisis sensoriales son el gusto, olfato y el flavor, término sin traducción al castellano.

Gusto son sensaciones percibidas por los órganos del gusto, al ser estimulados por ciertas sustancias solubles.

Olfato se define como las sensaciones percibidas por los órganos del olfato cuando son estimulados por sustancias volátiles.

Flavor es una combinación de sensaciones gustativas y olfativas térmicas, táctiles, etc., que son percibidas al tragar o al hacer circular una porción de agua por la cavidad bucal.

5. 4. 2. Métodos de Análisis sensorial

Los métodos de análisis sensorial son:

- Valor Umbral de Olor o TON (Threshold Odor Number)
- Valor Umbral de Sabor o TTN (Threshold Taste Number)
- Perfil de olor y sabor o FPA (Flavor Profile Analysis)

Método Valor Umbral de Olor y sabor

La directiva de la EEC (Comunidad Económica Europea) establece que el olor y sabor umbral debe ser ≤ 3 a 25 °C.

Para la determinación del Número Umbral de Olor o Sabor se hacen diluciones con agua libre de olor y sabor: agua destilada filtrada por carbón activado o agua mineral con características fisicoquímicas próximas a la de la muestra.

El Valor Umbral de Olor o Sabor:

Es la mayor dilución a la que se percibe olor o sabor.

Cálculo del TON (o TTN):
$$\frac{\text{volumen de la muestra} + \text{volumen agua referencia}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Como parte del ensayo, se describe el tipo de olor y sabor que se percibe, comparando con soluciones estándar.

Método Perfil de Olor y Sabor

El método perfil de Olor y Sabor fue desarrollado originalmente por la industria alimenticia y luego adaptado al análisis sensorial del agua. Un panel mínimo de 4 panelistas y un líder es necesario para realizar el ensayo, describiendo la naturaleza e intensidad del olor y sabor.

El perfil de olor se hace a 25°C y a 45°C y el perfil de sabor solo a 25°C. Panelistas entrenados caracterizan cualitativamente la muestra según la Rueda de Olor y Sabor.

La cuantificación de la intensidad se hace con la escala del 0 al 12 (Mallevialle, J. 1995)., considerando los números pares. Se informa 0 cuando no se diferencia olor o sabor y umbral cuando apenas puede diferenciarse un olor pero no cuantificarlo.

Cada panelista da una descripción independiente de la muestra, el líder reúne todos los resultados e informa la naturaleza de la muestra en la que el 50% de los panelistas coincide.

La Intensidad resulta de un promedio de las intensidades de esas coincidencias.

Descriptor de olor:

Tierra / Moho / Humedad

Cloro / Ozono / Pileta

Hierba / Madera / Pasto

Séptico / Podrido

Fragante / Frutal

Pescado

Medicinal / Farmacia

Químico/Hidrocarburo

Descriptor de Sabor:

Ácido

Dulce

Salado

Amargo

Intensidad: Valor que se asigna a un descriptor presente en la muestra, según una escala establecida, de acuerdo a la intensidad con que se perciba.

La escala de intensidades utilizada se muestra en la Tabla 2.

Los panelistas deben asignar intensidades según esta escala, informando solamente números pares. La intensidad final, correspondiente a una naturaleza determinada, puede ser un número par luego de haber promediado las intensidades individuales asignadas por los panelistas.

Tabla 2. Intensidades de olores

Valor	Intensidad
Sin sabor / olor	
Umbral	
2	Muy leve
4	Leve
6	Leve a moderado
8	Moderado
10	Moderado a fuerte
12	Fuerte

Los panelistas deben asignar intensidades según esta escala, informando solamente números pares. La intensidad final, correspondiente a una naturaleza determinada, puede ser un número par luego de haber promediado las intensidades individuales asignadas por los panelistas.

Soluciones de referencia

Las soluciones de referencia son patrones de concentración conocida que se utilizan para el entrenamiento de los panelistas, cuando se requiere asignar una intensidad, por la aparición de una nueva naturaleza o en caso de que no haya coincidencia suficiente para asignar una naturaleza. Algunas de las soluciones de referencia para olores y sabores utilizadas son:

Compuesto	Descriptores
Geosmina	Tierra – Moho – Humedad
2-Metilisoborneol	Tierra – Moho – Humedad
Tricloroanisol	Tierra – Moho – Humedad
Cloro	Cloro - Pileta
Cis-3-hexenol	Hierba – Pasto
Trimetilamina	Pescado
Fenol	Medicinal – Farmacia
Azúcar en polvo	Dulce
Cloruro de sodio	Salado
Ácido cítrico	Ácido
Cafeína	Amargo

Preparación de las muestras:

Las muestras deben ser recolectadas sin cámara de aire en botellas de vidrio, destinadas sólo para este fin, lavadas y secadas a estufa a 180°C. Se transportan conservadas a 4°C y deben analizarse lo más rápido posible y no más allá de 24 horas después de la extracción.

Colocar aproximadamente 300 ml de muestra en un Erlenmeyer de 500 ml de boca ancha con tapa esmerilada. Ajustar la temperatura de la muestra colocándola en baño termostático a la temperatura indicada (25 y 45 °C) al menos 20 minutos antes del análisis. Las muestras para análisis de olor deben transferirse con cuidado de no perder compuestos volátiles.

Condiciones ambientales: El lugar donde se realiza el análisis sensorial debe ser un ambiente limpio, libre de olores y con temperatura controlada, preferentemente reservado en forma exclusiva para este tipo de análisis.

Panelistas: Un panel debe formarse con al menos tres panelistas. 30 minutos antes de realizarse el análisis no pueden comer, beber ni fumar. No pueden usar perfumes y deben lavarse las manos con jabón neutro. En caso de presentar estado gripal o alérgico, es aconsejable que no participen del panel.

Análisis:

- Entre cada muestra analizada se debe oler agua de referencia una o dos veces.
- No se debe discutir o interactuar con los otros panelistas.
- No es recomendable analizar más de seis muestras por sesión, a menos que al cabo de su análisis no se haya producido fatiga sensorial.
- Registrar las impresiones de acuerdo con los descriptores indicados y asignarles una intensidad.

Discusión: Una vez que todos los panelistas hayan registrado sus impresiones, se realiza una etapa de discusión. El responsable del panel conduce la discusión. Analizando la naturaleza y la intensidad, el responsable del panel agrupa las respuestas, preguntando a los panelistas si concuerdan con ellas. Durante la etapa de discusión el panel acuerda un perfil para cada una de las muestras analizadas.

5. 5. Determinación de geosmina en aguas utilizando microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía gaseosa con detector de masas

Una gran variedad de técnicas analíticas ha sido desarrollada para identificar compuestos volátiles olorosos presentes a veces en niveles trazas en agua siendo el **CLSA (Closed Loop Stripping Analysis)** con GC-MS la técnica más conocida para estos compuestos. La principal ventaja de este método es su alta sensibilidad.

El **SPME (Solid Phase Micro Extraction)** con GC-MS, es una nueva técnica que no requiere el uso de solventes y se aplica a muestras líquidas o gaseosas. Se ha desarrollado el método de SPME como alternativa más rápida y sencilla para el monitoreo de geosmina. Manger J. (2000).

La determinación de geosmina en una muestra se realiza por GCMS que identifica y cuantifica el analito que contiene. Este analito es concentrado por SPME, utilizando una fibra de sílice fundida de 100 µm de polidimetilsiloxano. La fibra se introduce en el vial con la muestra, actuando como una esponja concentrando los compuestos en su superficie, luego se inyecta la fibra al puerto de inyección del GCMS, donde se produce la desorción térmica de los analitos que pasan posteriormente a la columna, donde son separados y luego detectados por espectrometría de masas. El límite de cuantificación es de 14 ng/l.

Las variables más importantes del proceso son la temperatura de extracción, el agregado de electrolitos para variar la solubilidad de los compuestos, las condiciones de agitación y el tiempo de extracción.

Reactivos, patrones y soluciones de referencia:

-*Geosmina*: ampolla de 2 g/l. Preparar una solución final de 20 ng/l en metanol.

-*Tricloroanisol (TCA)*: ampolla de 1g/l. Preparar una solución final de 100 ng/l en metanol.

-*Sulfato de sodio anhidro*

Estándar interno: Usar un estándar interno (TCA) que se introduce en todas las muestras y patrones antes de su extracción mediante el cual se saca un factor de respuesta que se usa para calcular la concentración de la geosmina.

5. 5. 1. Preparación de la muestra y análisis

Las muestras deben extraerse en frascos de vidrio color caramelo sin cámara de aire. Una vez llegadas al laboratorio, deben conservarse refrigeradas no más de 2 días después de la fecha de extracción.

Medir 50 ml de muestra con matraz aforado, trasvasarla a un vial de 60 ml, agregar con micro jeringa 25 µl de solución intermedia T.C.A., 12,5 g de sulfato de sodio e introducirle el agitador magnético.

Sellar con tapa de goma y precinto de aluminio, poner en la plancha calefactora a baño maría, que debe estar a 40 °C y regular la agitación en velocidad media.

Colocar la fibra en el headspace del vial. Oprimir el timer y dejar el sistema 20 minutos en esas condiciones.

Preparar el cromatógrafo gaseoso seleccionando el método para geosmina

Transcurrido el tiempo de extracción de la muestra, retraer la fibra en la jeringa e insertarla en el puerto de inyección posterior del GCMS; bajar la fibra, esperar 3 minutos para dar comienzo a la corrida cromatográfica.

Cálculo del factor de respuesta:

Preparar una solución de geosmina de 20 ng/l y procesarla como una muestra. Obtener las áreas de geosmina y del T.C.A y aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{\text{Área geosmina} * \text{Conc. T.C.A}}{\text{Área T.C.A} * \text{Concentración geosmina}}$$

Donde:

Área geosmina: Área de geosmina en la solución de 20 ng/l

Concentración de TCA: 100 ng/l

Área T.C.A.: Área del TCA en la solución de geosmina de 20 ng/l

Concentración de geosmina: 20 ng/l

Cálculo de la concentración de geosmina en una muestra.

Procesar la muestra y obtener las áreas de geosmina y TCA. Aplicar la siguiente fórmula.

$$\text{Concentración GEO} = \frac{\text{Área geosmina} * \text{Conc. T.C.A}}{\text{Área T.C.A} * \text{Factor de respuesta}}$$

Donde:

Área geosmina: Área de la geosmina en la muestra.

Concentración TCA: 100 ng/l.

Área TCA: Área del TCA en la muestra.

Factor de respuesta: Factor de respuesta.

Bibliografía

- ANSELME, C. 1985. Characterization of low molecular weight products desorbed from Polyethylene tubings. The Sci. of Total Envir. 47, 371.
- BRUCHET, D. KHIARI, D. SUFFET, I.H. 1995. Monitoring and Analysis in: Advances in Taste and Odor Treatment y Control. AWWA research Foundation.
- CHEN, T.; ATASI, K.Z.; HUDDLESTON, J.I.; OPACHAK, L.; YOUNG, C.C.; AND I.H. SUFFET. 1998. Evaluating PAC adsorption of MIB, Geosmin, and IPMP in Detroit river source water. Seminario Internacional de Olores y Sabores. Córdoba, Argentina.
- DEL OLMO, S. 1998. Los procedimientos de análisis sensoriales. Seminario Internacional de Olores y Sabores. Córdoba, Argentina.
- GERBER, N.N., LECHEVALLIER, H. A. 1965. Geosmin and Earthy Smelling substance Isolated from Actinomycetes. Appl. Microbiol. 13. 935.
- JENKINS, D., MEDSKER, L.L. & J.F. THOMAS. 1967. Odorous Compounds in natural waters: Some sulfur compounds associated with Blue-green algae. Envir. Sci. Technol., 15:6/7:247
- JONES G.J. & W. KORTH. 1995. In situ production of volatile odour compounds by river and reservoirs phytoplankton populations in Australia. Water Science and Technology 31, 145-151.
- JÜTTNER, F. 1988. Biochemistry of biogenic off-flavour compounds in surface waters. Water Sci. Tech. 20(8/9), 107-107.
- JÜTTNER, F. 1981. Detection of lipid degradation products in the water of a reservoir during a bloom of *Synura uvella*. Appl. Envir. Microbiol. 41, 100.
- KENEFICK, S.L.; HRUDEY, S.E.; PREPAS, E.E.; MOTKOSKY, N. & H.G. PETERSON. 1992. Odorous substances and cyanobacterial toxins in prairie drinking water sources. Wat. Sci. Tech. 25(2): 147-154.
- KHIARI, D., BARRET, S.E. & I.H. SUFFET. 1993. Determination of organic compounds causing decaying vegetation and septic odors in drinking waters by Sensory-GC. Proceedings of the AWWA. In Water Quality Technology Conference. Miami, USA. 1833-1858.
- KRASNER, S.W. 1984. Aroma and flavor characteristics of free chlorine and chloramines. Proc. AWWA WQTC Ann. Conf. Denver. USA.
- LLOYD, S.W.; LEA, J.M., ZIMBA, P. V. AND GRIMM, C. C. 1998. Rapid analysis of geosmin and methylisoborneol in water using solid phase micro extraction procedures. Water Res. 32, 7: 2140-2146.
- MALLEVIALLE, J. AND I. H. SUFFET. 1987. Identification and Treatment of Tastes and Odors in Drinking Water. AWWA Research Foundation-Lyonnais Des Eaux.

- MANGER, JANINE. 2000. Determinación de Geosmina en aguas utilizando SPME y cromatografía gaseosa con detector de masas. Seminario Internacional Identificación y Control de Algas en la Producción de Agua Potable. Rosario. Argentina.
- PERSSON, P.E. 1983. Off-flavors in aquatic ecosystems – An introduction. Water Science and Technology. 15, 1-11.
- PIRIOU, P. 2000. Trichloroanisole Kinetics & musty tastes in drinking water distribution systems. 1° World Congress of the International Water Association. Paris.
- SILVA, P.G. Y H.J. SILVA. 1998. Observaciones preliminares del efecto de la calidad de la fuente luminosa en la producción de metabolitos olorosos volátiles por cultivos de cianófitas. Taller Internacional Olores y Sabores. Córdoba, Argentina.
- SUFFET (MEL) I.H. AND J. MALLEVIALLE. 1998. Taste and Odor Problems Observed in raw and finished drinking water. Taller Internacional Olores y Sabores. Córdoba, Argentina.

Sección II: Metodología Analítica

Capítulo 6: Fundamentos de las técnicas analíticas utilizadas para detectar células, toxinas y parámetros físico químicos relevantes

Cristian R. Oliver
Alejandra Rasile

6.1. Introducción

La Química Analítica se halla directamente involucrada en diversos aspectos de la toxicología experimental y aplicada. En el presente manual se han descrito las técnicas utilizadas en la determinación de las varias toxinas presentes en aguas naturales y de red, con los consiguientes requerimientos de exactitud y precisión para alcanzar límites de concentración cercanos al nivel de trazas, es decir cercanos a 1 ppb.

Los avances en la instrumentación analítica permiten aumentar la sensibilidad en las determinaciones de las sustancias que se desean investigar, lográndose cuantificar cantidades del orden de los femtogramos. Si bien ello es altamente deseable para el analista, pueden presentarse en algunos casos el riesgo de informar resultados falsos positivos especialmente en los análisis de trazas. Debido a ello, deben establecer valores de corte o cut-off, también llamados umbrales positivos. Estos valores de corte son las concentraciones de los analitos por encima de las cuales se considera como seguro un resultado positivo. Estos valores tendrían que estar consensuados entre todos los laboratorios.

El procedimiento analítico - toxicológico incluye usualmente dos pasos. El primero consiste en realizar un análisis preliminar que permite identificar las muestras negativas que no contienen los analitos buscados. El segundo paso involucra la confirmación de la identidad de las sustancias presentes en las muestras positivas, mediante métodos específicos.

Las pruebas de screening proveen resultados preliminares, indicando claramente la ausencia de una toxina, es decir, no informan falsos negativos. Sin embargo, un resultado positivo debe ser confirmado por otro método específico. Siempre debe realizarse al mismo tiempo que se analiza la muestra un control positivo y uno negativo. Un control negativo (blanco) ayuda a asegurar que falsos positivos (por ejemplo contaminación con reactivos o material de vidrio con el analito en cuestión o la presencia de componentes de la muestra) no sean obtenidos. Igualmente, la inclusión de un falso

positivo sirve para asegurar que los reactivos han sido preparados en forma correcta y han mantenido su estabilidad. En toda circunstancia los ensayos de comprobación deben realizarse sobre una nueva alícuota de la muestra, lo cual implica que en el momento de decidir que ensayos van a realizarse debe considerarse reservar un volumen adecuado para confirmar el resultado.

El segundo paso luego del screening se refiere a la confirmación que permita asegurar la exactitud del resultado. Este paso se realiza mediante técnicas basadas en principios físico-químicos diferentes de las usadas para la identificación y deben involucrar técnicas estructurales (espectrometría de masa, arreglo de diodos) y al menos tan sensibles como las de screening. Así, la cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta presión (HPLC) son las que generalmente se emplean en este paso. Se recomienda el uso de la espectrometría de masas (MS) acoplada bien a la cromatografía de gases (GC/MS) o a la cromatografía líquida (HPLC/MS) para aumentar la sensibilidad y especificidad del análisis.

Otro aspecto es la confiabilidad de un resultado, ya sea positivo o negativo. Para muestras positivas se define la sensibilidad como la habilidad de un ensayo de mostrar como positiva a una muestra que realmente es positiva (este término no debe confundirse con la "sensibilidad del ensayo" definida anteriormente). La especificidad es la habilidad del ensayo de mostrar como negativa a una muestra que realmente es negativa. En términos matemáticos se pueden escribir como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{positivos en el ensayo}}{\text{positivos en el ensayo} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{negativos en el ensayo}}{\text{negativos en el ensayo} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

Los positivos en el ensayo son las muestras positivas que el ensayo detecta como positivas. Los falsos negativos son las muestras que en realidad son positivas pero que el ensayo muestra como negativas. Los negativos en el ensayo son las muestras negativas que el ensayo detecta como negativas y los falsos positivos son las muestras que en realidad son negativas pero que el ensayo detecta como positivas. Obviamente, es necesario disponer de un lote de muestras positivas y negativas conocidas para calcular estos parámetros.

La confiabilidad en la positividad: C(+) es la probabilidad de que una muestra detectada como positiva por el ensayo sea realmente positiva. Del mismo modo la confiabilidad en la negatividad, C(-) es la probabilidad de que una muestra que el ensayo detecta como negativa sea realmente negativa. En términos matemáticos se puede escribir como:

$$\text{Confiabilidad (+)} = \frac{\text{positivos en el ensayo}}{\text{positivos en el ensayo} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Confiabilidad (-)} = \frac{\text{negativos en el ensayo}}{\text{negativos en el ensayo} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

A modo de ejemplo, si en 1000 muestras 20 son positivas, y el ensayo posee una sensibilidad del 90 % significa que el ensayo detectará como positivas a 18 de las 20 muestras (2 son falsos negativos). Si además se sabe que la especificidad del ensayo es del 90% significa que detectará 882 como negativas (98 falsos positivos). Luego la $C(+)$ = 15,5% y la $C(-)$ = 99,8%. Si en cambio de 1000 muestras 300 fueran positivas, el mismo ensayo tendría una $C(+)$ = 79,4% y una $C(-)$ = 95,5%.

El valor de corte o cut off del sistema debe elegirse de modo tal que minimice los resultados falsos, ya sean positivos o negativos. En muchos casos existe una zona de solapamiento en donde no puede establecerse con certeza si una muestra que cae en esa zona es negativa o positiva; en estos casos se elegirá un valor de corte de manera tal de tener más falsos positivos o falsos negativos, según que tipo de error produzca consecuencias menos graves.

La cuantificación emplea métodos específicos y sustancias de referencia certificadas así como estándares internos. Estos últimos son sustancias que deben poseer características físicas y químicas similares en lo posible al analito. Por este motivo, en los análisis por HPLC/MS son ideales las sustancias deuteradas de los analitos en estudio como estándares internos. Estos compuestos se deben añadir al principio del procesamiento de la muestra y siempre antes de someterla a una extracción con el objeto de evaluar la recuperación del método. Los marcadores que se añaden después de la extracción se conocen como patrones externos.

Una vez que se ha seleccionado un método analítico, deben seguirse ciertas etapas a los efectos de cumplir con los requisitos del control de calidad, que se ilustran en la Fig.11.

Linealidad: consiste en verificar que, en el patrón de calibración utilizado, la relación entre la respuesta, definida por el área o altura de los picos cromatográficos y la concentración, es lineal en el intervalo de concentraciones presentes en las muestras analizadas.

Sensibilidad: un método es sensible cuando cambios pequeños de concentraciones originan cambios significativos en la respuesta analítica. El límite de detección se define como la señal más baja del analito, expresada en concentración, que se puede diferenciar de un blanco analizado en las mismas condiciones. El límite de cuantificación es la concentración más baja que se puede determinar con seguridad y precisión aceptables y debe ser, al menos, dos veces el valor del límite de detección.

Recuperación: Se determina en una muestra a la que se le agrega patrones de concentración conocida del analito en cuestión y procesada con igual método analítico que el empleado en las muestras de concentración desconocida. Esta concentración obtenida se la relaciona con la obtenida a partir de un patrón puro que no ha sido sometido a ningún tratamiento.

Precisión: es una medida del error variable y se define como la concordancia entre medidas repetidas de la misma muestra. Existen dos tipos: intraensayo e interensayo, también conocida como reproducibilidad.

Seguridad o exactitud: es la medida del error sistemático y se define como la concordancia entre el valor medio medido y el valor de referencia aceptado.

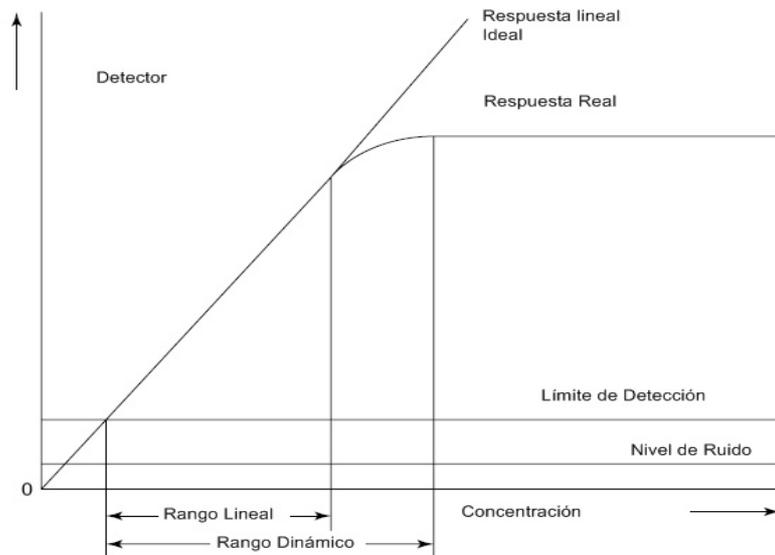


Fig. 1: Relación entre linealidad y respuesta lineal, límite de detección y nivel de ruido.

Siempre que no se utilice un método oficial de análisis, como los de la AOAC (Analytical Official Analysis Chemical), es conveniente validar el método usado. La validación es un proceso por el cual se evalúan las características de un método y se comprueba que las mismas cumplen una serie de requisitos preestablecidos. Es una parte muy importante del programa de garantía de calidad y permite asegurar que los resultados analíticos tienen la exactitud adecuada para su aplicación. Un objetivo deseable es que el método tenga una sensibilidad determinada y un rango de respuesta lineal determinado.

Control de calidad

Un laboratorio proporciona resultados epidemiológicos, de diagnóstico, terapéuticos, etc., en el ámbito clínico, laboral, legal, deportivo, etc., donde los posibles errores analíticos pueden influir enormemente en decisiones judiciales y/o analíticas. Por ello, las mediciones analíticas deben realizarse de forma tal que satisfagan un requerimiento acordado como ser un sistema de monitoreo que produzca resultados de alta calidad. También es necesario contar con un control de calidad que diseñe las actividades para proporcionar dichos resultados y por último una garantía de calidad que asegure que las actuaciones del control de calidad se ejecuten correctamente.

La garantía de calidad ha sido definida como "el conjunto de acciones realizadas para asegurar la fiabilidad de los resultados", e incluye todos los procedimientos cognoscitivos y mecánicos, diseñados para minimizar o identificar todas las fuentes de variaciones pre-analíticas, analíticas y post-analíticas, que puedan influir en la obtención de resultados de calidad analítica.

Basándose en la definición anterior, un laboratorio analítico debería realizar su propia garantía de calidad en tres niveles diferentes, que abarcaran todos los aspectos de sus actividades, incluyendo las funciones administrativas y que serían los siguientes:

Logístico-estructural: que incluye el espacio del laboratorio, reactivos, equipos, instrumentación, personal y los procedimientos de cadena de custodia.

Analítico-interpretativo: que incluye muestreo (recolección, selección y almacenamiento), preparación de la muestra, disponibilidad de materiales de referencia, selección del método analítico, revisión de los resultados por personal especializado y formatos del informe.

El Control de Calidad provee un medio para detectar errores inaceptables en el caso que surjan evitando la entrega de resultados inexactos. Además genera información que puede ser usada para recuperar o rastrear datos. En el caso que surjan errores, ofrece un medio para identificar la causa y la manera de tomar medidas para solucionarlos. El control de calidad incluye controles de calidad internos y la participación en controles de calidad externos para comprobar la efectividad de la garantía de calidad.

El control de calidad interno en laboratorios analíticos es la verificación final de la correcta ejecución de todos los procedimientos (incluyendo la calibración) que están descritos en el protocolo analítico y de todas las medidas a tomar para asegurar las buenas prácticas de laboratorio. Se lleva a cabo incluyendo materiales de referencia especiales, llamados "materiales de control" en la secuencia analítica. Los materiales de control deben ser en lo posible representativos de los materiales que se están ensayando en lo respecta en la composición de la matriz, el estado físico de preparación y del intervalo de concentración del analito. Tanto los materiales de control como aquellos usados para las calibraciones deberán ser trazables a materiales de referencia certificados o por lo menos a un método de referencia reconocido.

Las instalaciones del laboratorio deben ser tales que permitan la producción de datos analíticos de alta calidad y han de estar dirigido por una persona adecuadamente calificada, que organice la parte científica y al mismo tiempo sea capaz de aplicar técnicas de administración de personal y, finalmente, el equipo técnico integrante debe poseer adecuada educación profesional y entrenamiento y entender la importancia del programa de calidad y el papel que cada empleado desempeñe en él.

La adecuada elección, recolección y envío de las muestras resultan ser muy importantes en un análisis, ya que la calidad de un resultado nunca puede ser mejor que la de la muestra. Deben proporcionarse instrucciones detalladas a todas las agencias y entidades que trabajen con el laboratorio, que deben incluir el tipo y la cantidad mínima de muestra requerida, el tipo y cantidad de conservante que se debe añadir, instrucciones para el adecuado etiquetado de los contenedores, así como las condiciones para el empaquetado y transporte. Debe existir una cadena de custodia, reflejada en una documentación que debe acompañar a las muestras desde el lugar de recogida hasta el laboratorio junto con la petición del análisis.

La cadena de custodia debe empezar en el momento de la toma de muestra, debiendo quedar recogida en la documentación cualquier manipulación o transporte desde un individuo o lugar a otro, al tiempo que se debe intentar minimizar en lo posible el número de personas que manipulen la muestra.

Antes de emitir el informe, todos los datos analíticos deben ser revisados por una persona con capacidad científica y con experiencia en los métodos analíticos empleados. La revisión debe incluir, al menos, documentación sobre la cadena de custodia, validez de los datos analíticos cualitativos y cuantitativos (cromatogramas de la muestra, de patrones y de un blanco) y datos del control de calidad. Por último se emitirá un informe escrito que presente los resultados del análisis y toda la información relevante de forma clara, exacta y sin ambigüedades (International Standards Organization, 1982).

Además es necesario disponer de un archivo de registros, que documente las actividades y operaciones llevadas a cabo y que incluya una copia del informe, datos de la cadena de custodia, hojas de trabajo, datos de laboratorio y registros de los análisis de garantía de calidad y de los controles de calidad. Todo esto debe ser lo más claro posible de manera que nos permita seguir todos los pasos del análisis y sacar conclusiones en caso de desviaciones. Se deben guardar durante un tiempo, que depende de las normativas gubernamentales, pero que, en general, es como mínimo de cinco años y tienen, por tanto, un valor potencial a largo plazo, sobre todo en los análisis toxicológicos que puedan estar envueltos en litigios, especialmente cuando los juicios se celebran años después de haber emitido el informe.

Los laboratorios que realicen análisis de toxinas en aguas de consumo deberían estar acreditados, como ya se exige a los centros de control antidoping o a los que hacen análisis de drogas en el ambiente laboral en algunos países. Esta acreditación permitiría la autorregulación para asegurar la fiabilidad de nuestros resultados, reduciría el potencial para trabajos incompletos o imperfectos y ayudaría a establecer argumentos razonables cuando nuestro trabajo pudiera ser juzgado.

6. 2. Métodos Analíticos utilizados en la Determinación de Toxinas

Métodos Cromatográficos

Métodos Enzimáticos

Métodos Espectrofotométricos

Métodos Inmunológicos

6. 2. 1. Métodos Cromatográficos

Según define la IUPAC, la cromatografía es un método, utilizado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los mismos se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel.

Usualmente, cuando se aplica a la determinación de ficotoxinas, la forma de cromatografía compatible con la estabilidad física y química de las mismas es la cromatografía líquida, siendo predominantemente utilizada la variante conocida como cromatografía en fase reversa. Esta puede ser utilizada para una gran variedad de compuestos orgánicos, no iónicos, ionizables e iónicos, con la apropiada elección de aditivos en las fases móviles, dentro de las limitaciones de los pKa y de pH.

Además de esta versatilidad, ofrece la posibilidad de inyección de muestras acuosas, considerada inicialmente como una gran ventaja y de distintos sistemas de detección tales como ultravioleta-visible, fluorescencia (natural o a través de la formación de derivados pre o post-columna), electroquímico, etc.

Un cromatograma está compuesto por una serie de picos, donde cada pico determina la presencia de por lo menos una sustancia, y el área inscripta por debajo del mismo es proporcional a la cantidad de dicha sustancia en la muestra inyectada (Fig. 2). Para *identificar* presuntivamente una sustancia se usa un parámetro llamado tiempo de retención (t_r) que es constante para cada sustancia en determinadas condiciones, y se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el mo-

mento en que se detecta su mayor concentración (ápice del pico). También puede usarse el tiempo de retención relativo, que es el tiempo que tarda en eluir una sustancia de la columna, con respecto al tiempo que tarda una sustancia x en el mismo sistema.

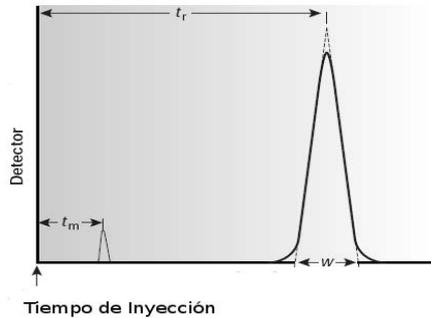


Fig. 2: Relación entre el tiempo de retención del analito (t_r) y el tiempo muerto (t_m). W , el ancho en la base del pico está relacionado con el área del pico, el cual se correlaciona con la cantidad de analito que pasa por el detector.

Un cromatograma debe reunir ciertas características tales como proveer de una adecuada separación entre el pico del analito y los demás componentes presentes en la muestra. La separación entre dos picos adyacentes se define mediante un parámetro analítico denominada resolución, el cual toma en consideración la máxima superposición admisible entre dos picos adyacentes.

Cromatogramas: el primer cromatograma en la Fig. 3 muestra dos picos superpuestos, que no pueden ser integrados para calcular su área. El segundo es un ejemplo de picos bien resueltos.

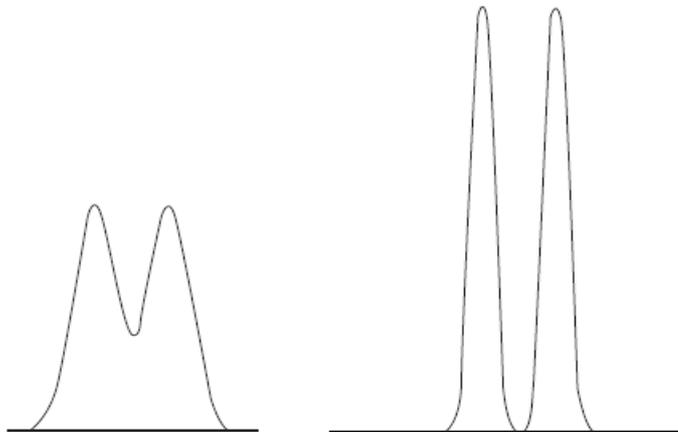


Fig. 3: dos cromatogramas con picos mal resueltos (izq) y bien resueltos (der).

Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

En este sistema cromatográfico la fase móvil es un líquido. Se puede utilizar para la separación de cualquier compuesto orgánico ya que la técnica por HPLC no está limitada por la volatilidad ni la estabilidad térmica del analito.

Se aplica, por ejemplo, para la separación, identificación y/o cuantificación de productos farmacéuticos, extractos vegetales, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, polisacáridos, pigmentos, metabolitos animales o humanos, etc.

Las siglas iniciales de HPLC se debieron a “High Pressure Liquid Chromatography” pero dado que la presión sólo constituye una herramienta que fuerza a la fase móvil a atravesar la columna, sin constituirse en sí misma en una variable del sistema, se buscó darle otro significado a las ya tan conocidas siglas, resultando en “High Performance Liquid Chromatography”.

Los principales componentes de un cromatógrafo líquido (Fig. 14) son la fase móvil contenida en un reservorio, el cual llega a la bomba que suministra un flujo continuo y constante y alcanza la columna, pasando previamente por la válvula de inyección. La Fase Móvil (FM) atraviesa la columna y finalmente llega al detector, luego de lo cual pasa por una válvula que permite su colectado o bien su descarga.

1) Reservorio de solventes: es el recipiente que contiene la fase móvil (cualquier frasco de vidrio o polímero resistente, de buena calidad, con tapa). En general se ubica por encima del nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo las conexiones llenas. La FM debe ser de calidad cromatográfica, es decir, libre de sustancias orgánicas y de partículas mayores de $0,22\ \mu\text{m}$. En el extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero que impide el ingreso de partículas a la bomba.

2) Bomba: impulsa la fase móvil desde el reservorio de solvente al inyector y de allí a la columna. Las más usadas son las bombas de pistón. Para cubrir el amplio rango de compuestos a separar se han propuesto eluciones en gradiente, es decir, se varía la composición de la FM (porcentajes de los solventes) comenzando la elución con un solvente débil y aumentando progresivamente la proporción del solvente “fuerte”. Para formar estos gradientes se emplea generalmente una bomba y válvulas solenoides que entregan cada solvente en una cámara de mezclado de pequeño volumen; la fase móvil formada en cada instante es entregada a la bomba.

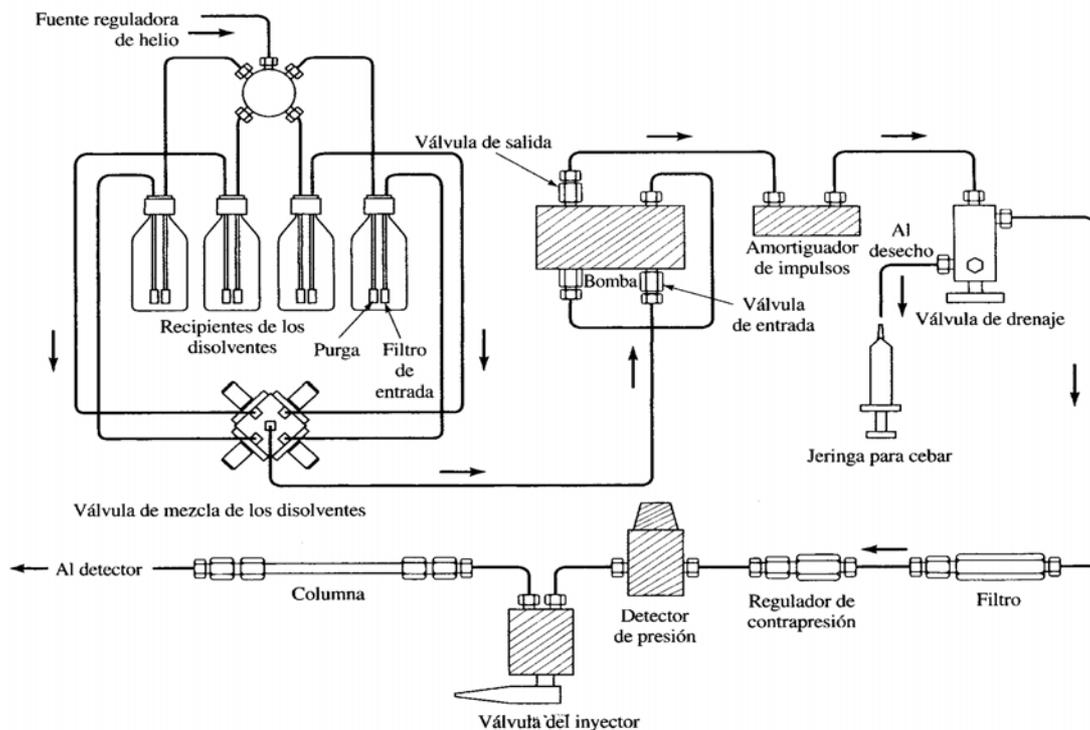


Fig. 4. Esquema de los componentes de un cromatógrafo líquido.

3) Inyector: es una válvula que permite la introducción de la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra para evitar que precipiten dentro del equipo. Las muestras y los estándares a inyectar deben estar totalmente libres de partículas en suspensión, ya que pueden rayar los sellos del inyector o bloquear tuberías. Para ello se utilizan filtros desmontables o fijos de 0,22 a 0,45 μm .

4) Columna Cromatográfica: en general es de acero inoxidable, de 25 a 30 cm de longitud y 2 a 4 mm de diámetro interno, aunque en la actualidad existe variedad en el tamaño y material (columnas de acero recubierto con vidrio, plásticas, etc.).

Las Fases Estacionarias (FE) utilizadas en HPLC tienen un tamaño de partículas muy pequeño (5 - 10 μm) para favorecer la interacción entre las moléculas de muestra y la FM y aumentar de este modo la eficiencia en la separación de los componentes. Además la cantidad de FE es baja, lo que disminuye el tamaño de las columnas y los tiempos de corrida.

El mecanismo más común, es la cromatografía en fase ligada (Fig. 5). Las FE involucradas se denominan fases químicamente unidas (BPC), tienen sílica como soporte, y diferentes grupos químicos unidos a sus grupos silanoles. Son muy variables en cuanto a polaridad y selectividad de acuerdo al "líquido" unido a la sílica: C_{18} (octadecilsilano), C_8 (octilsilano), C_2 (dimetilsilano), CN (nitrilo), NH_2 (aminopropil), diol.

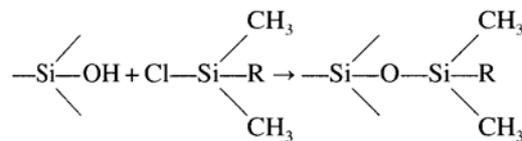


Fig. 5: Fases químicamente unidas

Las más utilizadas son las de C_{18} y C_8 , de baja polaridad que utilizan como fase móvil mezclas de agua (o soluciones salinas, buffers) con solventes orgánicos polares (por ejemplo, acetonitrilo, metanol). Existen otros tipos de FE, como las basadas en la adsorción, en el intercambio iónico, y en la exclusión molecular.

5) Detectores: los *detectores generales* miden el cambio de alguna propiedad física de la FM que contiene al analito en comparación con la FM pura, por ejemplo, el detector de índice de refracción. Los *detectores selectivos* son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo, el detector UV que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una dada longitud de onda; el detector de fluorescencia empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico (ya que HPLC también puede recurrirse a la derivatización) y el detector electroquímico, empleado en la detección de analitos capaces de oxidarse o reducirse ante la aplicación de un potencial.

6) Sistema electrónico de amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector y registrador de la misma.

A estas mejoras en la separación se ha unido la generalización del uso del detector de fotodiodos (Diode Array Detector, DAD) que posibilita la obtención de datos del espectro UV durante el tiempo de cromatograma y la detección de impurezas, aplicando el análisis multicomponentes para efectuar análisis cuantitativos válidos independientemente de la resolución o anchura de pico. Es muy versátil y ofrece importantes ventajas, comparado con el detector UV convencional, en el barrido de muestras des-

conocidas. Otros tipos de detectores (fluorescencia, electroquímico) más sensibles y específicos, no se utilizan en barridos de muestras desconocidas ya que suelen necesitar derivatización y no suelen permitir eluciones en gradiente.

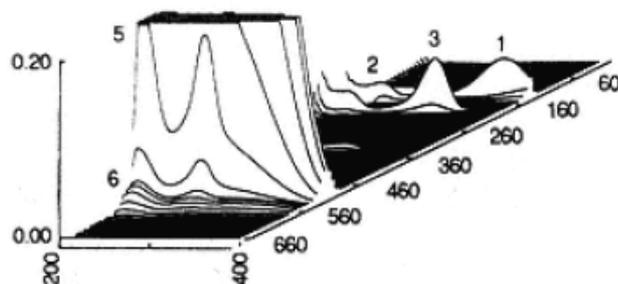


Fig. 6: Cromatograma en representación tridimensional mostrando el espectro entre 200 y 400 nm de cada pico eluido.

Sin embargo, a pesar de las purificaciones cuidadosas ciertas interferencias pueden inducir a resultados falsos positivos o impedir una apropiada identificación y cuantificación de los compuestos de interés, además de la limitada especificidad del espectro UV y su variabilidad en función del pH. Por esas razones el acoplamiento entre HPLC y espectrómetro de masas resulta la combinación más prometedora. La interfase ha sido siempre el punto débil en dicho acoplamiento ya que tiene que eliminar la fase móvil y transformar las moléculas, disueltas en dicha fase móvil, en iones en fase gaseosa, sin degradación térmica. Se han usado diferentes tipos de interfases, analizadores de masas y modos de detección. Sin embargo, la bibliografía más reciente en toxicología analítica se centra en aquellas que utilizan ionización a presión atmosférica y química, electro spray en combinación con detector de espectrometría de masas o tandem masa-masa. Ambas interfases suelen ir instaladas en el mismo instrumento y pueden seleccionarse indistintamente.

La combinación de la versatilidad de la separación por HPLC con la selectividad de la detección por espectrometría de masas, con interfases a presión atmosférica, tendrá que salvar los obstáculos que todavía limitan su aplicación, especialmente en lo que respecta a la reproducibilidad de los espectros de masas, condiciones de ionización estandarizadas, y estudios sistemáticos, decisivos para ser técnica de identificación en toxicología. Otro factor limitante es su alto costo de adquisición y mantenimiento aunque bajará e indudablemente se harán más pequeños y de más fácil manejo. Sin embargo su introducción en el análisis toxicológico ha abierto nuevas perspectivas de determinación simultánea de grupos de compuestos no derivatizables y metabolitos polares.

Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas es una poderosa técnica analítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar materiales conocidos y elucidar las propiedades químicas y estructurales de las moléculas.

La muestra, puede ser un sólido, líquido o vapor pero el espectrómetro de masas, requiere que la muestra sea transformada en un gas. Por ello en el primer paso la muestra es introducida dentro de la cámara de vacío y luego ionizada en la fuente de

iones. Los iones, los cuales están en fase gaseosa, son distribuidos en el analizador de masas de acuerdo a su relación masa / carga (m/z) y luego colectados por el detector.

En el detector, los iones generan una señal eléctrica proporcional a su número. El sistema de datos registra estas señales eléctricas y luego las convierte en el espectro de masas. Un espectro de masa es un gráfico de la abundancia de iones versus la relación masa-carga. Los iones y sus abundancias sirven para establecer el peso molecular y la estructura de los compuestos que están siendo analizados.

Un simple compuesto puede generar varios fragmentos. Dos compuestos ionizados simultáneamente crean un espectro solapado o superpuesto. Entonces para obtener el espectro de masa de un compuesto, las mezclas de compuestos deben ser separados en sus componentes individuales previamente al análisis por espectrometría de masas. La Cromatografía gaseosa es ampliamente usada con este fin, de modo que los compuestos separados en fase vapor, entran al espectrómetro y son analizados secuencialmente. Más recientemente Cromatógrafos líquidos, Cromatógrafos de fluidos supercríticos y equipos de electroforesis capilar han sido conectados a un MS.

Como se mencionó anteriormente, los procesos que ocurren en un espectrómetro de masas son: ionización, distribución de las masas y detección.

Ionización

Los dos métodos de ionización más usados son el impacto electrónico y la ionización química. El impacto electrónico es un proceso físico donde se transfiere energía mediante la colisión de electrones con las moléculas de la muestra en fase gaseosa. Debido a que la energía de los electrones de bombardeo es generalmente mucho más grande que la de las uniones moleculares cuando ocurre la interacción las uniones se rompen y se forman fragmentos iónicos. Los iones negativos formados y los electrones son atraídos por un cátodo cargado positivamente o una trampa de electrones. Las moléculas y fragmentos neutros que no son ionizados son bombeados lejos. Los iones positivos son impulsados dentro del analizador y enfocados hacia un sistema de lentes.

La energía empleada en la ionización electrónica puede conducir a una fragmentación excesiva, dejando poca o ninguna traza del ión molecular. En ausencia de un ión molecular, el peso y la estructura no son fáciles de determinar. Esto ha conducido al desarrollo de técnicas de ionización de baja energía, como la ionización química. En esta técnica, se producen iones por un proceso relativamente suave de transferencia de protones cuando la muestra se mezcla con un exceso de reactivo gaseoso ionizado como metano, isobutano, amoníaco, etc. Los iones originados tendrán una unidad de masa mayor.

Actualmente existen otros métodos de ionización, conocidas como técnicas de ionización-desorción, cuya gran ventaja es que pueden aplicarse a moléculas frágiles o no volátiles.

Distribución de masas

Los tres analizadores más ampliamente utilizados son: sectores magnético y eléctrico, cuadrupolos y trampa de iones. Otros dos están siendo usados con mayor frecuencia en laboratorios de investigación: Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) y el tiempo de vuelo (TOF).

Los espectrómetros de masa pueden operar en dos modos diferentes, el registro total o "*full scan*" y el de iones seleccionados "*selected ion monitoring*" (SIM). En la modalidad de registro total, el espectrómetro barre todos los iones presentes dentro de un rango de valores masa/carga, que normalmente oscila entre 40 y 650. En la modalidad SIM, el instrumento se prepara para detectar únicamente un ión (*single ion monitoring*) o varios iones (*multiple ion monitoring*) de abundancia relativamente grande, o de relación masa / carga significativa en el espectro de masas del compuesto de interés, resultando un cromatograma que responde sólo a compuestos en cuya fragmentación estén presentes los iones seleccionados.

La ionización mediante impacto electrónico usando la modalidad de full scan es la de mayor aplicación en el campo toxicológico, ya que el espectro de masa o patrón de fragmentación obtenido en estas condiciones, es como una huella dactilar, que contiene suficiente información para caracterizar la molécula, permitiendo confirmar su identidad, o en el caso que esta se desconozca buscarla en las librerías de espectros de referencia que estén disponibles.

Interpretación de los resultados:

La obtención de los espectros de masas representa la etapa final en la determinación exacta de la variante de toxina involucrada, sin embargo, el costo de los equipos restringe su uso a centros de referencia.

La cromatografía líquida de alta performance aplicada a la determinación de ficotoxinas provee al analista de una conveniente herramienta de identificación presuntiva y de cuantificación. Debe señalarse, sin embargo que la identificación mediante un tiempo de retención y la detección mediante absorción UV (detector UV tradicional o arreglo de diodos) resulta insuficiente, debiendo confirmarse el resultado mediante espectrometría de masas en un centro de referencia. La aplicación del arreglo de diodos junto a la utilización de un componente de referencia permiten una identificación más exacta.

El HPLC utilizado en conjunción con un detector de masa se considera el método de elección para la identificación definitiva de una toxina. Aún con este avance, ficotoxinas relacionadas estructuralmente producen espectros de masas muy similares. Estas pequeñas diferencias sólo pueden resolverse con la aplicación de espectrometría de masas en tándem.

La buena práctica en el laboratorio debe incluir un sistema de control de calidad con comprobaciones diarias de corridas blanco, control de los tiempos de retención de estándares, sensibilidad dentro de los límites requeridos y cálculo del factor de recuperación con muestras blanco con agregados conocidos de toxinas.

Extracción en Fase Sólida (SPE)

La extracción en fase sólida aplica los principios de la cromatografía líquida para capturar un analito sobre un sólido sorbente desde una matriz líquida para concentrarlo, purificarlo o realizar un cambio de fase previo a su análisis. Los analitos, solvatados en un solvente débil como el agua, son atrapados mediante sorción bajo condiciones que favorezcan un elevado factor de capacidad. Así concentrados sobre la fase sólida son eluidos mediante un pequeño volumen de un solvente fuerte.

Las columnas de SPE contienen un empaquetamiento de sílica químicamente enlazada a distintos sustituyentes, de modo tal que se aprovechan las interacciones polares, no polares o basadas en intercambio iónico entre los componentes de la muestra, el adsorbente sólido y el eluyente apropiado.

Las columnas de SPE (Fig. 7) permiten aislar compuestos de interés a partir de una matriz biológica compleja o que contiene sustancias interferentes, en alto grado de pureza y con un alto porcentaje de recuperación. Sin embargo el principio de extracción es muy diferente al de la extracción líquido – líquido. Las columnas se elaboran en polipropileno para asegurar su inercia química. En su parte inferior se coloca el relleno, comprimido suavemente entre dos fritados de micro-fibra de vidrio, químicamente inertes. En su parte inferior la columna se estrecha, ajustándose en el adaptador individual que forma parte de la tapa del sistema extractor.



Fig. 7: Columnas SPE

Un sistema extractor clásico (Fig. 8) consta de una cámara de vidrio transparente de forma rectangular, con tapa que permite asegurar el vacío en el interior del sistema. En uno de los costados lleva un tubo de salida, una válvula de regulación de vacío y un manómetro.

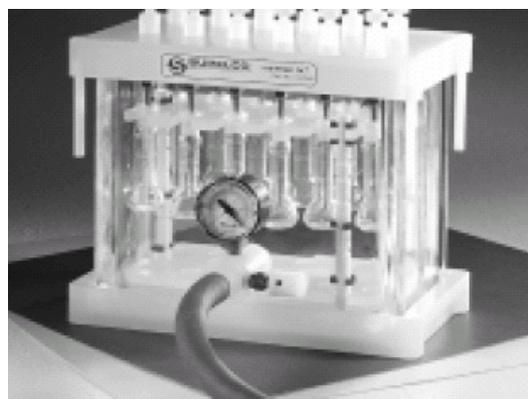


Fig. 8: Cámara de vacío para SPE

La extracción en fase sólida está cada vez más extendida, pues proporciona una extracción más rápida y selectiva y requiere menores volúmenes de disolvente orgánico. La utilización de sílice ligada para la extracción de muestras parte de su empleo en HPLC. La mayoría de las fases ligadas disponibles comercialmente son tipo siloxano, se preparan por reacción de los grupos silanoles libres del gel de sílice microparticulado con un modificador, lo que ha permitido desarrollar distintos tipos de fases estacionarias que pueden clasificarse según el grupo funcional en no - polares, polares o de intercambio iónico.

A finales de los 80 se desarrollaron las llamadas fases de función mixta, en las que parte de los grupos silanoles se han hecho reaccionar con cadenas alquílicas de longitud intermedia y otra parte con sustituyentes que permiten el intercambio catióni-

co, por lo que se pueden dar interacciones de tipo polar y apolar. La aparición de este tipo de columnas ha permitido que la extracción en fase sólida, que en principio se utilizó únicamente para la extracción de compuestos concretos o familias de compuestos, se esté aplicando de forma generalizada para todo tipo de muestras. Las fases mixtas son capaces de retener a un pH adecuado a las sustancias ácidas y neutras por interacciones hidrofóbicas con las cadenas alquílicas y a las sustancias básicas por interacciones con los grupos de intercambio catiónico. La elución diferencial se lleva a cabo por el ajuste adecuado de pH y la elección correcta del disolvente. En caso de muestras especialmente sucias se pueden utilizar secuencialmente dos columnas, con fases iguales o diferentes, para primero eliminar interferencias como grasas o pigmentos biliares y proceder después a la extracción propiamente dicha.

Los factores críticos a tener en cuenta al afrontar una extracción en fase sólida una vez establecido el procedimiento son el ajuste del pH, la velocidad de flujo en las distintas etapas y el control de los tiempos de secado. También hay que tener en cuenta que pueden existir variaciones en la manufactura de las columnas de un mismo o diferente lote comercial, que puede ser la causa de variaciones en los rendimientos. De ahí la importancia del empleo de un estándar interno adecuado.

Recientemente se ha dado un paso más en la extracción en fase sólida, son los discos de extracción en fase sólida, cuya principal ventaja es la reducción en el volumen de muestra y de disolvente. Se han publicado los primeros trabajos sobre la aplicación de estos discos a la sistemática analítica toxicológica de muestras de orina con resultados satisfactorios.

En la microextracción en fase sólida los analitos son adsorbidos directamente desde la muestra a una fibra de sílice fundida ligada químicamente con la fase estacionaria apropiada. La fibra está incluida en el émbolo de una jeringa especial. Para que se produzca la adsorción la fibra entra en contacto con la muestra, directamente o con el espacio en cabeza, durante el tiempo adecuado y a la temperatura que se establezca como óptima. Los analitos se desorben mediante un solvente fuerte en el loop de inyección del cromatógrafo líquido. Esta conexión con la cromatografía líquida de alta resolución abre el campo de aplicación de este tipo de extracción.

Aunque hoy en día su aplicación se limita a familias concretas de compuestos, mencionaremos también la extracción por inmunoadsorción. Se basa en la interacción selectiva entre el anticuerpo y el analito por lo que permite una extracción altamente selectiva, aumentando la sensibilidad y la recuperación. No es necesario el pretratamiento de la muestra para la liberación de los conjugados y permite la inyección directa en HPLC.

La SPE ha eliminado la necesidad de manejar grandes volúmenes de solventes orgánicos. Permite al analista la capacidad de obtener muestras en el campo. Debido a que grandes volúmenes de muestras acuosas pueden ser pasadas a través de un cartucho de extracción en fase sólida, esto elimina la necesidad de transportar litros de líquidos en botellas de vidrio hasta el laboratorio de análisis. En cambio, el analista sólo necesita transportar pequeños cartuchos de SPE.

La formación de emulsiones, la cual es uno de los mayores problemas de la extracción líquido líquido en muestras biológicas, es rara vez un problema. La reducción de solvente orgánico necesario minimiza la exposición a solventes peligrosos. Los cartuchos están contruidos con polipropileno del tipo utilizado en medicina, por lo que las posibles contaminaciones derivadas de material de vidrio mal lavado es improbable.

La adsorción de los analitos desde una matriz acuosa requiere de varias etapas, incluyendo la activación del sorbente – etapa usualmente denominada acondiciona-

miento – la adición de la muestra, lavado, secado y elución. La figura 6 muestra el procedimiento esquemáticamente. En este caso particular, el sorbente de fase reversa es primero acondicionado con el solvente de elución (hexano), seguido por el solvente de lavado (metanol) y el solvente del analito (agua). La muestra es aplicada lentamente y el agua que atraviesa el lecho del cartucho es descartada.

El cartucho es lavado con metanol y finalmente eluído con hexano. El acondicionamiento del sorbente asegura la máxima interacción entre el sorbente y los analitos en la fase acuosa. Típicamente, se requieren de 5 a 10 ml de solvente de elución para una elución completa. La adición de la muestra puede realizarse forzando el líquido a través de la columna de extracción. En orden a incrementar la eficiencia de adsorción del sorbente, las interacciones entre el analito y el agua deben debilitarse. Usualmente, esto puede hacerse incrementando la fuerza iónica de la matriz acuosa, con el agregado de sales como sulfato de amonio o cloruro de sodio.

6. 2. 2. Métodos enzimáticos

Las proteínas con capacidad para aumentar la velocidad de una determinada reacción química se denominan enzimas. Los métodos enzimáticos son aquellos en los cuales, la adición de la enzima a la muestra produce directa o indirectamente la aparición de un producto medible. En los métodos enzimáticos denominados cinéticos se mide la velocidad de la reacción mediante la medida de la variación de la absorbancia en el tiempo y esto se relaciona con la concentración. Es una medición continua, a diferencia de la del punto final, se mide en tiempos regulares. Se puede medir la cantidad de sustrato no transformado ó la cantidad de producto formado.

Lo más frecuente es que se utilicen reacciones de primer orden que se caracterizan por presentar curvas de concentración frente al tiempo lineales. Se produce una variación de la Absorbancia en el intervalo de tiempo que es directamente proporcional a la concentración inicial de sustrato si se mantienen constantes los tiempos de medida.

Las reacciones enzimáticas están basadas en la Ley de Acción de Masas o Equilibrio de las Reacciones, que sigue el siguiente esquema: las enzimas (E) reaccionan ofreciendo su sitio activo al sustrato (S) con el cual se acoplan y forman un complejo (ES), donde el enzima actúa con gran rapidez hasta liberar el producto transformado (P). El enzima no se altera, quedando libre para volver a fijar otra molécula de sustrato. Si mantenemos constantes las condiciones de la reacción (pH; temperatura; cofactores y la concentración de la enzima) la velocidad aumentará a medida que aumente la concentración del sustrato, hasta que llegemos a un punto en el cual se alcanza la Velocidad Máxima (Vmax) y a partir del cual la velocidad es constante. Aunque sigamos aumentando la concentración del sustrato, como la enzima está saturada, la velocidad deja de aumentar:



Ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S_0]}{K_M + S_0}$$

Donde v_0 es la denominada velocidad inicial, es decir la velocidad de reacción cuando la concentración de sustrato es muy grande (usualmente mayor a $6 K_M$). V_{\max} es la velocidad máxima de catálisis en condiciones saturantes de sustrato. S_0 es la concentración de sustrato a tiempo cero. K_M es la denominada constante de Michaelis-Menten. Es la concentración de un sustrato en moles/L con la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Es característica de cada enzima con su sustrato a una temperatura y composición del buffer de reacción determinadas y nos da información de la afinidad que tiene el enzima por su sustrato.

Cinética de primer orden: se habla de cinética de primer orden cuando las concentraciones de sustrato son bajas y, por lo tanto, la velocidad es una función lineal de la cantidad de sustrato.

Cinética de orden cero: se habla de cinética de orden cero cuando la concentración de sustrato es muy alta y, por lo tanto, la velocidad es independiente de la concentración de sustrato.

Para una K_M alta, la mitad de la V_{\max} se alcanzará con una concentración de sustrato alta, y la velocidad de la reacción es lenta.

Para una K_M baja, la velocidad de la reacción es rápida porque con una concentración baja se llega rápido a la velocidad máxima.

Por lo tanto, las determinaciones cinéticas de las concentraciones de sustancias requieren enzimas con constantes de Michaelis altas para que la velocidad de la reacción sea lenta, se tarde más en llegar a la velocidad máxima y podamos medir mayor cantidad de sustrato.

En el caso de las proteína-fosfatasas, estas actúan sobre un sustrato orgánico que lleva unido un éster del ácido fosfórico. La sustancia química o molécula biológica sobre la cual ejerce su acción se denomina sustrato. Las enzimas son muy sensibles a los agentes oxidantes, cambios de pH, iones metálicos que pueden tener una función activadora (en este caso lo denominamos *cofactor*) o inhibidora. Asimismo, otras sustancias pueden inhibir en forma reversible o irreversible la función de una enzima, tal es el caso de las microcistinas y nodularinas sobre las proteínas fosfatasas de las familias PP1 y PP2.

La acción de la enzima sobre el sustrato puede cuantificarse mediante el concepto de actividad. Esta puede definirse en función de la definición de la *unidad de actividad*: es la cantidad de micromoles de producto que son producidos por minuto y por ml a una temperatura específica y en un buffer de características determinadas. La actividad permite especificar la capacidad que tiene una mezcla de varias proteínas de catalizar una determinada reacción; así, no es necesario que la proteína se halle pura, siempre que no haya otras proteínas con la misma especificidad química que compitan por el mismo sustrato o posean igual producto final.

En ensayo para determinar la presencia de las microcistinas y/o nodularinas se sustenta en la actividad enzimática de la proteína fosfatasa 1A (*PP1A*) sobre el sustrato p-nitro fenol fosfato (Fig. 9). El producto de esta reacción, el p-nitrofenol, es de color

amarillo y su presencia puede ser analizada en un colorímetro sencillo o en un espectrofotómetro.

El ensayo se fundamenta en que el efecto inhibitorio de las microcistinas sobre la enzima PP1A es mayor cuando aumenta la concentración de toxinas en la muestra de agua bajo estudio.

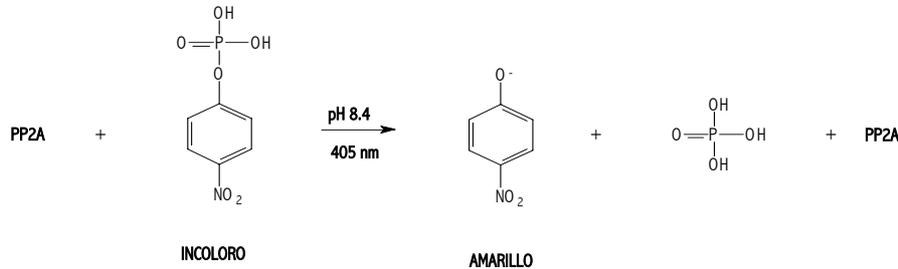


Fig. 9: Reacción entre el p-nitro fenol fosfato con la enzima PP2A.

Interpretación de resultados:

El procedimiento, si bien cumple en términos de sensibilidad con el propuesto por la OMS, debe ser considerado dentro de los métodos de screening, y bajo ningún concepto puede utilizarse para emitir un informe positivo de presencia de microcistinas en una muestra. Una situación más aceptable, desde el punto de vista químico, es el clean-up de la muestra mediante SPE y reanalizar la misma. Sin embargo, la medición se basa en la inhibición de la actividad de la enzima, la cual no distingue entre las más de 70 variantes de microcistinas conocidas, debiendo expresarse como equivalente a microcistina LR, debiendo ser confirmada mediante cromatografía líquida con arreglo de diodos al menos.

6. 2. 3. Métodos Espectrofotométricos

Cuando una partícula que se encuentra en estado de reposo o estado fundamental interacciona con un haz de luz, absorbe energía y se transforma en una partícula en estado excitado. La molécula absorbe la de la onda y aumenta su energía, y ese aumento de energía es igual a la energía de la radiación electromagnética absorbida ($E = h \cdot \nu$). La partícula en estado excitado tiende a volver de forma espontánea a su estado de reposo desprendiendo la energía absorbida en forma de calor. Cada especie absorbente, que recibe el nombre de cromógeno, tiene un determinado espectro de absorción. El espectro de absorción es un gráfico donde se representa en ordenadas la Absorbancia y en abscisas la longitud de onda. La medida de la cantidad de luz absorbida por una solución es el fundamento de la espectrofotometría de absorción.

Por eso es importante trabajar a la longitud de onda a la que la sustancia estudiada absorbe la mayor cantidad de luz (a mayor cantidad de luz, mayor cantidad de sustancia).

Leyes de Absorción

Cuando un haz de luz monocromática pasa a través de una sustancia, se registra una cierta pérdida de energía, debido a la absorción por parte de la sustancia. La relación entre la luz incidente y la luz transmitida se denomina Transmitancia:

$$\%T = (I_t / I_0) \times 100.$$

Se puede perder intensidad por la interacción con la cubeta o el solvente. Para evitar este error se hace una primera medida con una solución de referencia o BLANCO, que contiene todos los posibles compuestos que intervienen en la lectura menos el que vamos a medir. Todas las medidas que se hagan con posterioridad serán referidas a esta medida inicial y se harán en la misma cubeta que se utilizó en la medida del blanco. La relación entre la absorbancia y la transmitancia es la siguiente:

$$\text{Si el } \%T = 100 \quad A = 2 - \log T = 2 - \log 100 = 0$$

$$\text{Si el } \%T = 0 \quad \text{entonces} \quad A = 2 - \log 0 = 2$$

Ley de Beer

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración y al camino óptico de la radiación. La expresión matemática que rige esta relación cuantitativa es:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Siendo, **A**: absorbancia. Parámetro adimensional. **ϵ** : coeficiente de extinción molar. Es constante para un compuesto dado siempre que se fijen condiciones de longitud de onda, de pH, de temperatura, de solventes, etc. Sus unidades son 1/(mol/cm). **b**: es la longitud de paso de la luz, en cm, normalmente el valor es unitario. **c**: es la concentración del analito responsable de la absorción. Se mide en mol/L.

Conociendo la absorbancia de una sustancia podemos averiguar su concentración y esto se realiza usualmente a través de una curva de calibración: esta es la representación gráfica en un eje de coordenadas de la absorbancia (eje de ordenadas) frente a la Concentración (eje de abcisas). Se ensayan varias soluciones de concentración conocida y se determinan sus A, construyéndose la curva de calibrado, que es una recta. Una vez ensayadas las soluciones problemas, su concentración se averigua por interpolación de las A de las soluciones problema en la curva de calibración.

La aplicación de la Ley de Beer produce respuesta lineal en un intervalo de concentraciones que debe determinarse experimentalmente. Cuando la concentración del cromógeno sobrepasa los límites de linealidad se deja de cumplir la Ley de Beer, convirtiéndose la recta en una curva. La lectura de la absorbancia fuera de los límites de linealidad se traduce en una concentración falsamente baja de cromógeno. En esta situación, hay que diluir la muestra para que su concentración entre en los límites de la linealidad.

Se distinguen dos tipos de aparatos denominados Espectrofotómetro:

Fotómetro o Colorímetro: se caracterizan porque utilizan filtros que solo permiten el paso de un determinado ancho de banda que contiene a la longitud requerida.

Espectrofotómetros: utilizan monocromadores. Con ellos se obtiene un haz de luz monocromático cuya longitud de onda se varía a voluntad. Los monocromadores pueden ser de dos tipos: prismas y redes de difracción.

6. 2. 4. Metodos Inmunológicos

Los inmunoensayos se basan en la reacción específica que se produce cuando un antígeno se enfrenta con un anticuerpo. La técnica tradicional consiste en mezclar un volumen de muestra conteniendo la droga a ensayar, con una cantidad fija de un anticuerpo específico (monoclonal o policlonal) fijado en una policubeta, y una cantidad fija de la misma droga marcada sintéticamente con una enzima activa por ejemplo. De este modo se establece una competencia entre la droga marcada (*Droga**) y la presente en la muestra (*Droga*) por los sitios de unión del anticuerpo. En forma simple se esquematiza esta competencia:



La probabilidad de que una molécula marcada o sin marcar se una al anticuerpo depende de su concentración. Se requieren instrumentos capaces de evaluar el punto final de la reacción y comparar la respuesta del test contra estándares conocidos. De acuerdo al tipo de marca es el método analítico de medida empleado.

Cuando en algunos casos no puede diferenciarse la señal producida por el analito marcado unida al anticuerpo y el analito marcado libre, siendo necesario separarlas antes de efectuar la medida. Estos ensayos se conocen como *heterogéneos*, e involucran principalmente a los radioinmunoensayos. Cuando esta separación no es necesaria, porque la señal producida por el analito marcado se diferencia si está libre o unido, el ensayo se llama *homogéneo*. Esta diferencia ocurre porque la señal es suprimida, alterada o producida en la unión con el anticuerpo.

Los inmunoensayos ópticos (donde la señal medida es un cambio óptico, como absorbancia UV, fluorescencia o luminiscencia) pertenecen a este tipo. Pero esta ventaja se logra a costa de una menor sensibilidad debido a que la señal óptica es medida en presencia del fluido biológico original. Para aumentar la sensibilidad se crearon inmunoensayos ópticos heterogéneos.

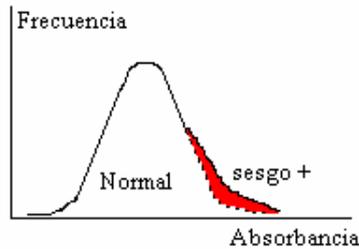
Los inmunoensayos ópticos (donde la señal medida es un cambio óptico, como absorbancia UV, fluorescencia o luminiscencia) pertenecen a este tipo. Pero esta ventaja se logra a costa de una menor sensibilidad debido a que la señal óptica es medida en presencia del fluido biológico original. Para aumentar la sensibilidad se crearon inmunoensayos ópticos heterogéneos.

Es importante definir dos parámetros para los ensayos inmunológicos: la sensibilidad y el límite de detección.

La *sensibilidad del ensayo* es el cambio en la respuesta por cada cambio en la cantidad de reactante. En un gráfico de dosis respuesta, la sensibilidad es la pendiente de la curva en un punto determinado; debido a que muchas veces las curvas dosis-respuesta son sigmoideas, la sensibilidad no es constante.

El *límite de detección* se define como la mínima cantidad de inmunorreactante que puede detectar el sistema. Un elemento esencial es establecer el valor de discrimi-

nación entre una muestra positiva y una muestra negativa. Este valor se denomina valor de corte o "cut-off". En los inmunoensayos, los sueros negativos muestran un comportamiento que se asemeja a una distribución normal, pero presentan un sesgo positivo o tendencia a producir valores de absorbancia o títulos más altos que los esperados si siguieran una distribución normal.



Puede calcularse el desvío standard, DS, como:

$$(DS)^2 = \frac{\sum(X_i - m)^2}{n - 1}$$

n: nº de sueros negativos analizados, m: media aritmética, X_i : absorbancia de cada suero

La sensibilidad de los inmunoensayos ópticos es comparable a la de Cromatografía Gaseosa. Sin embargo la especificidad es menor, ya que pueden existir reacciones cruzadas de los anticuerpos empleados, con sustancias que posean una estructura química similar a la del analito en cuestión. Además, como ciertos anticuerpos están destinados a la determinación de familias de fármacos, debe tenerse en cuenta que no todos los compuestos incluidos en la misma familia tendrán la misma reactividad con el anticuerpo.

De todos ellos el RIA posee el mayor límite de detección (del orden del picogramo/mililitro). Sin embargo posee algunas desventajas que han llevado a su reemplazo por alguno de los demás inmunoensayos (cuyos límites de detección están en el orden de los nanogramos/mililitro)

Los enzimoimmunoensayos más difundidos son el ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) y el EMIT (Enzyme multiplied immunoassay technique). El ELISA es un inmunoensayo enzimático competitivo y heterogéneo. La actividad enzimática se mide por la conversión catalizada enzimáticamente de un compuesto incoloro o no fluorescente en uno coloreado o fluorescente. Tiene el mismo fundamento que el RIA pero no utiliza marcadores radiactivos.

Método de ELISA para detección de Cianotoxinas

El principio por el cual es posible la detección de moléculas como las cianotoxinas mediante métodos inmunológicos es que los anticuerpos son capaces de reconocer es-

pecíficamente cualquier estructura química que pueda en cierto grado interaccionar con ellos.

Los inmunoensayos como herramienta analítica para el análisis de presencia de cianotoxinas y su cuantificación, poseen ventajas, ya que, son métodos de alta sensibilidad y especificidad, la muestra requiere menor pretratamiento, generalmente resultan baratos, permitiendo el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras y resultan simples y fáciles de instrumentar; pero también poseen sus desventajas, entre ellas mencionaremos en especial el efecto de la matriz, permite un ensayo por compuesto o grupo de compuestos.

Los ensayos de ELISA se desarrollaron como procedimientos para determinar un grupo de polutantes ambientales incluídas las toxinas algales. Los investigadores demostraron que es posible generar y obtener anticuerpos específicos contra moléculas de microcistina. Las microcistinas son moléculas pequeñas que por si mismas no son inmunogénicas por lo que, para lograr los anticuerpos específicos deben ser primero ser conjugadas a una proteína.

Existen distintos kits de ELISA comerciales disponibles en el mercado y en general los fabricantes proveen instrucciones detalladas para su uso. Ejemplos de los kits mencionados son:

EnviroLogix Inc. Pórtland, Me, USA

Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE, USA

Wako Chemicals, Osaka, Japón

Muchos han sido desarrollados a través de la conjugación con el residuo de ácido glutámico y reconocimiento principalmente del ADDA. Los resultados son generalmente expresados como $\mu\text{g/ml}$ de MC-LR que constituye el estándar del kit. Además estos kits operan con una sensibilidad que permite estimar la concentración de microcistinas por debajo del límite recomendado por la WHO ($1\mu\text{g/L}$). El límite de detección logrado con esta técnica es de $0,05\mu\text{g/L}$ sin preconcentración.

Los inmunoensayos de ELISA (Enzyme linked inmunoassay) no son un reemplazo de los métodos instrumentales pero constituyen una buena alternativa de screening para Microcistinas en muestras de agua.

La técnica de ELISA es una valiosa herramienta para realizar una estimación global de la presencia de microcistinas en muestras de agua. Sin embargo no es fácil relacionar el resultado obtenido a partir de esta técnica con la toxicidad de la muestra. La reacción cruzada que puede ocurrir con un grupo de microcistinas y nodularinas dependerá de la similitud estructural que presenten estas respecto de la microcistina (generalmente microcistina LR) que se utilizo para generar el anticuerpo específico utilizado en el kit de detección.

No todas las variantes de microcistina se detectan con igual sensibilidad. La similitud estructural que puede originar reacción cruzada no implica necesariamente una toxicidad similar. Dependiendo de la reactividad cruzada y de la toxicidad de una microcistina es que el ensayo de ELISA puede sobre estimar o subestimar la concentración de la toxina en términos de toxicidad equivalente de microcistina LR.

Para demostrar la verdadera ausencia de cianotoxinas debe demostrarse la ausencia de cianobacterias mediante técnicas de aislamiento a partir de muestras de agua. No obstante, se ha informado de la presencia de cianotoxinas en ausencia de

cianobacterias, así como se ha descrito la presencia de cianobacterias no productoras de toxinas, por lo que la presencia o ausencia de un aislamiento no es un elemento que permita descartar la ausencia de toxinas en el agua.

En el caso de moléculas pequeñas el formato de ensayo de ELISA es de competición. Existen muchos diseños de sistema de ELISA para la detección de microcistinas y nodularinas de los cuales vamos a describir el fundamento de los más utilizados en el mercado. El inmunoensayo para microcistina es un ensayo de directo de competición por el anticuerpo entre la microcistina libre (en la muestra) y la microcistina inmovilizada (adsorbida a la placa).

Para la determinación de microcistina se utiliza el ensayo inmunoenzimático por inhibición competitiva. La concentración de microcistina es inversamente proporcional a la intensidad de color obtenido.

Interpretación de Resultados:

Los métodos inmunológicos constituyen una alternativa válida para el screening de microcistinas, aunque sus resultados deben verificarse por un método cromatográfico. Asimismo, los kits comerciales se encuentran validados en una matriz determinada, por lo que no se aconseja utilizarlos en matrices diferentes.

6. 3. Validación de Métodos

Cuantificación mediante Cromatografía

La cuantificación mediante cromatografía – líquida o gaseosa – se realiza usualmente por uno de dos métodos: adición de un estándar interno o mediante una curva de calibración. A continuación veremos los cálculos y requisitos comunes a ambos métodos.

Exactitud

La exactitud se define como la cercanía del valor de una medida al verdadero valor. Este último suele definirse como el valor del analito que se agrega a una muestra que originalmente no lo contiene. Típicamente, la exactitud se determina mediante los llamados estudios de recuperación.

En cualquier método utilizado para medir un analito en una matriz compleja, debe realizarse un ensayo de recuperación agregando a la matriz utilizada el analito en forma pura en varios niveles de concentración, de forma de cuantificar la recuperación del método. En otras palabras, no debe asumirse que el 100 % del analito será recuperado de su matriz, en la práctica, la diferencia observada debe considerarse en la cuantificación final.

La recuperación de un analito debería testearse a niveles de un 50, 75, 100, 125 y 150 % de los niveles esperables – en el caso de la microcistina, 1 ppb -. El establecimiento de una línea de base que permita excluir compuestos que se superpongan en los métodos cromatográficos es indispensable: pueden existir sustancias interferentes en la muestra o en nuevo lote de reactivos (Ej.: contaminación con ftalatos).

Aplicada esta consideración a la determinación de toxinas en aguas, debe hacerse agregados de microcistina LR (por ejemplo) u otras toxinas, a muestras de agua de río que carezcan de la toxina, a varios niveles de concentración. Las muestras deben repetirse al menos por triplicado y someterse al proceso de análisis en la forma rutinaria. En base a la cantidad originalmente adicionada y a la medida por el método utilizado, podremos calcular el porcentaje de recuperación. Un método adecuado es relativamente insensible a los niveles de concentración del analito en cuestión.

Precisión

La precisión puede definirse como el grado de similitud entre análisis individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La precisión se determina mediante el cálculo del valor medio y la desviación estándar. Asociada a ambas, el cálculo del coeficiente de variación también resulta una medida útil para establecer el error aleatorio del operador. Para componentes minoritarios como las toxinas un coeficiente de variación de 10 % es aceptable.

Linealidad y Rango

La linealidad establece el rango de concentraciones en el cual el método produce una respuesta lineal. La linealidad se establece analizando una serie de muestras con concentraciones crecientes del analito bajo estudio, con el nivel esperado del mismo dentro del intervalo estudiado. Usualmente el grado de linealidad se analiza estadísticamente mediante el método de cuadrados mínimos. El rango son los extremos de concentración inferiores y superiores donde el método conserva características de linealidad, sensibilidad y especificidad.

Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Dos características importantes de un método son el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC). El límite de detección puede ser considerado como la cantidad más pequeña del analito que produce una respuesta detectable (típicamente 3 veces la línea de base). El límite de cuantificación suele fijarse como la menor concentración a la cual se obtiene la menor reproducibilidad, y se acepta un nivel de relación señal a ruido de 10 en la cual el coeficiente de variación es de 3 %.

Método del Estándar Interno

En cromatografía cuantitativa la mayor precisión se consigue agregando un estándar interno a los patrones y a las muestras. Esto permite que los mismos factores que afectan a la recuperación del analito a través de la extracción de la muestra, clean-up e inyección de la misma en el cromatógrafo.

Para poder aplicar el método, se requiere conocer primero, para una serie de muestras blanco (muestras que no contienen el analito), la relación de áreas del estándar interno y del analito. Para obtenerlas, adicionar a cada muestra de agua una cantidad constante y exactamente conocida del estándar interno y cantidades crecientes de las toxinas a medir. Una vez obtenido a partir de los cromatogramas el cociente de las áreas del estándar interno y de los analitos, graficarlos en función de la concentración del analito.

Aplicando el método estadístico de los cuadrados mínimos verificar el rango de respuesta lineal. Si el intervalo comprende el de las concentraciones esperadas (en el caso de las microcistinas, debe comprender la concentración límite de 1 ppb), no resul-

ta necesario trabajar rutinariamente con una series de muestras adicionadas, sino con un triplicado de muestras adicionadas al nivel de 1 ppb inicial.

La fórmula utilizada para el cálculo contiene el denominado factor de respuesta, que normaliza la diferente respuesta de diferentes concentraciones de analito (por ej: microcistina LR) y de estándar interno (por ejemplo, nodularina).

Fórmula de cálculo:

$$C_{\text{mic LR}} = m_{\text{NOD}} \cdot f_i \cdot A_{\text{mic LR}} / A_{\text{ST}}$$

donde: m_{ST} es la masa ($\mu\text{gr.}$) de nodularina utilizada como estándar interno, f_i es el factor de respuesta el cual está dado por la expresión $f_i = (W_{\text{mic LR}} \cdot A_{\text{Nod}}) / (W_{\text{Nod}} \cdot A_{\text{mic LR}})$. Las áreas se refieren a las obtenidas de un vial con una concentración conocida de microcistina LR y nodularina. $W_{\text{mic}} =$ masa de μg de microcistina. $C_{\text{NOD}} = 0,5 \text{ ppb}$, $C_{\text{mic LR}} = 0,5 \text{ ppb}$, las áreas son aquellas medidas en el vial f_i .

Preparación del f_i :

Medir 500 ml de agua que se ha comprobado que carece de toxinas, agregar 5 ml de estándar de nodularina 50 ppb y 5 ml de microcistina LR 50 ppb. Corregir por la dilución y calcular las concentraciones finales. Procesar estas muestras de agua como una muestra normal. Procesar el menos tres muestras, sobre todo después de cambiar lotes de columnas SPE, solventes de extracción y columnas cromatográficos.

6. 4. Elaboración del informe

Los resultados encontrados deben registrarse en una planilla indicando la fecha, el nombre del paciente y otros datos de información relevantes incluyendo el número y naturaleza de la muestra recibida para el análisis y el ensayo realizado. Asimismo, es importante considerar que un análisis en el cual no se detectan compuestos en agua, plasma, suero u orina u otro tipo de muestra, debe indicarse el límite de detección del método.

El informe deberá consignarse la sensibilidad y especificidad que serán obtenidas de bibliografía, y la precisión y exactitud de los mismos, es decir, el desenvolvimiento particular de la metodología, cuando corresponda. Debe ponerse atención entonces en los rangos de seguridad de los datos entregados y las cifras significativas con que se informan. También se anotarán posibles interferencias que podrían haber modificado los resultados.

Antes de emitir el informe, todos los datos analíticos deben ser revisados por una persona con capacidad científica y con experiencia en los métodos analíticos empleados. La revisión debe incluir, al menos, documentación sobre la cadena de custodia, validez de los datos analíticos cualitativos y cuantitativos (cromatogramas de la muestra, de patrones y de un blanco) y datos del control de calidad. Por último se emitirá un informe escrito que presente los resultados del análisis y toda la información relevante de forma clara, exacta y sin ambigüedades.

Es necesario disponer de un archivo de registros, que documente las actividades y operaciones llevadas a cabo y que incluya una copia del informe, datos de la cadena de custodia, hojas de trabajo, datos de laboratorio y registros de los análisis de garan-

tía de calidad y de los controles de calidad. Ello debe ser lo más claro posible de manera que permita seguir todos los pasos del análisis y elaborar conclusiones en caso de desviaciones. Se deben guardar durante un tiempo, que depende de las normativas gubernamentales, pero que, en general, es como mínimo de cinco años y tienen, por tanto, un valor potencial a largo plazo, sobre todo en los análisis toxicológicos que puedan estar envueltos en litigios, especialmente cuando los juicios se celebran años después de haber emitido el informe.

Tradicionalmente se han usado diferentes tipos de microensayos químicos que de forma presuntiva y rápida dieran información cualitativa sobre la presencia de tóxicos individuales, o de grupos y familias de medicamentos y drogas. Los resultados de estos ensayos y procedimientos, conocidos usualmente como "métodos de screening", debían ser confirmados por otras técnicas o procedimientos de mayor capacidad identificativa y que posteriormente, permitieran la correspondiente cuantificación. La evolución de estas técnicas ha llegado al actual auge de los inmunoensayos, que fundamentalmente están desarrollados para muestras líquidas con bajas interferencias de la matriz, tales como orina, aguas, sueros, etc.

Bibliografía

- The Supelco Guide to Solid Phase Extraction. Supelco, Inc. 1988.
- SOMENATH M. A. 2003. Sample Preparation Techniques in Analytical Techniques. ed. by John Wiley & Sons, Inc.
- SNYDER y KIRKLAND. 1979. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Ed. Wiley and Sons
- ROBERT E. 2003. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Ed. Ardey John Wiley & Sons
- LI C., YUAN-YUAN R., HSIENTANG HSIEH D. (2006). Enhanced LC-MS/MS method for microcystin-LR in lake water. J. of Mass Spectrometry Volume 41, Issue 2, 169–174
- termination of Peptide Hepatotoxins (Microcystin) Comparison of Methods the Determination of Peptide Hepatotoxin (Microcystins). 2001. Research Report 10.
- METCALF J., HYENSTRAND P., BEATTIE B. M. CODD G. A. 2006. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits, Department of Biological Sciences, University of Dundee, UK.
- MCELHINEY, J. LAWTON L. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. Toxicol Appl Pharmacol. 203(3) 219-30.
- BRENTON C. NICHOLSON, MICHAEL D. BURCH. 2001. Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines
- Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, 2001.

Capítulo 7:

Toma de muestra de agua en diferentes ambientes para determinaciones de algas y toxinas. Procedimientos analíticos. Métodos de detección de cianotoxinas

Darío Andrinolo
Ricardo Echenique
Daniela Sedan

7. 1. Introducción

Al enfrentarnos a un florecimiento de cianobacterias o a la sospecha de la existencia del mismo es de vital importancia adoptar una actitud preventiva, considerándolo como toxigénico hasta que podamos demostrar lo contrario.

Como primera medida se deberá realizar una correcta toma de muestra que garantice la representatividad del material recolectado, a partir del cual se podrán realizar estudios que permitan tanto identificar y cuantificar a las cianobacterias responsables del florecimiento, como detectar y cuantificar las toxinas presentes.

Así mismo, a efectos de confirmar o descartar la presencia de cianotoxinas en el cuerpo de agua en cuestión, es fundamental realizar un adecuado almacenamiento de las muestras para poder garantizar que los resultados que surjan del posterior tratamiento y análisis por técnicas analíticas y/o bio-analíticas de estas muestras reflejen en realidad lo que está ocurriendo en el cuerpo de agua que presenta el florecimiento.

Una vez obtenida la muestra se debe decidir cual será la mejor secuencia de procedimientos a realizar sobre el material recolectado a fin de llevar a cabo una correcta extracción y adecuación de la muestra, como paso previo al análisis de las mismas, para evitar la pérdida de toxinas por un manejo inadecuado de las muestras que en muchos casos puede ser de gran importancia.

El siguiente paso será realizar una cuidadosa selección de los métodos analíticos y/o bio-analíticos que se llevarán a cabo teniendo en cuenta características como:

Fundamento del método

Validez como método preliminar (Screening)

Selectividad

Especificidad

Sensibilidad

Duración del ensayo

Infraestructura necesaria

Disponibilidad de materiales

Costos

Ventajas y Desventajas del método

Consideraciones éticas

De esta manera podremos confeccionar una secuencia lógica de técnicas a realizar que nos permitirán optimizar los recursos disponibles y obtener en el menor tiempo posible, con los menores costos y con el mayor rendimiento, la mayor cantidad de información a partir de las muestras recolectadas.

Finalmente, una vez definido esto, se llevarán a cabo las técnicas seleccionadas que mejor se adecuen a las condiciones de cada laboratorio en particular. Con los datos obtenidos a partir de las mismas se podrá elaborar el correspondiente informe que indique el estado de situación, el cual servirá de base para realizar un correcto manejo del cuerpo de agua.

En este manual se presentan algunos métodos aplicables al muestreo y al análisis biológico y químico de cianobacterias y cianotoxinas. Este capítulo no intenta ser una compilación de métodos sino una guía para los técnicos y profesionales que deban trabajar con estos florecimientos.

Los protocolos que se presentan tiene como objetivo ser una guía para la acción de quienes se vean enfrentados a la necesidad de:

Detectar, cuantificar e identificar las especies de cianobacterias potencialmente tóxicas presentes en el ambiente.

Realizar un seguimiento de la presencia de cianotoxinas en el ambiente.

7. 2. Toma de Muestra

La toma de muestra, como en cualquier tipo de análisis que se quiera realizar, es uno de los pasos fundamentales de todo el proceso; ya que con un correcto muestreo se evitarán varios inconvenientes o incógnitas que pueden surgir más adelante, fundamentalmente en el momento de realizar los cálculos y el correspondiente informe.

Debemos plantear la toma de muestra teniendo en consideración todos aquellos detalles y cuidados que nos llevarán a obtener calidad y cantidad de muestra adecuada, así como ciertos parámetros que nos serán de gran utilidad al momento de evaluar los resultados.

Así, el proceso de toma de muestra dependerá de:

Objetivos del análisis.

Caso particular a ser estudiado.

Condiciones del ambiente.

Equipos disponibles.

7. 2.1. Toma de muestra de agua de río , lagos y lagunas

En general se podrán tomar dos tipos de muestras: cualitativas, como las extraídas con frasco o red, que serán útiles para identificar organismos presentes o realizar ensayos ratón; y cuantitativas, como las tomadas con botella Van Dorn las cuales nos proporcionan una muestra representativa de la columna de agua que será útil para de-

terminar la densidad celular, relación porcentual de las distintas especies en la muestra, clorofila, toxinas, nutrientes (nitratos, fosfatos, etc).

Además de realizar correctamente la toma de muestra es importante llevar un cuidadoso registro de las características y parámetros determinados *"in situ"* en cada punto de muestreo.

Para ello se utilizará una planilla de campo donde se indicará fecha, hora, localización del lugar de muestreo, nivel del río, profundidad, características morfométricas del cuerpo de agua, condiciones meteorológicas, dirección e intensidad del viento y otras características relevantes como el color, olor y aspecto del agua, etc.

Antes de la extracción de la muestra propiamente dicha se realizará la medición de parámetros *"in situ"* como temperatura, conductividad eléctrica, pH, O₂ disuelto utilizando sensores de campo y transparencia del agua con disco de Secchi.

La profundidad a la cual es visible un objeto bajo el agua, como el disco de Secchi (Fig. 1), proporciona una medida de la transparencia de la misma. Así, mientras mayor sea la turbidez del agua, la visibilidad del disco de Secchi será menor. Esta turbidez, causada por los florecimientos y las partículas de sedimentos y/o materia orgánica en suspensión, restringe la penetración de la luz en el cuerpo de agua. Por lo tanto, la información obtenida por este procedimiento es la profundidad de penetración de la luz, pero debemos tener presente que el fitoplancton tiene capacidad fotosintética aún a una profundidad que alcanza el doble de la medida con el disco de Secchi.

Para realizar esta determinación se sumerge el disco hasta que desaparezca y se registra la profundidad medida en metros. El disco debe ser observado directamente desde arriba. Luego se baja un poco más el disco y se comienza a subir el mismo hasta que aparezca, registrando nuevamente la profundidad. El promedio entre estas dos profundidades registradas nos proveerá el dato buscado.

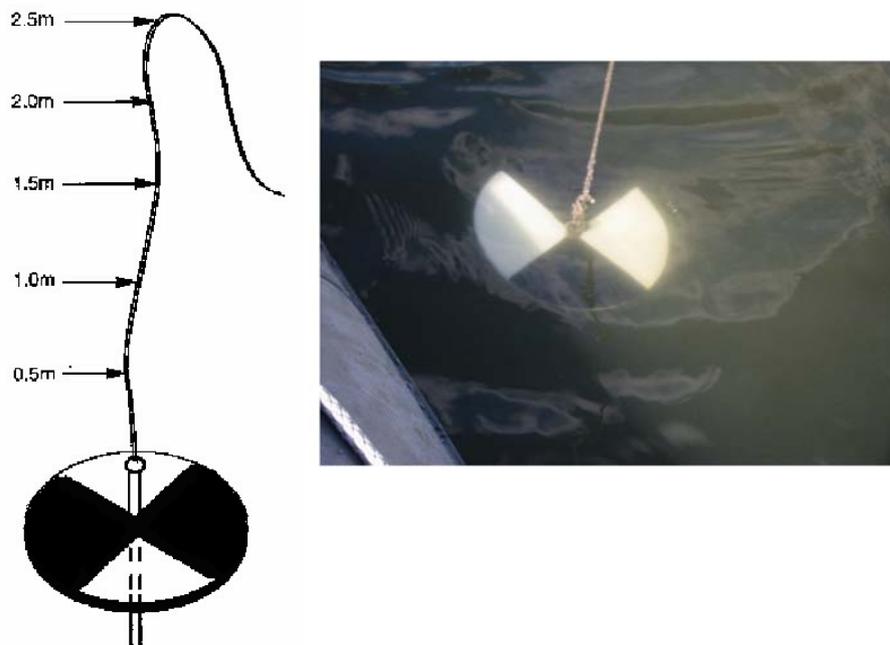


Fig. 1. Disco de Secchi

Una vez realizado esto se procederá a recolectar las muestras, como describiremos a continuación, tomando los recaudos necesarios para su correcto transporte al laboratorio.

7. 2. 1. 1. Toma de muestra para análisis cualitativo

Dependiendo de las características del florecimiento a estudiar se podrán utilizar distintos equipos para tomar la muestra.

Si el florecimiento es muy denso será suficiente recolectar la muestra con frascos de boca ancha, pasando directamente el frasco sobre la masa de células visible a simple vista, llenándolo hasta la mitad aproximadamente.

En el caso de enfrentarnos a un florecimiento menos denso, donde no existan masas de células visibles, se deberá emplear una red de fitoplancton, malla de 25/30 micrones de apertura de poro (Fig. 2), la que nos permitirá filtrar grandes volúmenes de agua y concentrar así los organismos presentes.

En este caso podremos tomar la muestra desde la costa o embarcados (Fig.3).

En el caso de tomar la muestra desde la costa se arroja la red de fitoplancton y se la retira realizando barridos horizontales y/o verticales hasta obtener una cantidad de material adecuada.

Al estar embarcados se procederá de manera similar, teniendo en cuenta que a medida que avanza la embarcación se filtran grandes volúmenes de modo que no será necesario repetir el proceso de lanzar y retirar la red.

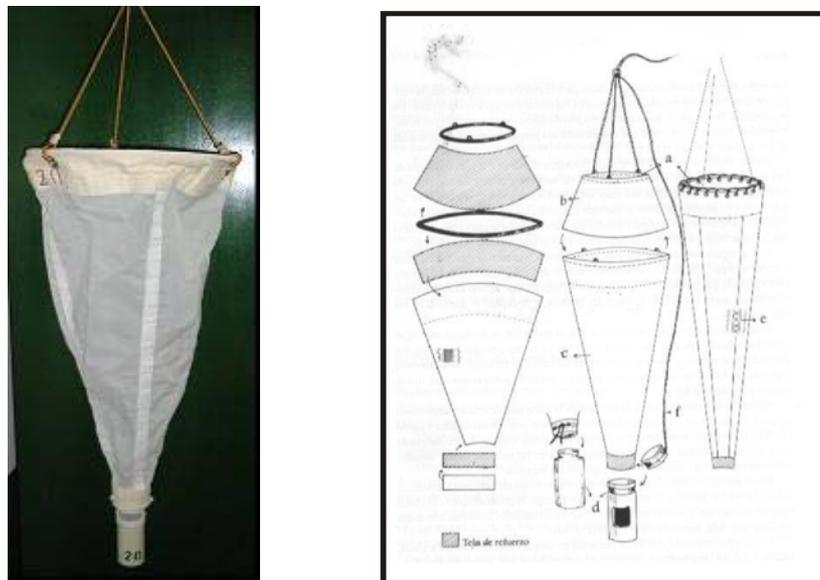


Fig. 2. Red de fitoplancton

A partir de las muestras recolectadas de esta forma se podrán encarar los estudios cualitativos de fitoplancton y, luego del procesamiento adecuado descrito más adelante, se realizará el ensayo ratón.



Fig. 3. Formas de muestreo con red de fitoplancton

Para el caso del análisis de fitoplancton se tomarán dos alícuotas de 125 a 150 ml. Una de ellas se conservará refrigerada a 4 °C sin fijar para realizar el análisis microscópico *in vivo*; mientras que la otra será fijada *in situ* utilizando distintas soluciones fijadoras.

Los fijadores mas comúnmente utilizados son: formaldehído al 4%, solución de Transeau (6 partes de agua, 3 partes de alcohol etílico, 1 parte de formaldehído, glicerina al 5%) colocando 50% de muestra y 50% de fijador, o FAA (90 ml de alcohol etílico, 5 ml de ácido acético glacial, 5 ml de formol). De estas, la solución de Transeau tiene la ventaja de no alterar las características de los fitoplanctontes (color, flagelos, etc). En cualquier caso las muestras serán colocadas en frascos plásticos y se rotularán correctamente indicando lugar de muestreo, fecha, hora y fijador utilizado.

7. 2. 1. 2. Toma de muestra para análisis cuantitativo

Las muestras para este tipo de análisis deben tomarse de forma tal de extraer una columna de agua que represente las características del cuerpo de agua, a la profundidad elegida, lo mas exactamente posible.

Para tal fin se utilizará una botella de Van Dorn (Fig. 4) que consiste en un cilindro de acrílico con un termómetro adosado y dos tapones de goma que cierran el cilindro mediante un dispositivo especial.



Fig. 4. Botella de Van Dorn abierta y cerrada

Para la recolección de la muestra se sumerge la botella abierta, en forma horizontal en el caso de muestras superficiales; o vertical cuando se pretenda muestrear a distintas profundidades. En éste último caso, una vez alcanzada la profundidad deseada se deja caer un mensajero que desciende por la cuerda que sostiene la botella y al golpear en el dispositivo de cierre, destraba las tapas y se produce el cierre. De este modo se "corta" la columna de agua correspondiente a la profundidad seleccionada, manteniendo las condiciones exactas del punto considerado (Fig. 5). No existe una profundidad preestablecida a la cual se tomará la muestra, sino que la misma se define de acuerdo a los objetivos de cada estudio en particular.



Fig. 5. Botella de Van Dorn conteniendo muestra de agua tomada en el Río de la Plata. Se puede observar la presencia de colonias de cianobacterias visibles a simple vista.

Una vez cerrada, se sube la botella y se vacía, recibiendo el contenido de la misma en distintos recipientes de volumen adecuado, fraccionando la muestra para emplearla en los distintos ensayos a realizar. De ser necesario, se repetirá el procedimiento para obtener la cantidad de muestra adecuada.

A partir de las muestras tomadas siguiendo este procedimiento se podrán realizar estudios cuantitativos de fitoplancton, toxinas, clorofila y nutrientes.

Para los estudios de fitoplancton se tomará una alícuota de 125 a 250 ml de la muestra y se fijarán "in situ" con solución de lugol-acético al 1% hasta que adquiera un ligero color caramelo, almacenándolas en frasco oscuro correctamente rotulado.

7. 2. 2. Toma de muestra de agua de red

Las muestras de agua de red se tomarán con el propósito de determinar la presencia o no de células de alga fitoplanctónicas y/o toxinas en la misma. En el caso de muestras para determinaciones de toxinas, es importante tomar una cantidad adecuada de muestra ya que en general nos encontraremos, de ser positiva la muestra, con concentraciones del orden de las ppb.

Se comenzará abriendo la canilla y dejando correr el agua durante, al menos, 10 min para evitar incluir dentro de la muestra tomada volúmenes muertos que no resultarán representativos. Para las determinaciones de presencia de algas, se tomarán

muestras de 250 ml y se fijarán "*in situ*" con solución de lugol (1%), para su posterior recuento en microscopio invertido, siguiendo la metodología de Utermöhl (1958).

Para los análisis de toxinas, se tomarán muestras de no menos de 2 litros de agua, utilizando para contener la muestra, de ser posible, botellas de vidrio color caramelo. En caso de no disponer de ellas se podrán utilizar botellas plásticas, teniendo la precaución de llevar a freezer a -20 °C inmediatamente después de la recolección para evitar pérdidas de toxina por adsorción sobre el envase.

7. 3. Análisis de Fitoplancton

Como comentamos antes, dependiendo de la muestra que se utilice, podremos realizar determinaciones cualitativas o cuantitativas. A continuación se describen los procedimientos para llevar a cabo dichas determinaciones.

7. 3.1. Análisis Cualitativo

La identificación de las especies presentes en las muestras se llevará a cabo realizando una observación al microscopio óptico (Fig. 6). Es necesario contar con un ocular micrométrico y con dispositivos de cámara clara y fotográfica para una correcta identificación.

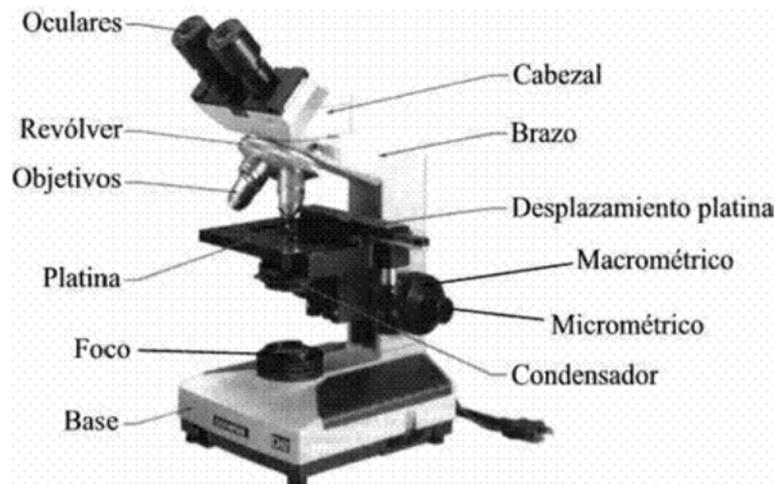


Fig. 6. Microscopio óptico

Para ello se realiza un preparado dispensando con una pipeta Pasteur una alícuota de la muestra sobre un portaobjetos y se coloca sobre ella un cubreobjetos.

Se comienza la observación con el menor aumento para definir la presencia o no de colonias y demás caracteres diagnósticos. Luego se realiza la observación a mayores aumentos con el fin de definir las características más significativas que nos llevarán a una identificación más precisa.

El análisis cualitativo resulta importante ya que basándonos en las observaciones realizadas en éste decidiremos que pre-tratamientos o procedimientos será necesario realizar al momento de llevar a cabo el estudio cuantitativo.

Para identificar a los organismos se utilizarán claves dicotómicas, mientras que para una clasificación sistemática mas precisa, a nivel específico, se recurrirá a la bibliografía adecuada.

Las características morfológicas que debemos tener en cuenta para identificar y clasificar a las cianobacterias son:

Tamaño y forma de las células.

Tamaño, forma y grado de agregación (formas cocales).

Reconocimiento de planos de división.

Tamaño y forma de los tricomas (formas filamentosas).

Características de la célula apical (presencia de caliptra, pared engrosada, y su particular morfología).

Presencia y textura de vaina y/o mucílago.

Presencia de aerótopos, vesículas o vacuolas de gas.

Presencia y disposición de gránulos de cianoficina.

Presencia, número, posición y morfología de los heterocistos y acinetos.

7. 3. 2. Análisis Cuantitativo (Recuento de fitoplancton)

El análisis cuantitativo o recuento de fitoplancton puede realizarse a partir de las muestras tomadas con botella de Van Dorn por distintos métodos dependiendo de los equipos de los que se dispone.

En general se recomienda realizar el recuento utilizando un microscopio invertido (Fig. 7) y cámaras de sedimentación (Fig. 8) siguiendo el método de Utermöhl (1958), ya que es la metodología mas precisa y utilizada. Si no se dispone de estos elementos se podrá realizar el recuento con un microscopio óptico, utilizando cámaras de Sedgwick Rafter, los cuales se describen a continuación.



Fig. 7. Microscopio invertido



Fig. 8. Cámaras de sedimentación

7. 3. 2. 1. Recuento por el método de Utermöhl

Las cámaras de sedimentación a utilizar serán seleccionadas teniendo en cuenta la densidad del fitoplancton a estudiar y la concentración del sedimento presente en el ambiente.

La muestra será homogeneizada mediante una leve agitación y se colocará un volumen adecuado de la misma dentro de la cámara de sedimentación.

Luego de 18 a 36 horas se observará la muestra en microscopio invertido, utilizando un aumento no menor a 400X.

El recuento puede realizarse por campos tomados al azar, en cuyo caso el número de campos contados dependerá de la densidad del fitoplancton y de la precisión que se desee obtener. De ser posible, se contarán al menos 100 individuos de la especie más frecuente, de forma tal de obtener un error en el recuento inferior al 20% y un nivel de significancia del 95%.

Otras alternativas para efectuar el recuento consisten en seguir las diagonales de las cámaras, recorrer el área central delimitada de 1cm de lado o utilizar un retículo de Whipple calibrado.

En el caso de recuentos de poblaciones de especies de *Microcystis*, para obtener un recuento más eficiente, se recomienda disolver las colonias. Para ello se diluirán 2 a 3 ml de muestra en agua destilada (20-30 %) y a esta dilución se le agregan 3 o 4 gotas de KOH 1M en un erlenmeyer de volumen adecuado. Se lo "cocina" a baño maría (90 °C) y se va observando periódicamente al microscopio hasta observar la disgregación completa de las colonias. Normalmente el proceso demora entre 40 minutos y 1 hora. De cualquier forma debemos observar el comportamiento particular de cada cepa.

Los resultados obtenidos en el recuento se expresarán como células por mililitro (cél.ml⁻¹).

7. 3. 2. 2. Recuento en cámaras de Sedgwick-Rafter

Las cámaras de Sedgwick-Rafter son pequeñas cubas de vidrio de 1 ml de capacidad utilizadas para el recuento de plancton en microscopio óptico (Fig. 9). En este caso se utilizan muestras fijadas "in situ" con lugol 1%. Éste, además de fijar la mues-

tra, favorece la sedimentación celular reduciendo notablemente el tiempo de sedimentación que en este caso es de 15 a 30 minutos. Luego se procede a la observación microscópica de manera similar a la mencionada antes.

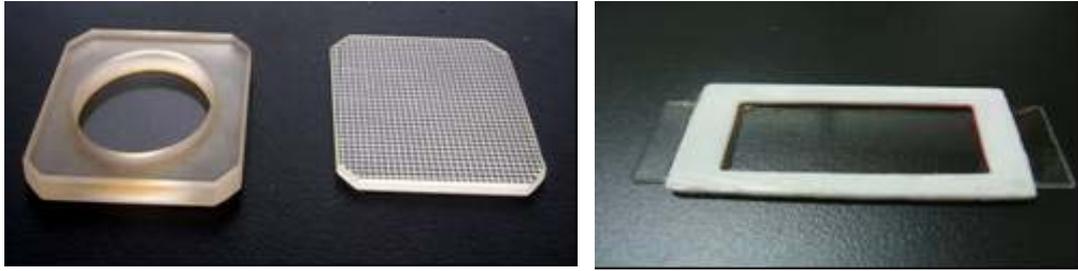


Figura 9. Cámaras tipo Sedgwick-Rafter

7. 4. Determinación de pigmentos fotosintéticos

Para estimar la biomasa y la capacidad fotosintética del fitoplancton, un parámetro simple de determinar es la concentración de pigmentos fotosintéticos.

Esto no solo permite estimar la biomasa, sino también indicar el estado fisiológico de la comunidad y la composición del fitoplancton en cuanto a grupos algales, de acuerdo a la calidad, distribución y relación entre las distintas clases de pigmentos.

Los principales pigmentos presentes en las cianobacterias son clorofilas (a, b, c y d) y carotenoides (carotenos y xantofilas).

Las variaciones en concentración de los pigmentos dependerán del metabolismo algal y de factores físico-químicos como luz, temperatura, nutrientes, etc.

Un método para determinar estos pigmentos se basa en una extracción de los mismos con solventes y en una determinación espectrofotométrica, a longitudes de onda específicas, de esos extractos.

La clorofila es soluble en varios solventes orgánicos como éter, acetona, metanol, cloroformo y piridina entre otros. En general, suele utilizarse acetona o metanol para realizar la extracción ya que estos solventes rompen las interacciones entre las proteínas y el pigmento solubilizando este último.

7. 4. 1. Extracción de clorofila y determinación de absorbancia

Es particularmente importante llevar a cabo la extracción de clorofila a bajas temperaturas y en oscuridad; de esta forma se reduce al mínimo la fotooxidación del pigmento.

Se parte de un volumen conocido de muestra, que puede variar entre 0,5 y 5 litros dependiendo de la concentración algal.

La muestra se filtra por succión, utilizando un equipo como el de la Fig.10 y filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F o similar).

Los filtros, donde quedan retenidas las células, se colocan en sobres de papel aluminio y se congelan a -20°C al menos durante una noche, para facilitar la lisis celular y la liberación del pigmento.

Los filtros son cortados al medio y se colocan dentro de frascos forrados con papel de aluminio sobre los cuales se dispensa 8 ml del solvente de extracción. Para fitoplancton de agua dulce se recomienda utilizar metanol o etanol a 60-70 °C.

Se deja en extracción, durante una noche como máximo, en oscuridad.

Una vez finalizada la extracción se toma el extracto y se lo coloca en una cubeta de 1 cm de camino óptico y se lee absorbancia a 750 y 665 nm.

En la misma cubeta se agrega 1 gota de HCl 1 N y luego de 1 minuto se repite la lectura a ambas longitudes de onda.

7. 4. 2. Cálculo de concentración de clorofila

Siempre que utilicemos un método espectrofotométrico, a partir del cual obtendremos medidas de absorbancia, debemos tener presente que estaremos determinando la sumatoria de todos los compuestos que absorben a esa longitud de onda.

De las distintas clases de clorofila, sólo la clorofila "a" se encuentra en todas las algas, ya que este tipo de clorofila es esencial para la fotosíntesis; en tanto que la clorofila "b" se encuentra en *Chlorophyta* y *Euglenophyta*, la clorofila "c" en *Bacillariophyta*, *Cryptophyta*, *Dinoflagellata* y *Phaeophyta* y finalmente la clorofila "d" sólo en *Rhodophyta*.

Por lo tanto, para calcular la concentración de clorofila "a" por este método se utiliza la siguiente fórmula con factores específicos para cada solvente (Marker et.al., 1980).

$$[\text{Clorofila a sin feopigmentos}] = F \cdot [(\text{Absa } 665 - \text{Absa } 750) - (\text{Absb } 665 - \text{Absb } 750)] \cdot k \cdot v$$

Donde:

Absa = Absorbancia antes de acidificar.

Absb = Absorbancia después de acidificar.

F = 2.43 para el etanol y 2.72 para el metanol.

k = coeficiente de absorción específica, que es de 11.2 para el etanol y 11.62 para el metanol.

V = volumen del extracto en ml/ litros de agua filtrada.

También pueden utilizarse otra fórmula para realizar el cálculo con sus correspondientes coeficientes como es el caso de SCOR-UNESCO (1966) (Cabrera Silva, 1984)

$$[\text{Clorofila a}] = (16.5 \text{ Abs}665 - 8.3 \text{ Abs}750) \cdot \text{Vol. extr.} / \text{Vol. muestra}$$

La concentración de clorofila a se expresa en µg/ L.

Debido a la posibilidad de sobreestimar la concentración de clorofila a en la muestra por la turbidez que ésta presenta o por la degradación del pigmento dando productos que pueden absorber en la misma región espectral que la clorofila, como es

el caso de la clorofilida, se hace necesario en algunos casos realizar una corrección en los cálculos antes mencionados.

La ecuación propuesta por Marker et al. (1980) tiene en cuenta la corrección de las lecturas por turbidez. Sin embargo, cuando la absorbancia a 750 nm es mayor de 0,002 debemos realizar la siguiente corrección:

$$C = F (A_{750} - 0.002)$$

Donde F es un factor que depende de las distintas longitudes de onda indicadas en la siguiente tabla:

Longitud de onda (nm)	F
430	3
480	2
570	1,5
630, 645, 665	1

Se calculan las absorbancias corregidas restando de la absorbancia medida el valor de C calculado.

Con esas absorbancias corregidas se realiza el cálculo de concentración de clorofila "a" utilizando las fórmulas indicadas antes.

A partir del dato de concentración de clorofila se puede calcular la cantidad de ésta presente en el volumen de extracción y conociendo el volumen de muestra utilizado inicialmente podemos obtener la cantidad de clorofila en la misma y expresar este valor en mg/ m³.

En la siguiente tabla indicamos valores normales de clorofila "a" en diferentes ambientes:

Clorofila a (mg/m ³)	Ambiente
0,01-3	Lagos oligotróficos
2-25	Lagos mesotróficos
10-500	Lagos eutróficos
10-150	Hielos polares
1-15	Océano abierto

7. 5. Determinación de toxinas en diversas muestras

La determinación de toxinas puede llevarse a cabo utilizando diferentes técnicas y pre-tratamientos sobre las distintas muestras de las que se puede partir. Por ello debemos tener en cuenta que parámetros pueden o deben medirse y las características de la matriz de las diversas muestras.

Dependiendo del tratamiento que se realice a las muestras ambientales, es posible determinar la concentración de toxinas disueltas, intracelulares o totales.

A continuación se presentan los lineamientos generales en lo referente a estabilidad de las toxinas en el transporte y almacenamiento, procesamiento de las muestras para separación o extracción de las toxinas, técnicas analíticas y bio-analíticas de detección, expresión de resultados e informe de los mismos.

7. 5. 1. Criterios de estabilidad de las toxinas en las muestras

Es sumamente importante, siempre que se pretenda realizar una determinación de la concentración de toxinas, tener especial cuidado en el manejo que se hará de la muestra; a efectos de asegurar la exactitud de las mediciones realizadas y no cometer errores por defecto debido a la pérdida de toxinas.

Por ello es fundamental tener en cuenta aquellos factores como tiempo, temperatura, luz, flora microbiana acompañante, pigmentos, materiales de los recipientes, etc., que pueden contribuir a la degradación de las toxinas consideradas.

Es ideal que el análisis de las muestras se lleve a cabo en el menor tiempo posible, dentro de la semana de la recolección de la muestra. De ser así, las muestras destinadas a determinación de toxinas deberán ser transportadas y conservadas refrigeradas, en oscuridad e idealmente en recipientes de vidrio. Estas condiciones evitarán que se produzca degradación de toxinas por acción microbiana y de la temperatura (refrigeración), reacciones fotoquímicas especialmente en presencia de pigmentos (oscuridad); así como pérdidas de toxina por la adsorción de las mismas especialmente sobre materiales plásticos (recipientes de vidrio). Si no se cuenta con recipientes de vidrio para la toma de estas muestras podrán utilizarse botellas de plástico teniendo la precaución de no llenarlas completamente con agua y congelarlas inmediatamente al llegar al laboratorio, para evitar pérdida de toxinas.

Cuando no sea posible realizar las determinaciones dentro de la semana de recolección, las muestras deberán ser transportadas de igual forma al laboratorio y podrán almacenarse inmediatamente en el freezer a -20°C para posteriores determinaciones o procesarse como describimos mas adelante a efectos de conservar los extractos y analizarlos posteriormente.

De la misma forma debemos tomar en consideración ciertas precauciones en cuanto a la conservación de los extractos obtenidos a partir de las muestras. A fin de evitar pérdidas de toxina por adsorción o degradación, los extractos se conservarán en el freezer a -20°C , en recipientes de vidrio de ser posible color caramelo.

Para el almacenamiento se utilizarán recipientes de vidrio con tapa, teniendo especial cuidado en no llenarlo completamente con el extracto y colocarlo, para el comienzo de la congelación, en el freezer con una inclinación de aproximadamente 45° ; con estas precauciones se evita que debido a las presiones de expansión que genera el líquido durante la congelación se rompa el recipiente y se pierda o contamine el extracto.

Es aconsejable evitar utilizar recipientes plásticos ya que la toxina tiende a quedar adsorbida en la superficie del mismo y de esta forma, cuando se analice la muestra se producirán errores por defecto.

Algunos autores proponen que, si resulta imposible la determinación inmediata de estas muestras o el almacenamiento en refrigeración, es posible también realizar el agregado de algún conservante químico, como sales de Cu (II) . Este procedimiento no es recomendado en aquellos casos donde se pretenda determinar discriminadamente toxina disuelta y toxina total, ya que en estas condiciones se provocará la lisis de células y sólo será posible determinar la concentración de toxina total.

7. 5. 2. Procesamiento de las muestras

Los procedimientos a llevar a cabo serán diferentes dependiendo de los parámetros que se pretendan medir y de las muestras de las que se parte.

7. 5. 2. 1. Muestras de agua de río, lagos y lagunas

7. 5. 2. 1. 1. Tratamiento de muestras para determinar toxinas disueltas

Con el fin de determinar las toxinas disueltas en la muestra de agua proveniente de un florecimiento, se debe como primera medida separar las cianobacterias contenidas en la misma, a efecto de evitar que tratamientos posteriores liberen las toxinas contenidas en dichas células. Para ello se podrá realizar una filtración por succión de la muestra cuantitativa tomada con la botella de Van Dorn (ver sección 7.2.1.2.).

Primeramente debe decidirse la cantidad de agua a ser filtrada a fin de obtener una cantidad suficiente de toxina que resulte detectable por los métodos analíticos.

El volumen que se filtrará depende de la cantidad de fitoplancton presente en la muestra así, debe filtrarse un mayor volumen en aquellos casos en los que la cantidad de cianobacterias presentes sea menor. En general se filtran entre 1 y 2 litros, aunque en el caso de florecimientos muy intensos suele ser suficiente filtrar entre 10 y 30 ml. Es de suma importancia realizar en conjunto la determinación de toxinas y clorofila de manera de poder correlacionar y comparar los datos obtenidos.

El equipo de filtración está compuesto por un embudo Buchner adosado, con un tapón de goma que permita un cierre hermético, a un Kitasato de 1litro; el que se conectará por su salida lateral a un frasco de seguridad y éste a una bomba de vacío mediante mangueras de conexión (Fig. 10).

Se coloca un filtro Watman, de aproximadamente 10 cm de diámetro, en la parte superior del Buchner cuidando que cubra bien los orificios para evitar pasaje de células durante la filtración.

Se humedece el filtro con una pequeña porción de muestra y luego se realiza el vacío, de esta forma se consigue una buena adherencia del filtro a la superficie del Buchner.

En este momento se comienza con la filtración propiamente dicha, agregando la muestra de a porciones dentro del embudo mientras se mantiene la succión.

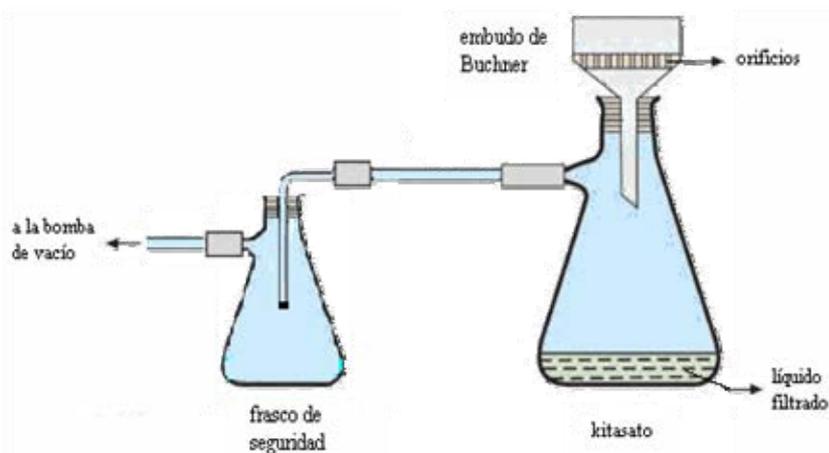


Fig. 10. Equipo de filtración por succión

Si se satura el filtro, como ocurre con las muestras que presentan una gran cantidad de células, se debe reemplazar el mismo por uno nuevo.

Se remueve el filtro tomándolo con una pinza, teniendo cuidado de no romperlo y que no se produzca pasaje de las células retenidas en el mismo hacia la base del Buchner. Luego se coloca un filtro nuevo y se repite el procedimiento antes descrito.

Las células retenidas en el o los filtros utilizados se reservan para una posterior extracción de toxina y el filtrado obtenido se utilizará para determinaciones analíticas.

7. 5. 2. 1. 2. Tratamiento de muestras para determinar toxinas intracelulares

El tratamiento que se describe a continuación tiene como objetivo liberar las toxinas contenidas en el interior de las células que quedaron retenidas en los filtros, mediante la lisis de éstas.

Para ello se realizará una extracción con una mezcla de solventes que tendrán por objeto favorecer la lisis celular y ofrecer una fase de polaridad adecuada para solubilizar las toxinas liberadas.

La extracción se lleva a cabo de la siguiente forma:

Se colocan los filtros con el contenido celular, provenientes de la filtración explicada anteriormente, en un vaso de precipitados de 200 ml.

A esto se le agrega 5-10 ml por filtro de una solución de extracción de composición Butanol : Metanol : Agua (5:20:75, V:V:V) y se agita durante 1 hora o se sonica por 10 minutos para permitir el contacto y favorecer la lisis y extracción.

Se retiran los filtros y se centrifuga el extracto a 3500 rpm durante 15 min.

Luego se separa el sobrenadante, en este momento si la muestra contenía cianobacterias el extracto tomara el característico color azul de las ficocianinas.

Se realiza una segunda extracción sobre el precipitado (células) obtenido en la centrifugación con otra fracción de la solución de Butanol: Metanol: Agua repitiendo el procedimiento anterior.

El sobrenadante, resultante de ambas extracciones, se trasvasa a un balón con cuello esmerilado y el precipitado se descarta.

Se evapora la fracción alcohólica en rotovapor o baño termostático, cuidando que el baño calefactor no supere los 40°C. Es importante que se evaporen completamente el Metanol y el Butanol, pero debe tenerse cuidado de no llevar a sequedad.

La muestra así concentrada se empleará en distintas técnicas analíticas.

7. 5. 2. 1. 3. Tratamiento de muestras para determinar toxinas totales

Si el objetivo es determinar toxinas totales el primer paso es liberar las toxinas que aún están retenidas dentro de las células. Para ello se debe seleccionar la técnica de lisis que mejor se adecue a las condiciones e infraestructura con la que se cuenta en el laboratorio.

Para éste fin la técnica más simple es someter a la muestra a 3 ciclos de congelado-descongelado, que lisa las células gracias a las fuerzas de cizalla que generan los cristales de hielo formados durante el congelamiento.

Si en el laboratorio se cuenta con un sonicador, siendo los de vástago los más efectivos, puede utilizarse éste método para efectuar la lisis, sometiendo a la muestra a ciclos de 10 minutos.

Una vez realizada alguna de estas técnicas de lisis, o una combinación de las mismas, se procederá a realizar una separación de los restos celulares. Para ello, si el florecimiento es muy denso puede comenzarse con una centrifugación a 3500 rpm durante 15 min para remover los materiales de mayor tamaño y luego filtrar como comentamos antes, el sobrenadante obtenido. El filtrado recolectado será analizado por las técnicas pertinentes.

Las muestras obtenidas luego de realizar cualquiera de estos tres pretratamientos pueden analizarse directamente o bien pueden ser pasadas por filtros Sep-Pack como se indica a continuación, sobre todo cuando presenten una coloración intensa; a fin de evitar interferencias posteriores principalmente en métodos como ensayo de inhibición de proteína fosfatasa o HPLC.

7. 5. 2. 2. Muestras de agua de red

Sobre estas muestras podremos realizar test preliminares rápidos, como el de la fosfatasa para microcystinas o ELISA empleando la muestra directamente; o podremos realizar pretratamientos para posteriormente cuantificar las toxinas contenidas en ellas por ejemplo por HPLC.

En este último caso, debido a que idealmente las concentraciones de toxinas deben ser menores a $1\mu\text{g/l}$, será necesario realizar una concentración previa de la muestra.

Para el caso de microcystinas es posible concentrar fácilmente la toxina contenida en este tipo de muestras, ya que disponemos de técnicas sencillas, que no requieren demasiado equipamiento y en las cuales no se degrada o altera la toxina. Para determinar otras toxinas en agua potable se recomienda el uso de los kits comerciales inmunológicos ya que las toxinas no son fácilmente concentrables para su detección posterior con HPLC.

Cuando debamos realizar una concentración previa de la toxina contenida en la muestra se utilizará un filtro Sep-Pak C18 de 500mg. Este filtro es una jeringa plástica conteniendo un relleno de C18 que tiene la particularidad de retener selectivamente a las toxinas contenidas en la muestra de agua, las cuales serán luego eluidas con solventes.

Como primer paso se debe activar el filtro, para esto se hace pasar lentamente 20 ml de metanol, luego 20 ml de aire, 20 ml de agua y finalmente 20 ml de aire. En este momento el filtro está listo para recibir la muestra.

Se procede ahora a armar un equipo de filtración conectando un kitasato de 2 L por su salida lateral a la bomba de vacío. Por la parte superior del mismo ingresa una manguera adosada a un tapón de goma, que en el otro extremo está conectada al filtro, el cual se introduce en el recipiente que contiene la muestra a filtrar (Fig. 11).

De esta forma se filtrará un volumen exactamente medido de agua, en general se emplean al menos 2 litros. Es muy importante registrar cuidadosamente el volumen filtrado ya que lo utilizaremos en los cálculos de concentración que se realizarán posteriormente.

Una vez finalizada la filtración, el líquido que queda contenido en el kitasato se descarta ya que las toxinas presentes en la muestra quedaron retenidas en el filtro.

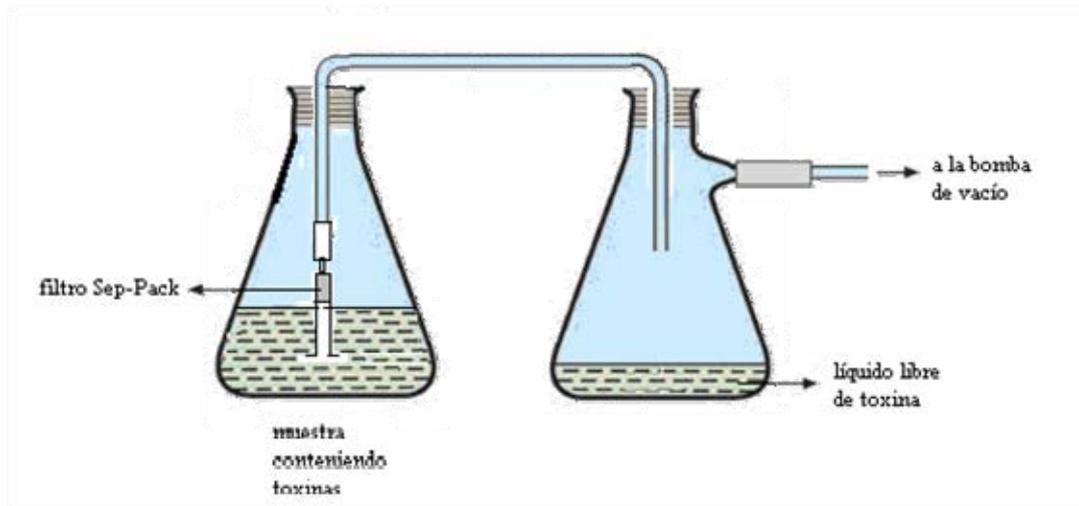


Fig. 11. Equipo para concentración de toxinas contenidas en muestras de agua de red

Se desconecta el filtro del sistema de filtración y se procede a la elución de las toxinas. Para ello se utilizarán 10 ml de metanol 20% para eluir los pigmentos que pudieran existir en las muestras (esta fracción se descarta), luego se hacen pasar lentamente a través del filtro 10 ml de aire seguidos de 10 ml de metanol 80 % para permitir que se liberen las toxinas. Se recoge el líquido que eluye del filtro, donde se encontrarán las toxinas, que será utilizado para posteriores análisis.

7. 5. 3. Métodos Bioanalíticos

7. 5. 3. 1. Ensayo ratón de toxicidad orientativo

Este ensayo, mediante la exposición del animal a la muestra a determinar vía intraperitoneal, nos permitirá realizar un ensayo preliminar, que permita orientar sobre la toxicidad que presenta la muestra a analizar.

La información obtenida en este tipo de ensayos estará basada en la sintomatología que presente el animal durante el período de observación y en las características particulares que se observarán en los órganos del animal, principalmente el hígado, durante la correspondiente necropsia. Así, podremos distinguir por ejemplo entre neurotoxinas y hepatotoxinas, ya que tienen órganos blancos diferentes y por lo tanto el comportamiento del animal durante el ensayo y el aspecto macroscópico de los órganos serán muy distintos en uno y otro caso.

El único bioensayo ratón estandarizado a nivel mundial es el que se utiliza para la determinación de Veneno Paralizante de Moluscos.

Si bien es el bioensayo más utilizado, debe considerarse que es una determinación cualitativa, inespecífica, de baja sensibilidad, que solo tiene valor preliminar y que involucra un importante compromiso ético.

Preparación de muestras

Debido a la baja sensibilidad que presenta este método las muestras a utilizar en el análisis deberán estar suficientemente concentradas. Por lo tanto, dependiendo del caso, podremos partir de muestras de florecimientos muy densos o de concentrados de red sobre los cuales realizaremos un pretratamiento como el mencionado para determinar toxinas totales.

Los extractos acuosos, obtenidos mediante éste procedimiento, comúnmente presentarán una coloración variable del azul intenso al verde debido a los pigmentos producidos por estas algas.

Preparación de animales

Los animales que suelen emplearse para estos ensayos son ratones albino suizo machos adultos de entre 20 y 25 gr. provenientes de bioterio los cuales no han sido expuestos previamente a ningún tóxico y están libres de patógenos. Otras cepas como los Balbc o similares pueden ser utilizados. Los animales se mantendrán en cuartos de temperatura controlada y se alojarán en jaulas donde dispondrán de alimento y agua. Los animales serán tratados de acuerdo con los procedimientos descritos en Principles of Laboratory Animal Care (National Institute of Health Publication N 86-23 revised 1985).

Es muy importante identificar correctamente y de una manera fácilmente visible a cada ratón antes de realizar el ensayo utilizando para tal fin distintos sistemas de identificación como marcas de color en la cola. Una vez identificados los animales, se pesarán y se llevará un cuidadoso registro donde conste la identificación del animal, el peso del mismo y muestra que se le inyectará.

Técnica de inyección de la muestra

Antes de proceder a la inyección de la muestra debemos preparar todos los materiales necesarios como guantes de látex, alcohol, algodón, jeringas, agujas, descartador de agujas, muestras, solución fisiológica, equipo de cirugía (placa de telgopor recubierta de papel absorbente, bisturí, tijeras, pinzas, alfileres, etc.), balanza, vidrios de reloj; de tal manera de contar rápidamente con estos elementos cuando sean necesarios durante el ensayo.

Se utilizarán para la inyección intraperitoneal una aguja y jeringa de tuberculina para cada animal a inyectar. Los ensayos se harán por duplicado y se incluirán en cada grupo de ensayos dos controles que serán inyectados con solución fisiológica (NaCl 0,9 %).

Se carga la jeringa con 1 ml de muestra o solución fisiológica, según corresponda, y se reserva con la aguja colocada.

Luego se procede a tomar al animal; es muy importante lograr una correcta inmovilización del mismo para evitar accidentes durante la inyección.

Si la persona que va a inyectar la muestra es diestra, deberá fijar al animal con la mano izquierda a fin de dejar su mano derecha libre para tomar la jeringa y realizar la inyección.

Para inmovilizar al animal se procede de la siguiente manera. Se extrae al ratón de la jaula tomándolo por la cola con la mano derecha, se lo apoya sobre la mesada o sobre la parte superior de la jaula y con la mano izquierda se realiza una leve presión

sobre la parte posterior de la cabeza pinzando con los dedos índice y pulgar la piel de esa zona (Fig. 12).

Luego se levanta y gira al animal trabando la cola del mismo entre el dedo meñique y la palma de la mano izquierda al tiempo que se colocan los dedos mayor y anular de la misma mano en la zona dorsal del animal realizando una suave presión hacia arriba; de esta manera se logra una buena exposición de la región abdominal donde se llevará a cabo la inyección intraperitoneal mientras que se inmoviliza al animal evitando mordeduras (Fig. 12).

Una vez realizado este procedimiento se procede a la inyección propiamente dicha. Para ello se toma un algodón embebido en alcohol y se desinfecta la zona del pliegue entre la pata trasera izquierda del animal y el abdomen. Se observa la hora de inyección, que se registrará posteriormente, y se toma la jeringa ya cargada con la muestra colocando el bisel de la aguja mirando hacia arriba. La aguja debe ingresar aproximadamente paralela a la superficie del cuerpo del animal; se avanza en la inyección para atravesar la piel y el peritoneo. Una vez en posición se comienza a inyectar la muestra empujando lentamente el embolo de la aguja hasta dispensar el volumen total de muestra cargado en la jeringa (Fig. 12).



Fig. 12. Técnica de inmovilización e inyección de un ratón

Se debe tener especial cuidado en la dirección y profundidad con la cual se introduce la aguja para evitar perforar algún órgano (dirección incorrecta o inyección muy profunda) o realizar una inyección subcutánea (dirección incorrecta o inyección demasiado superficial).

Una vez finalizada la inyección de la muestra se retira la aguja y se coloca al animal en una caja de observación que no contenga aserrín con el fin de poder detectar la posible pérdida de la muestra por el sitio de punción, y se comienza con la observación.

Observación post-inyección

De la observación de los animales durante este período del ensayo se obtendrán detalles que nos orientarán sobre que tipo de toxinas se encuentran presentes. Por ello es importante realizar una observación minuciosa y registrar cuidadosamente los signos y síntomas que presenten los animales.

Las características generales que presentará un animal que esta sufriendo una intoxicación con hepatotoxinas serán una importante inflamación abdominal que lleva a que el ratón vaya disminuyendo cada vez más su actividad, hasta que queda quieto en un sector de la jaula, y a que se dificulte levemente su respiración.

Muy diferentes son los síntomas observados en aquellos animales que sufren una intoxicación por neurotoxinas. En este caso el animal presenta como síntomas iniciales alteraciones en la marcha y un rascado del hocico con las patas delanteras. Luego el animal comienza a dar saltos debidos a reflejos y contracciones descontroladas, al tiempo que se acrecientan los problemas respiratorios. En cuanto a esto, la frecuencia respiratoria va aumentando en un principio y a medida que avanza la intoxicación, el animal realiza inspiraciones mas forzadas y profundas cada vez. Finalmente el animal muere por paro cardio-respiratorio.

En ambos casos los síntomas se presentarán con intensidad y rapidez variable dependiendo de la cantidad de toxina presente en el extracto.

Siempre que sea posible, es recomendable comenzar estos ensayos por la mañana, de esa forma se dispone de más tiempo para poder observar y registrar los síntomas de los animales inyectados.

Los animales se observarán continuamente durante las primeras dos o tres horas, registrándose cualquier síntoma o alteración que se detecte en ellos.

Se continúa con una observación periódica hasta 24 hs post-inyección.

Si el animal muere durante este período se registra la hora de muerte. En el caso que el deceso se produzca durante la noche se puede informar un rango de tiempo aproximado de muerte o simplemente que ésta ocurrió durante la noche.

Si el animal sobrevive luego de 24 hs, se lo sacrifica por dislocación cervical para luego proceder con la necropsia.

Necropsia

Luego de la muerte del animal se procederá a realizar la disección del mismo con el fin de evaluar el aspecto macroscópico de los órganos, registrando cualquier alteración que se observe, y extraer el hígado para pesarlo y calcular el porcentaje en peso que éste representa respecto de peso del animal completo.

Para realizar una correcta disección se procederá como se detalla a continuación.

Se coloca al animal en posición decúbito dorsal sobre la placa de disección y se colocan en forma extendida las patas delanteras y traseras asegurándolas con alfileres con el fin de exponer el área abdominal (Fig. 13).

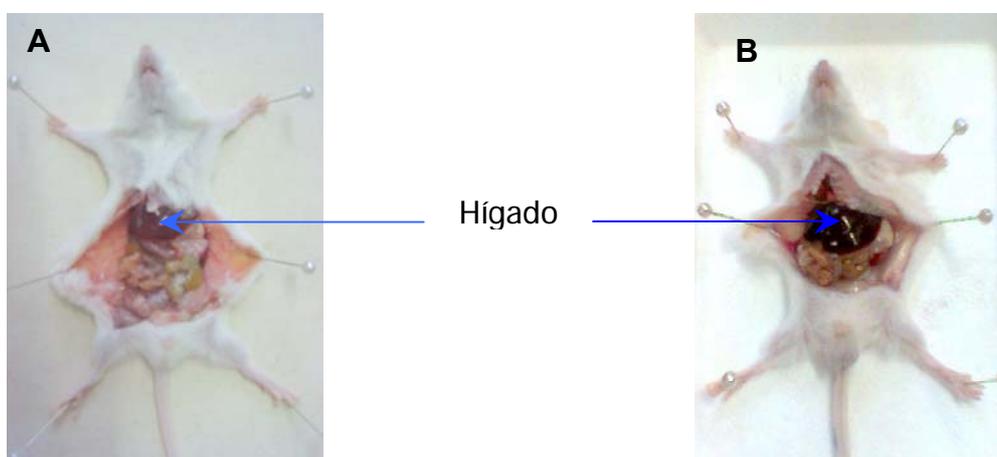


Fig. 13. Necropsia de A) Ratón control y B) Ratón sometido a hepatotoxinas. Se puede observar la notable diferencia en cuanto a color y tamaño del hígado en ambos especímenes.

Luego con una pinza se levanta la piel de la zona baja del abdomen y se realiza una incisión con la tijera cortando la piel y el peritoneo. A partir de allí se continúa cortando en forma longitudinal y ascendente la piel y serosa hasta alcanzar la base del tórax. Tomando la piel con la pinza se la tracciona hacia ambos lados y se la asegura con un alfiler, dejando de esta forma expuestos los órganos de la cavidad abdominal (Fig. 13).

Se realiza una cuidadosa observación de los órganos (tamaño, aspecto, color, forma, etc.) dedicando especial atención al hígado.

En el caso de los controles se observará que el hígado ocupa la parte superior derecha del abdomen, se distinguen bien sus dos lóbulos que se presentan de color amarronado claro.

Cuando los animales hayan estado expuestos a hepatotoxinas el aspecto del hígado será bastante diferente. Muchas veces se encontrará que el tamaño del mismo será mucho mayor que el control, presentará un color marrón oscuro o negro y evidentes signos de hemorragia.

Luego de registrar las características macroscópicas del hígado se procede a la remoción del mismo. Para ello se toma el órgano con una pinza, con cuidado de no dañarlo, y con un bisturí con buen filo se cortan los ligamentos que mantienen al hígado en posición dentro de la cavidad abdominal, poniendo especial atención en no dejar ninguna fracción del órgano sin extraer.

Finalmente se coloca el hígado en un vidrio de reloj o recipiente similar, previamente tarado, y se pesa el órgano registrando luego el dato obtenido.

Una vez realizados estos procedimientos y registrados los datos necesarios se procede a descartar al animal mediante un sistema de retiro de residuos patogénicos.

Cálculos e informe de resultados

Con los datos registrados en las etapas anteriores se realizará el cálculo del porcentaje en peso del hígado.

Para calcular el porcentaje en peso del hígado se utilizarán los datos del peso del animal y de peso del hígado, tomando como un 100% al peso del animal completo y calculando que porcentaje del mismo representa el peso del hígado. Por ejemplo, si el peso del animal fue de 20 gr. y el peso del hígado fue de 1,6 gr., el porcentaje obtenido será del 8%.

Habitualmente, en un caso normal, este porcentaje se encontrará en aproximadamente un 5%, mientras que si supera el 7% se considera que el animal ha estado expuesto a hepatotoxinas.

Una vez realizado este cálculo se procederá a redactar el informe. Se comenzará indicando lugar y fecha de toma de muestra, fecha de realización del ensayo, condiciones en las que fue remitida la muestra (envase, aspecto del contenido, temperatura de la muestra, etc.), procedimientos realizados sobre la muestra para obtener el extracto a inyectar y cualquier detalle que resulte relevante en este aspecto.

Luego se indicará, para cada muestra, el número de animales utilizados con sus correspondientes pesos, la sintomatología que presentó el animal así como el tiempo de muerte del mismo y el porcentaje en peso del hígado.

Finalmente se indicará si se han observado resultados compatibles o no con hepatotoxinas o neurotoxinas.

Se indica a continuación los pasos a seguir para llevar a cabo este ensayo:

- 1.- Obtener un extracto acuoso a partir de muestras adecuadas para inyección de los animales. Preparar solución fisiológica para controles.
- 2.- Identificar y pesar al animal, cargar la jeringa con la muestra e inyectar intraperitonealmente registrando la hora de inyección.
- 3.- Observar continuamente durante las dos o tres primeras horas, registrando cualquier alteración. En caso de muerte registrar la hora en la que se produjo; de no ser así, continuar la observación hasta las 24 hs. post-inyección.
- 4.- Realizar la necropsia, observar características macroscópicas de los órganos, extraer el hígado y pesarlo.
- 5.- Realizar cálculos e informe.

Si bien, como comentamos antes, el ensayo ratón es el bioensayo utilizado tradicionalmente, se han desarrollado otros tipos de ensayos biológicos donde se utilizan invertebrados como *Artemia salina*, *Daphnia*, *Thamnocephalus platyurus* entre otros, bacterias como *Photobacterium phosphoreum* y *Serratia marcescens* y distintos cultivos celulares como hepatocitos de rata, fibroblastos de hamster, etc. Estos ensayos tienen la desventaja de presentar diferente sensibilidad para distintas toxinas de manera que pueden poner de manifiesto la presencia de alguna toxina en particular, mientras que pueden producirse falsos negativos frente a otros tipos de toxinas. Por otro lado, en la mayoría de los casos, se hace imposible discriminar entre neurotoxinas y hepatotoxinas y aumentan considerablemente los costos y la dificultad de manejo del sistema. Así mismo es fundamental tener en cuenta que estos métodos tienen en general una pobre correlación con el bioensayo ratón y entre los distintos laboratorios por lo tanto es difícil alcanzar una buena reproducibilidad de los datos.

7. 5. 3. 1. Ensayo de inhibición de proteína fosfatasa

Esta determinación, al igual que el bioensayo ratón, tiene valor como ensayo preliminar ya que nos dará una estimación de la presencia de Microcystinas en la muestra, pero no nos permitirá cuantificar la toxina contenida, diferenciar entre MC-LR, MC-RR, MC-YR, etc, ya que si bien estas toxinas producen inhibición de la proteína fosfatasa, todas ellas lo hacen en diferente proporción.

El ensayo se basa en poner de manifiesto la inhibición generada por la toxina, actuando como un inhibidor irreversible, sobre la enzima. Para ello se medirá la absorbancia del producto resultante de la reacción enzimática a una longitud de onda determinada.

Para este ensayo se utiliza una proteína fosfatasa comercial y como sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) que dará, por acción enzimática, p-nitrofenol de color amarillo; cuya absorbancia se mide a 405 nm.

A continuación se presenta el protocolo utilizado para un ensayo de inhibición puesto a punto para una proteína fosfatasa PP1 comercial.

Reacción Enzimática

Se comienza reconstituyendo el liofilizado comercial agregando al vial 200 µl. de solución de Glicerol al 20% (según las indicaciones del proveedor de la enzima) y homogeneizar suavemente sin agitar para evitar generar espuma que pueda desnaturar a la enzima. Luego se fracciona el stock de reconstituido en tubos eppendorff (10 µl por tubo) y se almacenan en freezer a -20 °C.

Al comenzar a trabajar con un nuevo eppendorff conteniendo 10 µl. del reconstituido de la enzima, se realiza una dilución 1/50 utilizando como diluyente el Buffer de Dilución de Enzima (Imidazol 25 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1mg./ml., Mn^{+2} 2 mM. pH = 7,4). Esta será la Solución de Enzima de Trabajo (SET).

Es muy importante trabajar utilizando un baño de hielo para evitar pérdida de estabilidad de la enzima, lo cual conduciría a una disminución en la actividad.

Así mismo debemos trabajar por duplicado para disminuir el error de la determinación.

Para realizar la curva de calibración se preparan soluciones de MC-LR de concentraciones conocidas barriendo el rango de 0,5 a 5 ppb.

Se rotulan correctamente los eppendorff a utilizar (Blanco, Muestra, Patrones) y se realiza el siguiente esquema de agregados mientras se mantienen los tubos en el baño de hielo.

	Buffer reacción (µl.)	SET (µl)	H ₂ Od (µl.)	Sol. de [LR] conocida (µl)	Muestra (µl)
Blanco	20	5	50	-----	-----
Patrón	20	5	-----	50	-----
Muestra	20	5	-----	-----	50

Donde la composición del Buffer de reacción es Imidazol 25 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1 mg./ml. pH= 7,4.

En este momento se realiza una preincubación en baño de agua termostatzado a 30 °C por 10 min. para permitir el contacto de la enzima con el resto de los componentes y en caso de haber toxinas presentes, que se produzca la inhibición de la enzima.

Pasado este tiempo se retira del baño calefactor, se lleva al baño de hielo donde se agrega a cada tubo 20 µl. de Buffer sustrato (pNPP aproximadamente 39 mM en Buffer de Reacción) y se incuba en las mismas condiciones 60 min más; durante los cuales se llevará a cabo la reacción enzimática que generará el producto coloreado.

Por último se detiene la reacción por agregado de 500 µl. de NaOH 0,25 N a cada tubo.

Finalmente se mide la absorbancia a 405 nm de cada tubo llevando a cero el espectrofotómetro con NaOH 0,25 N y se realizan los gráficos y cálculos correspondientes.

Cálculos y gráficos

Como estamos trabajando con una reacción de inhibición enzimática, debemos tener en cuenta que a mayor concentración de inhibidor presente, en este caso las toxinas mencionadas, menor será la actividad que presente la enzima y por lo tanto

menor será la cantidad de producto coloreado formada con lo cual se observará una menor absorbancia.

Así el blanco de reacción, al cual no se le agrega toxina, presentará la mayor actividad y por ende será el que presente la mayor absorbancia; mientras que el patrón de toxina de mayor concentración será el que presente la mayor inhibición y por lo tanto el que exhiba la menor absorbancia.

Se grafica la absorbancia o el porcentaje de inhibición (% Inhib) en función de la concentración (Fig.14) de toxina usada en la curva de calibración [MC-LR]

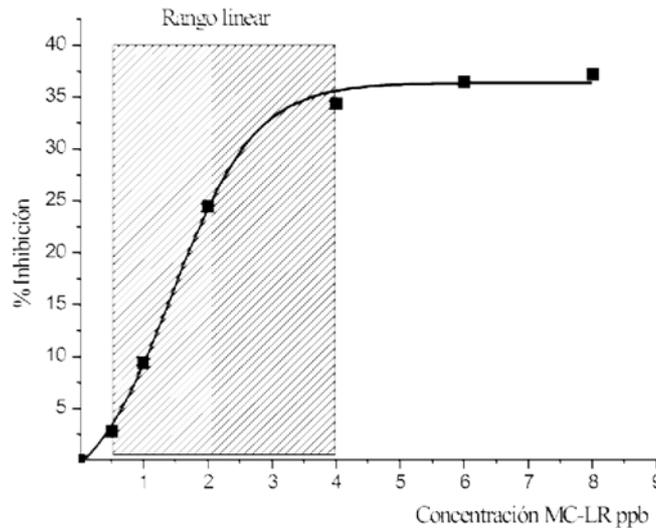


Fig. 14. Curva de calibración % Inhibición vs. Concentración MC-LR para el ensayo de inhibición de proteína fosfatasa. El área rayada indica el rango lineal del método.

El % Inhibición se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhib} = 100 - (\text{Abs}_x \times 100 / \text{Abs}_{\text{bco}})$$

Abs_x = absorbancia de la muestra o, en el caso de la curva de calibración, de los patrones de distinta concentración.

Abs_{bco} = absorbancia del blanco de reacción.

Los resultados se expresan en términos de concentración (ppb) MC-LR equivalente o en términos de equivalencia a la toxina usada en la curva de calibración si ésta fuera distinta de MC-LR; los valores obtenidos son sólo orientativos y no servirán para cuantificar.

Es necesario realizar una curva de calibración para cada conjunto de determinaciones realizadas, siendo imposible utilizar una curva obtenida en otro momento debido a que los factores como temperatura y tiempo de incubación influyen fuertemente sobre los resultados obtenidos.

7. 5. 3. 3. Ensayo ELISA

Son métodos de análisis preliminares que deberían ser confirmados por métodos más robustos. Los ensayos ELISA se encuentran disponibles comercialmente y son en su totalidad desarrollados en América del Norte y Europa por lo que hay que tener cuidado en el transporte asegurando que se cumplan las condiciones estipuladas por el fabricante. Actualmente existen ensayos inmunológicos para microcystinas, saxitoxinas y cilindrospermopsinas.

Los ensayos ELISA se basan en el principio fundamental de la interacción específica antígeno-anticuerpo, donde el anticuerpo diseñado para tal fin es capaz de reconocer un epítopo, sección particular de la estructura de la molécula, característico del antígeno. Luego se acopla algún sistema que permita poner de manifiesto dicha reacción inmunológica. Usualmente para tal fin se utilizan antígenos o anticuerpos conjugados con alguna enzima, por ejemplo fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, peroxidasa, que al ser enfrentada a su sustrato característico generan un producto coloreado o que emite fluorescencia al ser excitado a una longitud de onda específica. De esta forma, determinando la absorbancia o la fluorescencia emitida por el producto puede obtenerse la concentración del antígeno.

Existe una gran variedad de ensayos ELISA en cuanto a la modalidad por la cual se lleva a cabo la reacción inmunológica, la detección y a la presentación del kit comercial. Así tendremos ELISA directo, indirecto, competitivos, entre otros, y para estos las presentaciones comerciales en microplacas con posillos de 350 μ l o en tubo donde el volumen de reacción alcanza varios mililitros.

Dependiendo del equipamiento con el que se cuenta en el laboratorio se seleccionará el kit a utilizar, ya que por ejemplo para realizar la determinación con un kit en microplacas deberemos contar con un lector de microplacas.

Los ensayos ELISA más utilizados para la determinación de microcystinas son los ensayos competitivos, en los cuales dependiendo de la presentación comercial en particular, el antígeno (microcistina) contenido en la muestra compete con un antígeno marcado agregado junto con la muestra (Fig. 15) o con el antígeno fijado en el soporte sólido (Fig.16) por un anticuerpo específico que actúa como reactivo limitante.

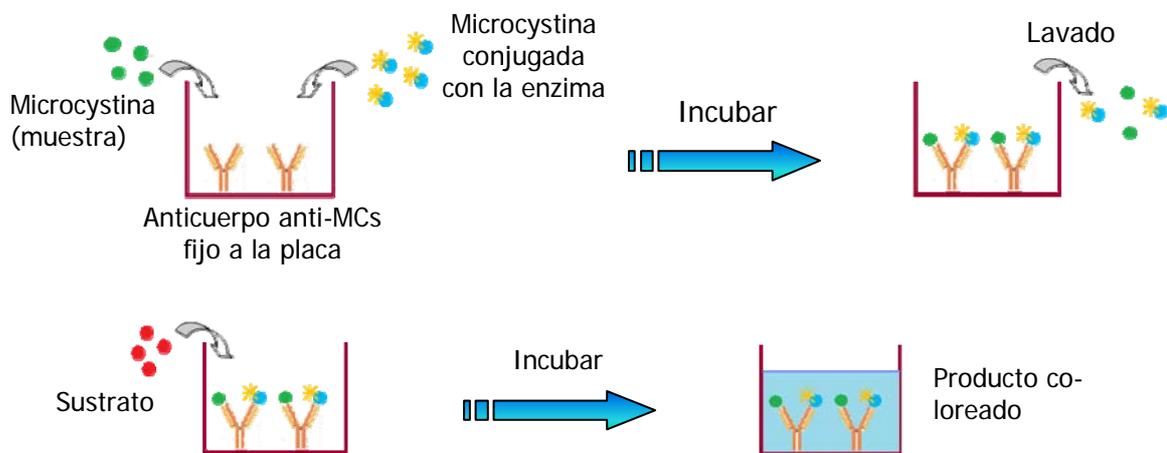


Fig. 15. ELISA competitivo utilizando Microcystina conjugada con una enzima.

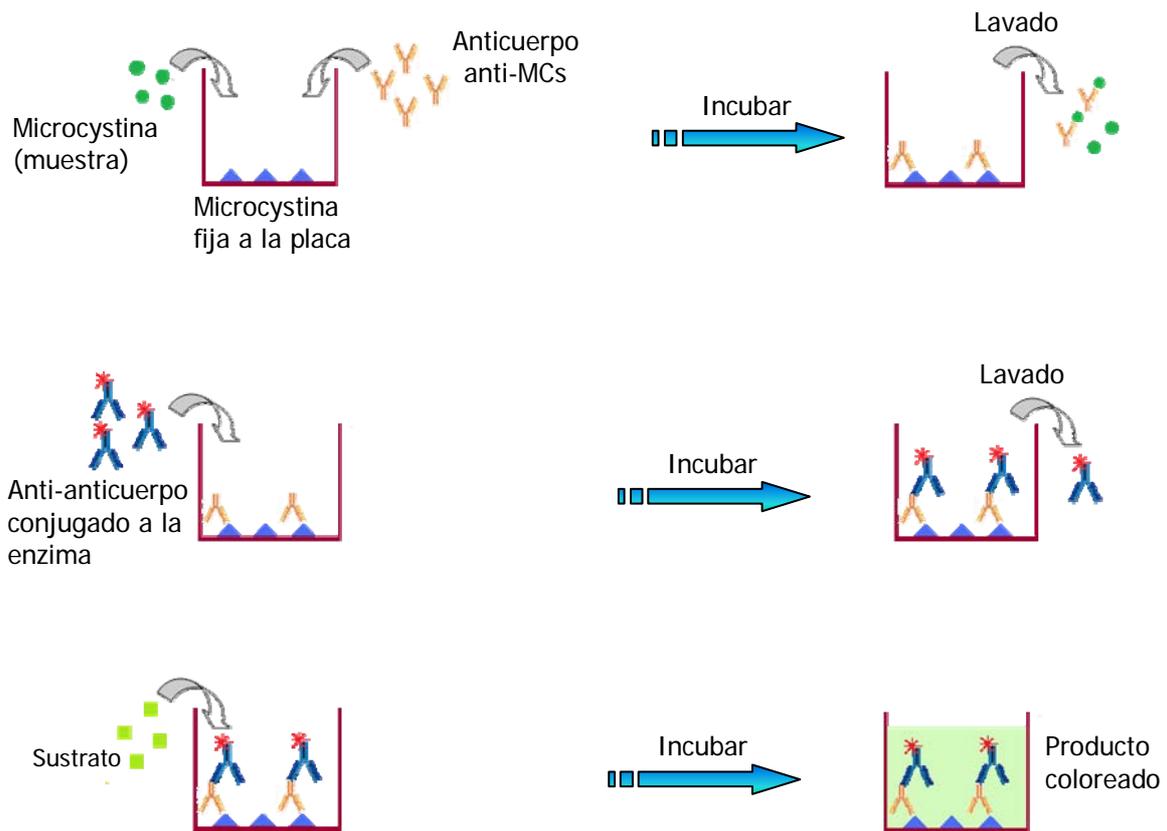


Fig. 16. ELISA competitivo utilizando Microcystina fija a la placa y un anticuerpo conjugado a la enzima para detección

En ambos casos, cuanto mayor sea el contenido de toxina en la muestra, mayor será la competencia por el anticuerpo y menor será la cantidad de producto coloreado generado; por lo tanto en este tipo de ensayos la concentración de la toxina será inversamente proporcional a la señal detectada.

Debe tenerse en cuenta que cada kit comercial tiene sus especificaciones particulares, las cuales deben seguirse cuidadosamente para asegurar el éxito de la determinación.

Así mismo, estos ensayos presentan ligeras diferencias en cuanto a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo, basadas en pequeñas diferencias estructurales, para los distintos congéneres de toxina; por lo cual exhiben leves variaciones en los niveles de detección para las distintas microcystinas.

Los ensayos ELISA, si bien pueden detectar pequeñas concentraciones de toxina, presentan su mayor valor como ensayos preliminares ya que pueden darse reacciones cruzadas y no permite discriminar o asignar identidad a las distintas toxinas que pudieran estar presentes en la muestra; lo cual si es posible mediante métodos analíticos como HPLC.

7. 5. 4. Métodos Analíticos. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución permite la identificación y cuantificación de las toxinas producidas por cianobacterias siendo una metodología específica y sensible, aceptada internacionalmente y que permite la intercalibración con otros laboratorios, el desarrollo de otros métodos químicos o biológicos y el control de los "kits" que se ofrecen comercialmente.

En este tipo de análisis sólo se observan las toxinas para las cuales se ha diseñado el método. Además, son necesarios los estándares analíticos los cuales son de difícil acceso ya que pueden no estar disponibles comercialmente y/o presenta algunas dificultades para su importación por su condición de toxinas (saxitoxina es un arma química de nivel 1).

A continuación se presentan las características particulares de los métodos de HPLC para las distintas toxinas, ya que debido a sus diferentes estructuras será necesario utilizar distintos pretratamientos de muestras, columnas, solventes, condiciones de corrida y detección.

7. 5. 4. 1. Detección de Microcystinas

Preparación de las muestras:

Se podrán emplear las muestras resultantes de los procesamientos explicados previamente para la determinación de toxinas disueltas, intracelulares y/o totales.

En el caso de las Microcystinas se pueden emplear filtros SPE (extracción en fase sólida) C 18 de 1 o 1,5 gr previamente activados con metanol y equilibrados con agua tal como se explicó anteriormente.

Equipo necesario:

En este caso el análisis se llevará a cabo utilizando un equipo de HPLC (Fig.17) con bombas binarias, un inyector, una columna C18 (150 X 4,6 mm de 5 µm de poro) y detector UV óptimamente con arreglo de diodos.

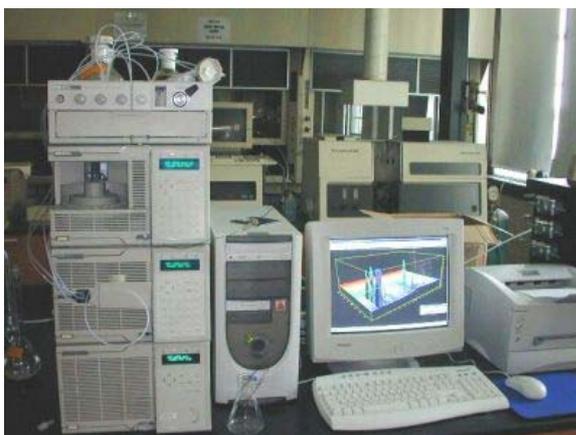


Fig. 17. Equipo de HPLC

La técnica se llevará a cabo en condiciones isocráticas y con detección UV de ser posible con arreglo de diodos (DAD).

Columna: Columna C18 de 150 X 4,6 mm de 5 µm de poro.

Fase móvil: se emplearán dos soluciones de distinta composición.

Solución A: Agua destilada y desionizada 0,05% de TFA.

Solución B Acetonitrilo 0,05% de TFA.

Velocidad de Flujo: 1ml/min.

Se equilibra la columna con una solución de composición A 65% y B 35 %.

Se utiliza el siguiente gradiente, esperando 5 minutos entre corridas consecutivas.

Detección: UV a 238 nm.

7. 5. 4. 2. Detección de Saxitoxina

Preparación de la muestra:

Se podrán emplear las muestras resultantes de los procesamientos explicados previamente para la determinación de toxinas disueltas, intracelulares y/o totales. Específicamente para muestras de fitoplancton se podrá utilizar 0,5 a 1 gr. de fitoplancton húmedo, sobre el cual se realizará una extracción con 1 ml. de HCl 0,01 N frío y 2 ml. de una solución cloroformo/metanol (1:1, v:v) agitando en vortex durante 30 seg. y luego realizando dos ciclos de sonicación de 30 seg. cada uno con un intervalo de 30 seg. entre ellos.

Seguidamente se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min. para permitir que se separen las fases. Se separa la fase acuosa, que contiene las toxinas, y se la guarda en hielo.

Sobre la fase orgánica remanente se realiza una segunda extracción utilizando 0,5 ml. de HCl 0,01 N repitiendo el procedimiento anterior.

Se juntan las fases acuosas y se evapora el remanente de cloroformo/metanol en baño de María a 50 °C con corriente de nitrógeno gaseoso.

Se lleva a volumen (2 ml.) con agua bidestilada y previo a inyectar en el HPLC se pasan por filtro de nylon de 0,45 µm.

Equipo necesario:

El equipo de HPLC constará de una bomba de pistón de alta presión, un inyector Rheodyne 7725i (loop 10, 20 µl.), una columna de Sílica C8 fase reversa (150 x 4,6 mm, 3 µm.) una bomba de dos cabezales para agregar el agente oxidante y el ácido que se utilizarán en la derivatización post-columna, cámara de reacción post-columna con baño termostaticado (65°C) y detector fluorescente.

Condiciones de corrida cromatográfica:

La técnica se llevará a cabo en condiciones isocráticas, utilizando derivatización post-columna y detección fluorescente. La información obtenida se procesa en un computador con un programa que permite registrar el cromatograma e integrar las áreas de los picos aislados correspondientes a las toxinas.

Las condiciones de corrida a emplear para el grupo de Saxitoxinas según Oshima, 1995 son:

Columna: Sílica C8 (150 x 4,6 mm, 5 μ m.), Fase reversa

Fase Móvil: 2 mM 1-heptasulfonato de sodio en 30 mM de fosfato de amonio, pH 7,1 en 5% de acetonitrilo. Velocidad de flujo: 0,7 ml/min.

Agente Oxidante: Ácido periódico 7mM en buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 9. Flujo: 0,4 ml/min.

Cámara de reacción post-columna: coil de 10 m (0,5 mm i.d.) a 65 °C.

Agente acidificante: Ácido acético 500 mM. Flujo: 0,3 ml/min.

Detección: Fluorescencia, λ Ex: 330 nm. , λ Em: 390 nm.

7. 5. 4. 3. Detección de Cilindroespermopsina

Preparación de la muestra:

Se filtra la muestra siguiendo los métodos explicados anteriormente utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C y luego se congelan los filtros - 20°C.

Sobre éstos se agrega ácido acético al 5% y se somete a agitación durante una hora.

Luego se realiza una centrifugación a 4000 g durante 10 min y se concentra el extracto utilizando columnas de SPE Waters Oasis MCX.

Equipo necesario:

Equipo de HPLC con detección UV óptimamente con arreglo de diodos (DAD).

Condiciones de corrida:

Las condiciones de corrida según el método para detección de cilindroespermopsina desarrollado inicialmente por Harada et al. (1994) son:

Columna: columna compatible con Allsphere ODS-2 μ m, 250 x 4.6mm d.i (Alltech)

Fase móvil: durante los primeros 10 min se establece un gradiente de 0 a 5% de metanol, luego se continúa con un régimen isocrático con metanol al 5% durante 10 min. más.

Detección UV a 262 nm. Si se cuenta con DAD se debe observar el espectro UV.

7. 5. 4. 4. Detección de Anatoxina

Preparación de la muestra:

Se podrá comenzar filtrando la muestra, según se describe en la sección 7.2.1.2. para toxinas intracelulares, y luego se realiza una extracción de la toxina con metanol al 50% acidificando con HCl 0,01 N, agitando durante una hora.

Se centrifuga, se separa el sobrenadante y se evapora a sequedad en rotavapor (40 °C)

Por otro lado se evapora también a sequedad en rotavapor un volumen determinado del líquido filtrado inicialmente.

En ambos casos se resuspende el residuo en 10 ml de agua desionizada, y luego se purifican por SPE (Octadecil C18, Bakerbond).

Equipo necesario:

Sistema de HPLC con detector de fluorescencia.

Condiciones de corrida:

Las condiciones de corrida según James et al, 1997 son:

La anatoxina se eluye con metanol conteniendo 0,2 % TFA.

La derivatización fluorométrica se realiza de la siguiente manera: la muestra se mezcla con bórax 0,1 M y 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) incubándose 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se detiene la reacción con HCl 1M.

Detección: fluorescencia λ Ex: 470 nm, λ Em: 530 nm

7. 5. 4. 5. Cálculos y evaluación de resultados

De los cromatogramas se podrán extraer los siguientes parámetros:

Tiempo de retención (Rt): este parámetro será característico de cada toxina y nos servirá para identificarla, siempre que se realice la cromatografía en las mismas condiciones, es decir, empleando la misma fase móvil y fase estacionaria.

Área bajo la curva (AUC): representa la cantidad en masa de cada toxina o compuesto. El AUC para cada pico depende del volumen de muestra inyectado, por lo cual es conveniente inyectar siempre el mismo volumen tanto para la muestra como para los estándares. De esta manera se simplificarán notablemente los cálculos.

Se debe trabajar con estándares analíticos, los cuales tienen especificada la o las toxinas que contienen y en que concentración se presentan las mismas.

Gracias a esto podremos relacionar específicamente el Rt obtenido como indicador de identidad de la toxina del estándar y el área bajo el pico (AUC) con la concentración de dicha toxina en el patrón, para las condiciones de corrida utilizadas.

Cuando realizamos una determinación por HPLC comenzamos corriendo el estándar y del cromatograma obtenido determinamos los Rt.

Luego, en las mismas condiciones, se corre la muestra y se comparan los distintos Rt obtenidos en éste caso con los extraídos del cromatograma anterior, con el fin de identificar la o las toxinas presentes en la muestra. Se podrá asignar identidad para un determinado pico cuando la coincidencia en Rt respete la siguiente condición: $Rt \pm 0,2$ min.

Para asegurar estos resultados, si se cuenta con detector con arreglo de diodos, se podrán comparar los espectros de absorción de las sustancias.

Del mismo modo, en los casos en los que no sea posible identificar alguna toxina contenida en la muestra debido a la falta de estándares, si se cuenta con un detector con arreglo de diodos podremos determinar si se trata de una Microcystina evaluando su espectro de absorción (Fig. 18)

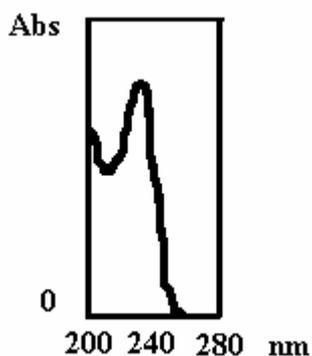


Fig. 18. Espectro de absorción UV de MCs

A continuación se presenta un ejemplo práctico de los datos obtenidos del cromatograma (Fig. 19) y los cálculos que deben realizarse.

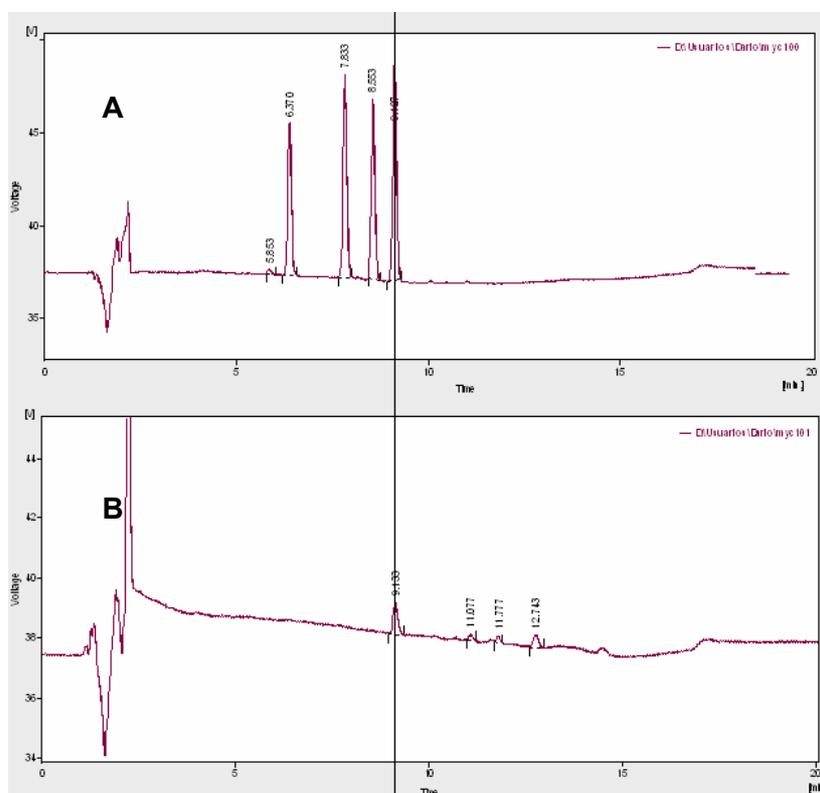


Fig. 19. Cromatograma de dos corridas de HPLC para la detección de MCs. A) Estándares analíticos de MC RR, Nod, YR y LR respectivamente en orden de salida B) Muestra de agua de red donde se aprecia un pico que se corresponde por el Rt con MC LR, al que siguen al menos 3 picos que no se pueden identificar por falta de estándares analíticos. Para la identificación de estos 3 picos debemos recurrir a obtener su espectro de absorción.

Para los estándares, el cromatograma A arroja los siguientes datos:

Rt (min)	AUC	Identidad	Concentración (ppm)
6.37	48	MC-RR	5
7.83	65	Nod.	5
8.55	58	MC-YR	5
9.10	53	MC-LR	5

Para la muestra procesada (cromatograma B) tendremos:

Pico N°	Rt (min)	AUC
1	9.11	6.5
2	11.10	3.2
3	11.78	2.5
4	12.74	3.1

Comparando ambas tablas podemos concluir que el primer pico, con un Rt de 9,11 minutos, puede asignarse a MC-LR ya que la misma presentó un Rt de 9,10 minutos en el cromatograma correspondiente a los estándares; mientras que los picos restantes no coinciden con ninguno de los Rt correspondientes a los patrones, por lo tanto en estas condiciones no tenemos las herramientas necesarias como para asignarles identidad alguna.

Una vez asignada la identidad a cada pico, en los casos en los que sea posible, se procede a calcular la concentración de las distintas toxinas en la muestra.

Para ello debe considerarse los pasos realizados en el pretratamiento de la muestra con el fin de introducir los factores de corrección necesarios.

A modo de ejemplo, consideremos el procedimiento que se realiza sobre una muestra de agua corriente para determinar toxinas, representado en el esquema de la figura 20.

Se observa que partiendo de un volumen de muestra de 2 litros, luego del pretratamiento, se concentran las toxinas contenidas en la muestra en un volumen de 10 ml, de los cuales se inyectan en el HPLC sólo 20 µl.

En este caso los cálculos a realizar serán:

1) Con el mismo volumen de inyección para estándares y muestras, por comparación directa de las áreas obtenemos la concentración de la toxina en los 20 µl inyectados realizando el siguiente cálculo:

$$[\text{TOX}_{\text{mtra}}] = (\text{AUC}_{\text{mtra}} \cdot [\text{St}]) / \text{AUC}_{\text{St}}$$

$[\text{TOX}_{\text{mtra}}]$ = concentración de la toxina en el volumen inyectado en el HPLC

AUC_{Mtra} = área bajo la curva del pico que representa a una toxina en particular en la muestra. Este dato es proporcionado por el programa del computador que está asociado al equipo.

$[\text{St}]$ = concentración del estándar correspondiente.

AUC_{St} = área bajo la curva del pico correspondiente a la toxina en el cromatograma correspondiente a los estándares.

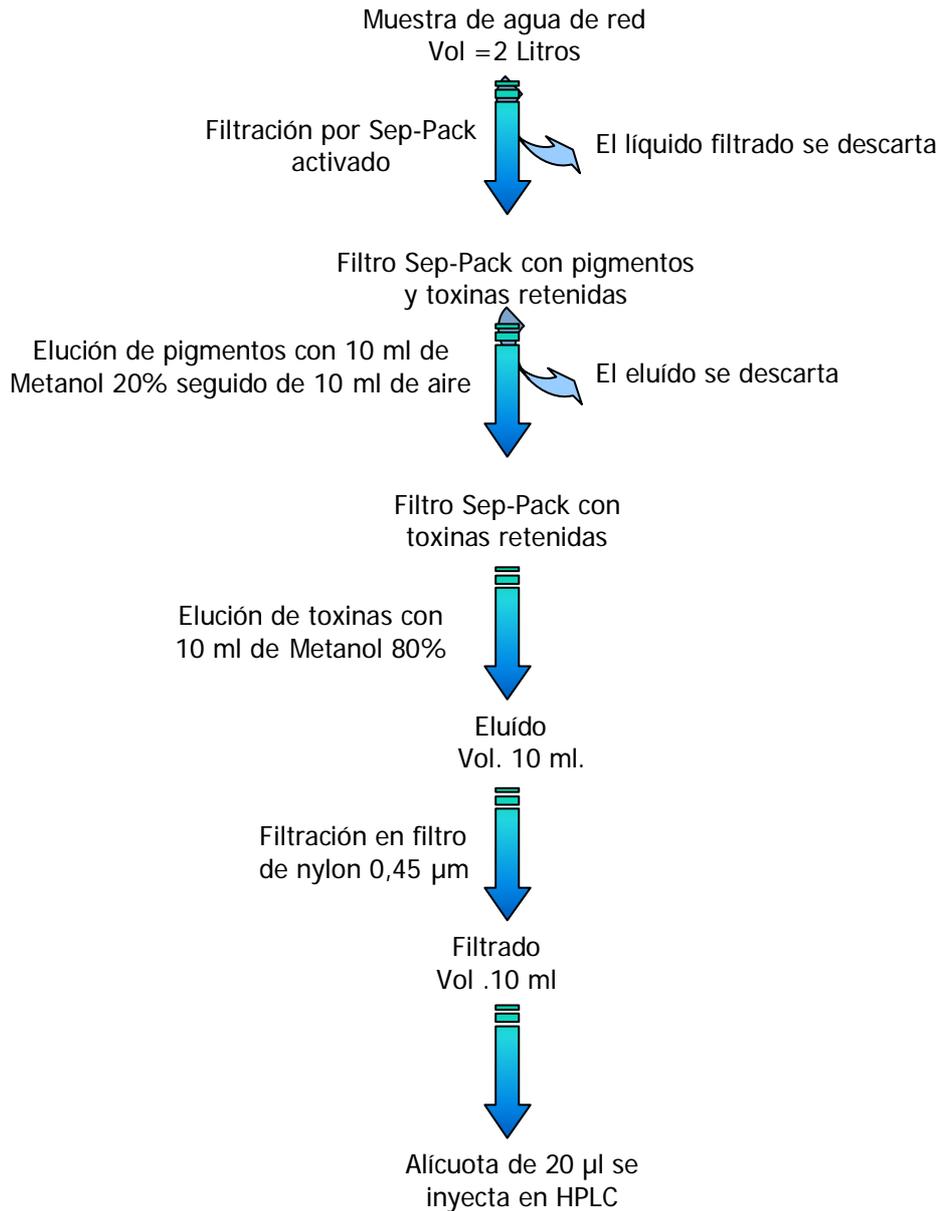


Fig. 20. Esquema del tratamiento realizado para concentrar toxinas presentes en agua de red

En nuestro ejemplo el valor obtenido será:

$$[\text{MC-LR}] = (6,5 \cdot 5 \text{ ppm}) / 53 = 0,61 \text{ ppm}$$

2) A partir de esta concentración calculamos el contenido de toxina en la muestra mediante el siguiente razonamiento:

Multiplicando el volumen del eluido en ml (para este ejemplo 10 ml.) por la concentración hallada en la parte 1), obtendremos la cantidad en µg de toxina contenida en dicho volumen.

$$\mu\text{g MC-LR} = 10 \text{ ml} \cdot 0,61 \mu\text{g/ml} = 6,1 \mu\text{g}$$

Luego teniendo en cuenta que, debido al tratamiento que realizamos sobre la muestra, estos µg de toxina estaban contenidos en el volumen original de muestra y

que debemos expresar el resultado como ppb (partes por billón) o µg/l de MC-LR, debemos realizar el siguiente cálculo:

$$[\text{MC-LR}] \text{ ppb} = (1000 \cdot \mu\text{g MC-LR}) / \text{Vol mtra}$$

$$[\text{MC-LR}] \text{ ppb} = (1000 \cdot 6,1) / 2000 = 3,05 \text{ ppb}$$

En base a éstos cálculos podemos decir que en la muestra procesada encontramos MC-LR en una concentración de 3,05 ppb.

Bibliografía

- APHA 1998 Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, ANWA & WPCF, Washington.
- HAWKINS, PR.; CHANDRASENA, NR.; JONES, GJ.; HUMPAGE, AR.; FALCONER, I.R. 1997. Isolation and toxicity *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35: 341-346.
- HENRIKSEN, P., CARMICHAEL, W. W., AN, J., MOESTRUP, O. 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds *Toxicon*, 35: 66 901-913
- LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S. and OSHIMA, Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brasil. *Toxicon* 37: 1359-1373.
- MARKER, A.; NUSCH, E., RAI, H.; RIEMANN, B. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standarization of methods: conclusions and recommendations. *Archives of Hydrobiology, Egebn. Limnol.* 14: 91-106.
- MOLICA, R.; ONODERA, H.; GARCÍA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; SIVIA, N.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.; LAGOS, N. 2002. Toxins in the freshwater *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41: (6), 606-611
- NICHOLSON, B.; BURCH, M. 2001. Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxinas in relation to Australian drinking waters guidelines
- OSHIMA, Y. 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC International* 78: 528-532.
- PEREIRA, P.; ONODERA, H.; ANDRINOLO, D.; FRANCA, S.; ARAUJO, F.; LAGOS, N.; OSHIMA, Y. 2000 (a) Co-occurrence of PSP toxins and microcystins in Monteargil freshwater reservoir, Portugal. *Harmful Algal Blooms* (Eds. Hallegraeff G, Blackburn S, Bolch C, Lewis R), pp. 108-111, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001.
- PEREIRA, P.; ONODERA, H.; ANDRINOLO, D.; FRANCA, S.; ARAUJO, F.; LAGOS, N.; OSHIMA, Y. 2000 (b) Paralytic Shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Monteargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38: 689-1702.
- SCOR-UNESCO. 1966. Determination of photosynthetic pigments in seawater. *Monographs on Oceanographic Methodology*, UNESCO, Paris, vol. 1, p.11 – 18.
- ROSET, J.; AGUAYO, S.; MUÑOZ, MJ. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol* 18: 65-71.
- SIVONEN, K.; JONES, G. 1999. Cyanobacterial toxins. En: *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management* (Eds. Chorus I, Bartram J), cap. 3, pp. 41-111, E. & F. N. Spon, London.
- UTERMÖHL, H. 1958. Vervollkommung der quantitative Phytoplankton Methodik. *Mitt. Int. Verein. Limnol.* 9: 1-38.
- ZOTOU, A.; JEFFERIES, T.; BRUGH, P.; GALLAGHER, T. 1989. Determination of anatoxin-a and homoanatoxin-a in blue-green algal extract by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 481: 358-362.

Capítulo 8:

Herramientas moleculares para la detección de estirpes de cianobacterias productoras de toxinas

Graciela L. Salerno
Fabiana Consolo
Corina Berón

8. 1. Introducción

Son numerosas las estirpes de cianobacterias que pueden desarrollar crecimientos extensivos, conocidos como florecimientos. La identificación morfológica, según se describió en capítulos anteriores, permite identificar un gran número de estas estirpes, y monitorear su presencia a través de la identificación microscópica y el recuento celular. Esta práctica puede ser implementada con bajo costo y después de un entrenamiento técnico adecuado. Sin embargo, esta metodología no permite distinguir entre cepas con potencialidad para producir toxinas de aquéllas que no lo hacen, estando bien documentado que en una floración pueden estar presentes ambos tipos de estirpes. El diagnóstico precoz de cepas tóxicas por microscopía óptica ha sido muy difícil debido a que no hay una correlación entre rasgos fisiológicos y características morfológicas (tamaño y forma celular) con la producción de toxinas.

Los métodos de detección molecular ofrecen una alternativa de suma utilidad para la identificación precoz de poblaciones productoras de toxinas presentes en ambientes naturales y ofrecen la ventaja que pueden detectar estirpes que están en muy baja concentración. Por otra parte, estos análisis se pueden hacer directamente con muestras ambientales y no requieren el aislamiento y cultivo de las cepas. Además de ser rápidos y simples, su costo está ampliamente compensado por su alto grado de sensibilidad y especificidad, lo que permite también hacer ensayos de grandes cantidades de muestras. Dentro de estos métodos de detección, están siendo ampliamente utilizados aquéllos basados en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que está basado en la detección de fragmentos de ácidos nucleídos relacionados con la síntesis de toxinas. Una vez que se ajustó esta metodología con cepas aisladas, se adaptó a muestras ambientales, por lo que puede ser aplicada directamente a las muestras de agua. Estas herramientas moleculares han demostrado ser altamente sensibles para detectar linajes de cianobacterias productoras de toxinas, principalmente, microcistinas, pero también cepas que sintetizan nodularinas y cilindrospermopsinas. Estos resultados han dado lugar al desarrollo de ensayos para ser utilizados para detectar precozmente las floraciones tóxicas y cuantificar la producción de toxinas.

En este capítulo se hará una breve revisión de los métodos moleculares empleados a nivel mundial en la caracterización e identificación de cianobacterias tóxicas presentes en ambientes naturales, sus alcances y limitaciones. Si bien las técnicas moleculares empleadas son sencillas, altamente reproducibles y muy específicas, es conveniente que el personal que las utilice por primera vez reciba capacitación previa. Este entrenamiento es importante, por un lado, para evitar gastos innecesarios en la puesta

a punto de las metodologías y por otro, para utilizar criterios similares en los distintos laboratorios que realizan identificación y caracterización de cianobacterias tóxicas. En este capítulo, se pretende entonces, dar un panorama de las respuestas que pueden brindar las nuevas metodologías.

8. 2. Fundamentos de los ensayos desarrollados para la identificación y clasificación de las cianobacterias con potencialidad de producir toxinas

Secuencias de genes más informativas usados actualmente para identificar cepas de cianobacterias

Para la caracterización de cepas cianobacterianas usando metodologías basadas en PCR, es necesario conocer previamente las secuencias nucleotídicas codificantes de algún gen (fragmentos de ADN) que sean esenciales y/o característicos de estos microorganismos, y que presenten dos características: i) las secuencias de nucleótidos deben estar muy conservadas en las distintas estirpes, pero ii) en alguna región de ellas debe haber una subregión de secuencia de nucleótidos variable, lo cual permitirá diferenciar las cepas, como si fueran “huellas dactilares”. Se han usado varios genes que cumplen estos requisitos, y hay muchos trabajos publicados que demuestran su utilidad. Se mencionan a continuación los genes más importantes usados para identificar cepas de cianobacterias tanto aisladas como presentes en muestras de ambientes naturales.

Las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican subunidades de los ARN ribosomales (ARNr) características de organismos procariotas fueron las primeras utilizadas para la caracterización molecular de cianobacterias, permitiendo un gran avance en la ecología microbiana. Los ARNr son componentes esenciales celulares involucrados en la síntesis de las proteínas y tienen un elevado nivel de conservación. Las variaciones en las secuencias de nucleótidos del gen codificante de la subunidad ribosomal 16S (*ARNr 16S*) ha sido la que más frecuentemente fue usada para la identificación de micrororganismos. La identificación de las cepas está basada en las diferencias encontradas en las secuencias del *ARNr16S*, obtenidas por la metodología de PCR, usando cebadores especialmente diseñados y programas adecuados para la amplificación de la secuencia de interés. También ha sido utilizada como herramienta la comparación de las secuencias nucleotídicas de una región espaciadora entre genes ribosomales (ITS). Estas técnicas aportaron datos de secuencias de las regiones genómicas mencionadas que permitieron establecer las primeras relaciones filogenéticas entre especies hepatotóxicas presentes en floraciones, principalmente de *Microcystis* sp. La utilización de estas secuencias, en general, permite identificar géneros de cianobacterias potencialmente tóxicas, pero no permite hacer diagnósticos seguros de toxicidad en muestras naturales, ya a que las cepas tóxicas y no tóxicas de *Microcystis* presentan una distribución errática en las floraciones. Una excepción ha sido la posibilidad de diferenciar miembros tóxicos y no-tóxicos del género *Nodularia* a partir de la comparación de secuencias de *ARNr16S*. Hace pocos años (en 2005) se publicó la determinación de la diversidad de cepas de *Cylindrospermopsis* por métodos moleculares presentes en cuatro continentes.

También se utilizan las secuencias de una región entre dos genes involucrados en la síntesis de la ficocianina (PC), un pigmento característico de las cianobacterias. A estas secuencias se las denomina intergénicas (IGS, “intergenic sequences”). La identificación está basada en comparar las secuencias intergénicas de los genes de la fico-

cianina (IGS-PC) obtenidas por secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por la metodología basada en PCR y cebadores y condiciones adecuadas, con registros depositados en bases de datos públicas. En general, con el conocimiento del largo y de la secuencia de las regiones IGS-PC se puede predecir el género de las cianobacterias presentes en la muestra con alta certeza, y en algunos casos hasta la especie. En estudios recientes se pudieron distinguir distintos miembros de los géneros *Microcystis*, *Anabaena* y *Nodularia*.

8. 3. Identificación molecular de cepas tóxicas y de las toxinas que pueden producir

Una alternativa a los ensayos biológicos, fisico-químicos y bioquímicos para la identificación y detección de cianotoxinas la ofrecen las técnicas moleculares, de alta sensibilidad y especificidad con un enorme potencial para ser aplicadas en muestras ambientales directamente.

Las estructuras de las cianotoxinas son complejas y diversas. La producción de estas toxinas en las células cianobacterianas requiere la participación de varias proteínas (involucra complejos enzimáticos) codificadas por genes agrupados en operones presentes en los genomas de las cianobacterias potencialmente tóxicas. Es importante resaltar que el hecho de que un microorganismo lleve la información genética necesaria para la biosíntesis de determinada toxina, no significa que la va a producir en cualquier momento, sino que tiene la potencialidad de hacerlo, bajo determinadas condiciones aún no del todo dilucidadas. Básicamente, las metodologías para detectar cianobacteria potencialmente tóxicas y para conocer qué cianotoxinas podrían producir, se basan también en la aplicación de la tecnología de la PCR y el diseño de cebadores específicos que tienen como blanco alguno de los genes involucrados en la síntesis de una dada toxina. Para desarrollar estos protocolos moleculares es necesario conocer previamente las secuencias de los genes involucrados en la biosíntesis de cada toxina. En la actualidad, por análisis fisicoquímicos se han descrito cientos de toxinas, pero sólo de las abundantes y frecuentes se conocen los mecanismos de síntesis.

Recién en el año 2000 se dio a conocer por primera vez la organización estructural y la secuencia completa del grupo de genes involucrados en la biosíntesis de microcistina (genes *mcy*) en *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Más recientemente se publicaron las secuencias de genes involucrados en la biosíntesis de nodularina (genes *nda*) y en el corriente año se conocieron las secuencias de los genes responsables de la síntesis de cilindrospermopsina (genes *cyr*). Es importante resaltar que los *mcy* y los *nda* pueden estar presentes en más de una cepa (*Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Planktothrix*). Hasta el presente, no se han podido describir los grupos génicos responsables de la síntesis de neurotoxinas, anatoxinas y saxitoxinas en cianobacterias.

Los conocimientos recientemente adquiridos sobre las secuencias de los operones involucrados en la producción de las toxinas sentaron las bases para el desarrollo de los métodos actuales para detectar cepas productoras de toxinas. Es así que el potencial tóxico de un florecimiento se puede determinar aislando del ADN ambiental total y aplicando la tecnología de la PCR usando cebadores para pasos claves del camino de la síntesis de cada toxina. Sin embargo estos resultados no relacionan la presencia de la toxina a una estirpe dada, sino que indican la potencialidad de que en la floración se encuentren la/s toxina/s cuyos gen/es haya/n dado positivo/s en el ensayo. Una gran ventaja que ofrece este enfoque experimental es que se puede detectar la presencia de cepas toxigenas que sean muy minoritarias en la floración, y hasta indetec-

tables al microscopio óptico, ya que no es necesario el aislamiento y cultivo de las células.

8. 4. Ensayos de PCR para detectar cianobacterias tóxicas

Los métodos moleculares que más se usan en la actualidad para detectar y cuantificar cianobacterias hepatotóxicas, como por ej. del género *Microcystis* emplean tecnología basada en la PCR y cebadores diseñados que tienen como blanco a los genes *mcyB* o *mcyA* o *mcyE*. Los estudios con estos iniciadores demostraron tener una muy buena correlatividad entre la identificación de *Microcystis* tóxicas y la presencia de microcistina, analizada por alguno de los métodos descritos en este manual. Un trabajo más reciente propone usar el cebador universal para *mcyE* (*mcyE*-F2) y el oligonucleótido reverso específico del género correspondiente (*mcyE*-12R2, *mcyE*-R8, *mcyE*-plaR3, para detectar especies de los géneros *Anabaena*, *Microcystis* y *Planktothrix*, respectivamente). Con este enfoque metodológico fue posible detectar y diferenciar cepas con potencialidad para producir toxinas en un florecimiento en Finlandia.

Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de ajustar para casos particulares el diseño de cebadores adecuados, basándose en las experiencias anteriores, pero que cubran los géneros encontrados en cada cuerpo de agua que se quiera monitorear o estudiar la dinámica poblacional de las cianobacterias potencialmente tóxicas presentes. Es importante destacar que, varios estudios han revelado que ciertas cepas que poseen genes *mcy* no producen toxinas. Se han realizado varios estudios para determinar las causas de este fenómeno pero la principal conclusión a que se ha llegado es que los ensayos moleculares basados solamente en presencia de *mcy* pueden llevar ocasionalmente a resultados erróneos. Para asegurar la calidad del agua de suministro público, se aconseja hacer ensayos de toxicidad suplementarios (por ejemplo físico-químicos o bioquímicos).

Los ensayos moleculares basados en los genes *nda* (involucrados en la producción de nodularina) de cepas de *Nodularia* son mucho más confiables que los basados en los genes *mcy*. La razón principal es que la producción de nodularina está limitada a las cepas de *N. spumigena*, siendo todas productoras de nodularina y son toxígenas. Por el contrario, otras cepas de *Nodularia* (por ej. *N. harveyana* y *N. sphaerocarpa*) no son tóxicas y carecen de genes *nda*.

Recién en 2008 se conocieron las secuencias de los genes responsables de la síntesis de cilindrospermopsinas, por lo que aún no hay reportes con resultados de ensayos ambientales. Sin embargo, estos hallazgos permitirán el diseño de ensayos específicos para identificar cepas tóxicas productoras de estas toxinas.

En la actualidad se están ensayando técnicas moleculares más complejas con mayor capacidad de diagnóstico, extrayéndose inclusive el ARN ambiental total. Estas novedosas técnicas hacen uso de la metodología de PCR cuantitativa en tiempo real que va a ser una poderosa técnica en el futuro, aunque todavía no está al alcance de la mayoría de los laboratorios para uso de rutina.

En resumen, en el presente el uso de herramientas moleculares permite identificar tempranamente y con certeza el género, y muchas veces la especie de cianobacterias presentes en una floración, en muy corto tiempo, con metodologías factibles de implementar. También es posible aportar información sobre la existencias de cianobacterias portadoras de la capacidad genética como para sintetizar ciertas toxinas. Sin embargo, se necesita todavía contar mayor información sobre los caminos sintéticos de otras toxinas y que se hagan estudios que comprueben la correlación entre los datos moleculares y los resultados toxicológicos.

8. 5. Importancia de la toma de la muestra ambiental para un exitoso análisis molecular

Nuestro país no cuenta aún con servicios para realizar todos los análisis moleculares en forma rutinaria y masiva. Sin embargo, algunos laboratorios vinculados a Universidades Nacionales o Instituciones de bien público están capacitados para llevar a cabo estos diagnósticos. En caso de que estos análisis sean requeridos, se debe tener presente que un punto importante y clave para poder realizar los ensayos es el procedimiento seguido para la toma de muestra ambiental.

Se aconseja comunicarse previamente con el laboratorio donde se va a realizar el análisis. Sin embargo, las siguientes recomendaciones generales para la toma de muestras deben tenerse en cuenta cuando se van a hacer análisis moleculares de muestras de agua de floraciones:

- *No se debe agregar ningún tipo de sustancia* o fijador a la muestra de agua ambiental tomada para análisis molecular.
- Cualquiera sea el procedimiento que se use para *recolectar* las células presentes en la muestra, debe hacerse *en el menor tiempo posible*, y se deben *congelar las células a -20°C* inmediatamente.
- Una vez congelada, *la muestra NO debe descongelarse* (mantener la cadena de congelamiento). Caso contrario, si la muestra llegara a descongelarse, es muy probable que se haya inutilizado para realizar diagnósticos moleculares certeros.
- Si la floración es muy densa (alto número de células por ml), observándose una capa verdosa sobre la superficie, *es suficiente colectar 1-3 ml de la masa celular*, escurriendo el agua excedente.
- Si la muestra de agua corresponde a un monitoreo o análisis preventivo donde no se ve a simple vista la floración o está en sus comienzos, se recomienda *filtrar 1-5 litros de agua* con filtros comunes de laboratorio o a través de una tela de malla apropiada, de manera de quedarse con un residuo celular de 1 a 2 ml libre de líquido. Este procedimiento debe hacerse rápidamente para evitar que las células se rompan.
- En caso de que no sea posible realizar la filtración, *se pueden dejar decantar las células* en un recipiente adecuado que permita eliminar el líquido sobrenadante y retirar el precipitado celular de manera fácil, que es trasvasado al tubo donde se va congelar.
- Si el lugar de muestreo quedara cerca de un laboratorio, se puede *transportar el agua en bidones y filtrar y/o centrifugar* con un procedimiento continuo, *lo más rápidamente posible*, en lo posible en una centrifuga refrigerada. El precipitado celular se pasa al tubo donde va a ser congelado.
- En todos los casos, *la muestra colectada debe ser congelada en el menor tiempo posible* y se debe *evitar el descongelamiento* de la muestra. Es recomendable llevar hielo seco con sal gruesa en un termo apropiado al área de muestreo, y lo antes posible depositar las muestras en un congelador de -20°C.
- En caso de que deban efectuarse *traslados de las muestras* por largas distancias, debe preverse que estén *congeladas todo el tiempo* (por ej. en hielo seco con sal). *La interrupción del congelamiento inutiliza las muestras.*

- En el caso que no sea posible congelar las muestras, aunque no es el método más recomendado, *suele ser apropiado dejar las células vivas* tal cual se encuentran en la floración, en un recipiente adecuado, con el mismo líquido en que están en su ambiente natural, y mantenerlas en un lugar con luz y temperatura lo más similar al ambiente. Se deben remitir a un laboratorio para su concentración o al laboratorio de análisis molecular lo antes posible.
- El cumplimiento de estos requerimientos mínimos asegura que el ADN presente en los organismos que constituyen la muestra, se mantenga íntegro, lo cual es importante para llevar a cabo las reacciones de PCR. En caso de descongelamiento de las muestras, o cualquier alteración que conduzca a la ruptura de las células, produce la liberación del contenido intracelular, incluyendo las moléculas de ADN. La interacción de los ácidos nucleicos con proteínas que pueden degradarlos o romperlos (nucleasas) los convierten en pequeños fragmentos que impiden las detecciones moleculares.

8. 6. Pasos que se siguen en el laboratorio molecular

Las muestras que llegan al laboratorio para análisis de cianobacterias tóxicas, ya sea su identificación molecular o la detección de genes relacionados con toxinas, se guardan en el congelador de -20°C hasta que van a ser ensayadas.

Una posibilidad es que se comience extrayendo el ADN total, presente en la muestra. Éste estará compuesto por los ADN de todos los organismos capturados en el momento del muestreo, entre los que se encuentran los de las cianobacterias. Si el muestreo y conservación de la muestra fueron adecuados y si se procede correctamente con reactivos apropiados, se obtendrá un ADN no fragmentado.

A partir del ADN total y con los sustratos y cebadores para llevar a cabo las reacciones de amplificación de la PCR, se harán los ciclos de amplificación con el programa ajustado para cada gen de interés, usando un termociclador. De esta manera se obtienen muchas copias del segmento específico que se ha querido amplificar.

Puede ocurrir, que se realice la amplificación de la PCR directamente sobre la muestra ambiental, pero en ese caso se deberá contar con los reactivos que aseguren que no interfieran inhibidores de las reacciones de la PCR (reacción de ADN polimerasa).

El ADN obtenido después de la amplificación por la PCR (que debe corresponder al fragmento de interés (por ej. *ARN16S*, ITS, IGS-PC, *mcyA*, *mcyB*, *mcyE*, etc.) puede corresponder a una única cianobacteria, o a más de una. En caso de provenir de un cepa aislada, puede ser enviado directamente a secuenciar (Servicio de Secuenciación). En el caso de provenir de una muestra ambiental donde puede haber más de una cianobacteria presente, estos fragmentos de ADN corresponden a una región similar región pero de distintas cianobacterias. Por eso los ADNs son introducidos en un vector (plásmido, fragmento de ADN circular autoreplicante en una bacteria *Escherichia coli*) que permite generar una "biblioteca" de ADNs de la muestra. Esta biblioteca consiste en células de *E. coli* que llevan dentro los distintos plásmidos generados anteriormente (cada uno se denomina clon). Cada célula de *E. coli* tiene uno de los fragmentos (a esta etapa se la llama clonación). La biblioteca puede ser guardada a -20°C y conservada. Para caracterizar las cepas presentes o los genes de las toxinas presentes en la muestra ambiental se hace un análisis de los clones y se mandan a secuenciar los fragmentos contenidos en los plásmidos. La secuencia de nucleótidos obtenida se compara con la información existente en bases de datos públicas y con el uso de

softwares adecuados se hacen análisis de caracterización y análisis filogenéticos. Se reportan los resultados.

Bibliografía

- MIHALI T.K., KELIMANN R., MUENCHHOFF J., BARROW K.D., NEILAN B.A. 2008 Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 716-722
- MOFFITT M.C., BLACKBURN S.I., NEILAN B.A. 2001 rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 505-512
- PEARSON L.A., NEILAN, B.A. 2008 The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 1-8
- RANTALA A., RAJANIEMI-WACKLIN P., LYRA C., LEPISTO L., RINTALA J., MANKIEWICZ-BOCZEK J., SIVONEN K. 2006 Detection of microcystin-producing cyanobacteria in finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6101-6110.
- SABER M.L., VALE M., KRAMER D., VASCONCELOS V.M. 2007 Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 75: 441-449
- SAMBROOK J., RUSSELL D. 2001 *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 3rd edition. CSHL Press. 3 volumes.
- TILLET D., PARKER D.L., NEILAN B.A. 2001 Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2810-2818.

Sección III: Manejo de floraciones nocivas, tratamientos en plantas potabilizadoras.

Capítulo 9: Enfoques para la evaluación y manejo del riesgo de cianobacterias

Ana Laura Ruibal Conti
Marcia Ruiz
Silvia Otaño

9. 1. Marco general

El propósito de este capítulo es brindar elementos y herramientas que permita evaluar y manejar los riesgos potenciales derivados del desarrollo masivo de cianobacterias y brindar información sobre regulaciones vigentes en otros países.

Como punto de partida para la gestión y manejo del riesgo de las cianobacterias se debe tener presente que las mismas son un componente natural de los ecosistemas acuáticos. Son organismos microscópicos que a simple vista no se ven.

El riesgo asociado a ellas se basa en dos aspectos fundamentales:

- Capacidad de desarrollarse masivamente, lo que también se conoce como floración algal o bloom algal. Bajo ciertas condiciones ambientales, las cianobacterias tienen ventajas competitivas sobre otros tipos de algas y pueden desarrollarse masivamente. En esta situación, en general, el agua presenta coloración verde.
- Las cianobacterias tienen la capacidad potencial de producir toxinas (una floración de cianobacterias puede ser tóxica o no).

Cuando ambas condiciones se dan simultáneamente, es decir existe una floración de cianobacterias productoras de toxinas, el riesgo asociado aumenta y debe gestionarse adecuadamente.

El segundo punto importante es comprender que el desarrollo masivo de las cianobacterias representa un problema *Ambiental* y un problema de *Salud Pública* (Fig. 1).

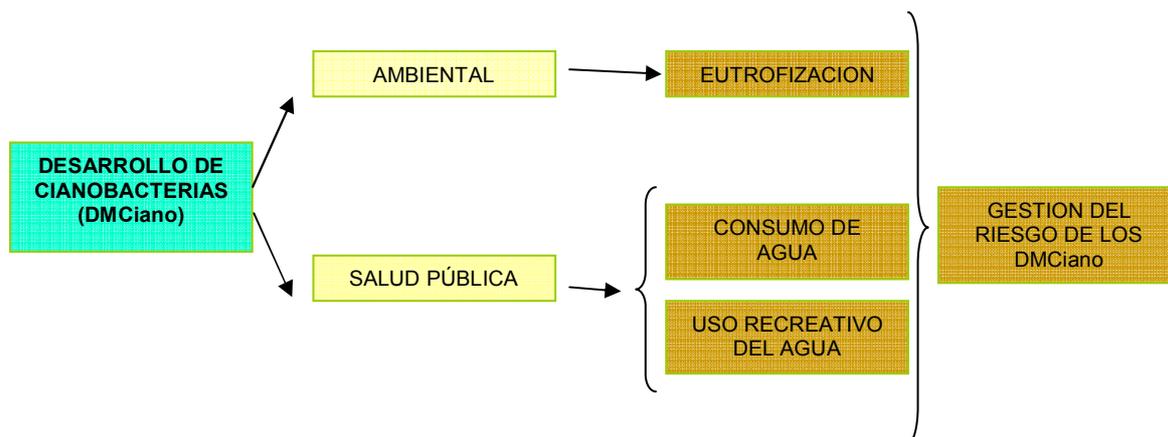


Fig. 1: Esquema de la problemática causada por el desarrollo masivo de Cianobacterias (DM Ciano)

Desde el punto de vista *ambiental*, el desarrollo masivo de cianobacterias (DMCiano) es, por lo general, la manifestación visible de la eutrofización y por ello la prevención y manejo de la eutrofización es parte de la gestión del riesgo de las cianobacterias.

La eutrofización es uno de los problemas ambientales mas distribuidos en los cuerpos de agua continentales y es el enriquecimiento del agua con dos nutrientes principales, fósforo y nitrógeno (UNEP-IETC/ILEC 2001). La contaminación puntual de las aguas (ej: efluentes urbanos/industriales), o difusa (ej: por la contaminación agraria o atmosférica), puede aportar cantidades importantes de estos elementos y el resultado es un aumento en el desarrollo de algas unicelulares y/o macrófitas, con importantes consecuencias sobre la composición, estructura y dinámica del ecosistema.

La Eutrofización comienza a reconocerse como problema a mediados del siglo XX. Según las estadísticas del Comité Internacional de Ambientes Lacustres (ILEC/Lake Biwa Research Institute 1988-1993), en Asia cerca del 54% de los lagos son eutróficos. Lo mismo ocurre en el 53% de los lagos en Europa, en el 48% de los lagos norteamericanos, y en el 41% y el 28% de los lagos de América del Sur y de África respectivamente.

Desde el punto de vista de la *Salud Pública* el problema se enmarca dentro de las enfermedades hídricas. Este tipo de enfermedades se clasifican en:

1. Enfermedades de transmisión hídrica (por ingestión de agua con bacterias, virus, parásitos, químicos),
2. Enfermedades en relación con la higiene (pediculosis, infección de piel y ojos),
3. Enfermedades por contacto directo (esquistosomiasis, dermatitis, irritación de piel),
4. Enfermedades por vectores de hábitat hídrico (malaria, filariasis).

El problema sobre la salud que ocasiona el desarrollo masivo de cianobacterias se clasifica en las categorías 1 y 2 de las enfermedades hídricas. La categoría 1 incluye los problemas asociados a la presencia de toxinas en agua y su consumo, y la categoría 2 hace referencia a los problemas dérmicos derivados del contacto con el agua (uso recreativo y/o doméstico).

Por lo antes descrito, cuando se observan desarrollos masivos de cianobacterias tóxicas en los cuerpos de agua es necesario evaluar el riesgo e implementar un plan de gestión que involucre medidas de mitigación, monitoreos periódicos, planes de acción y contingencia, así como información y participación de los distintos sectores involucra-

dos en el uso del recurso hídrico. Esto no es una tarea sencilla y requiere de una disciplina relativamente nueva y en constante desarrollo: Manejo del Riesgo.

El manejo del riesgo permite lo siguiente (Chorus & Bartram, 1999):

- *Evaluar o Valorar el riesgo*, respondiendo a preguntas tales como: ¿Hay un problema? Si hubiera un problema, ¿sería detectado? ¿Cómo puede la severidad del problema ser interpretada en relación a otras demandas del recurso?
- *Contar con opciones de manejo*, conociendo: ¿Qué tipo de acciones están disponibles? ¿Cuáles son las características básicas?
- *Planificar para la gestión*: programando cómo deberían articularse las acciones de manejo, respuesta de emergencia, planes de contingencia y planes de investigación.

9. 1. 1. Conceptos básicos de manejo de riesgo

El manejo del riesgo es una disciplina reciente, que necesita información de base, comparación con otros sucesos, y la participación de todos los organismos involucrados en la gestión del riesgo (Fig. 2).

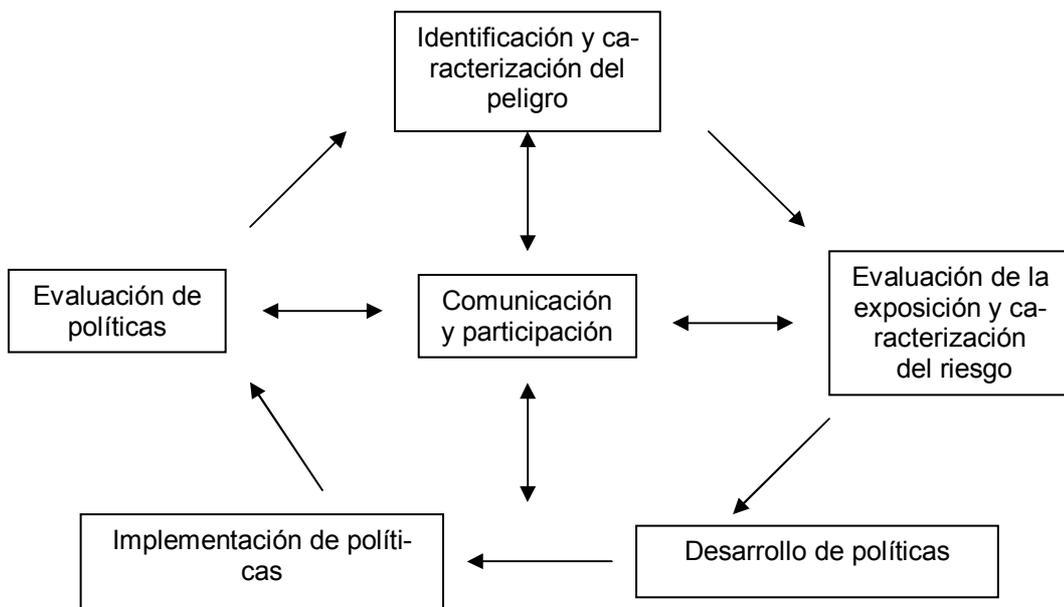


Fig. 2: Esquema del ciclo de manejo del riesgo (Chorus & Bartram, 1999).

A continuación se explica brevemente las partes componentes del ciclo:

Comunicación y participación: involucra principalmente riesgos por el desconocimiento de la población, por las consecuencias de una caracterización y comprensión insuficientes y riesgos en los cuales el individuo o la población tienen poca posibilidad de influencia sobre las respuestas oficiales.

La identificación y caracterización del peligro: se refiere a la probabilidad de que la exposición a una sustancia nociva provoque un efecto adverso específico en la salud, generalmente expresado como frecuencia en un tiempo dado. Como ejemplo, los valores guía se definen como concentraciones de un compuesto estimado para provocar un riesgo adicional insignificante para el consumidor, lo cual se conoce como riesgo acep-

table o riesgo tolerable. En este nivel el manejo del riesgo se vuelve difícil debido a la falta de estudios toxicológicos y epidemiológicos.

El desarrollo de políticas: toma en cuenta aspectos racionales (como son los procesos científicos) y valores sociales. Las bases para el desarrollo de políticas comprenden el conocimiento y caracterización del daño, la ocurrencia local de las condiciones de peligro, y la valoración del resultado de la exposición. Estas bases se complementan con el costo y la efectividad de las medidas de prevención y de remediación, y la disponibilidad y experiencia en la implementación de soluciones técnicas.

La implementación de políticas: es la formulación de legislación. Otros mecanismos son la resolución de conflictos, instrumentación económica e información y participación pública.

Las acciones y planes de manejo: deben ser revisados periódicamente, a los efectos de establecer qué partes del plan fueron efectivas y cuales insuficientes.

Principales Actividades en el Proceso de Manejo del Riesgo:

En el contexto de salud ambiental, el proceso de manejo del riesgo puede ser organizado en varias y distintas actividades. Las tres principales actividades que constituyen los pasos esenciales en el proceso de manejo examinan diferentes aspectos del problema:

Estimación del Riesgo: Uso de información de riesgo con base científica y de métodos analíticos para:

- caracterizar la naturaleza
- caracterizar la extensión de los riesgos ambientales sobre la salud en la población humana

Evaluación del Riesgo: Se consideran los factores:

- Legales,
- Políticos,
- Económicos,
- Sociales

Estos factores influyen la decisión de adoptar un curso de acción para reducir los riesgos en la salud. En algunos esquemas de manejo, el análisis económico cuantitativo de los beneficios y los costos de la reducción del riesgo se combina con resultados del proceso de estimación y de la evaluación.

Control del Riesgo: Selección de opciones y comienzo de acciones orientadas a reducir el riesgo a un nivel aceptable o tolerable. Esta actividad es lo que generalmente se refiere como manejo de riesgo. Pero el término control de riesgo es más específico y refleja mejor los objetivos de las actividades.

9. 1. 2. Evaluación del Riesgo o Valoración de la Situación

La evaluación del riesgo es una tarea compleja. En muchos casos, sino en todos, no existe información epidemiológica que evidencie la relación entre los efectos sobre

la salud y las cianobacterias. A continuación se describe tipos de información que habitualmente esta disponible y que puede ayudar en esta tarea.

Información de la fuente de agua:

El monitoreo de cuerpos de agua y sistemas de suministro para detectar las cianobacterias y cianotoxinas no es una práctica común en la mayoría de los países del mundo todavía. Existen una serie de puntos críticos de control en el sistema de agua potable donde evaluar las cianotoxinas y las células. Debe ser llevado a cabo si las poblaciones de cianobacterias son significativas en la fuente de agua. Estos puntos pueden incluir:

- la fuente de agua (río, lago, embalse),
- la entrada de agua cruda a la planta,
- puntos clave en el proceso de tratamiento,
- finalmente en el agua tratada (a la salida de la planta de tratamiento y en red).

Es importante la inspección visual de la fuente de agua. Los cambios en la coloración constituyen un indicador de la presencia de algas, así como lo son la formación de espumas, presencia de animales muertos y detección de olores extraños.



Fig. 3: Floración de cianobacterias en el Embalse San Roque. Fuente de agua para la ciudad de Córdoba- Argentina.

Ante una situación de floración, para evaluar rápidamente el grado de protección brindado por la planta potabilizadora se puede seguir el árbol de decisión planteado en la Fig. 4.

Información de aguas de uso recreativo:

Hacer una valoración del peligro potencial en cuerpos de agua de uso recreativo es complicado debido a los numerosos sitios en los cuales las personas pueden entrar en contacto con el agua y por la distribución heterogénea y rápidamente cambiante de las floraciones. Hacer un monitoreo de todos los cuerpos de agua de uso recreativo es poco probable de que se logre, por ello, para valorar el riesgo es necesario optar por otros enfoques tales como: monitoreo visual incluyendo la participación de los responsables de los sitios de baño y del público en general. En este sentido la educación cumple un rol fundamental.

Información ambiental:

La información ambiental incluye registros históricos, la mayoría provenientes de la comunidad, como descripciones del cuerpo de agua y ejemplos de incidencia en la salud, mortandad de animales asociadas a espumas, etc. y conocimiento local, referidos a datos físicos, químicos y biológicos. A estos datos históricos se deben sumar el registro de parámetros físicos, químicos y biológicos. Los parámetros básicos son nutrientes, pH, oxígeno disuelto, temperatura, conductividad, turbidez, transparencia del agua, profundidad del sistema, tiempo de residencia del agua en lagos, lagunas y embalses, altura de los ríos, análisis de algas.

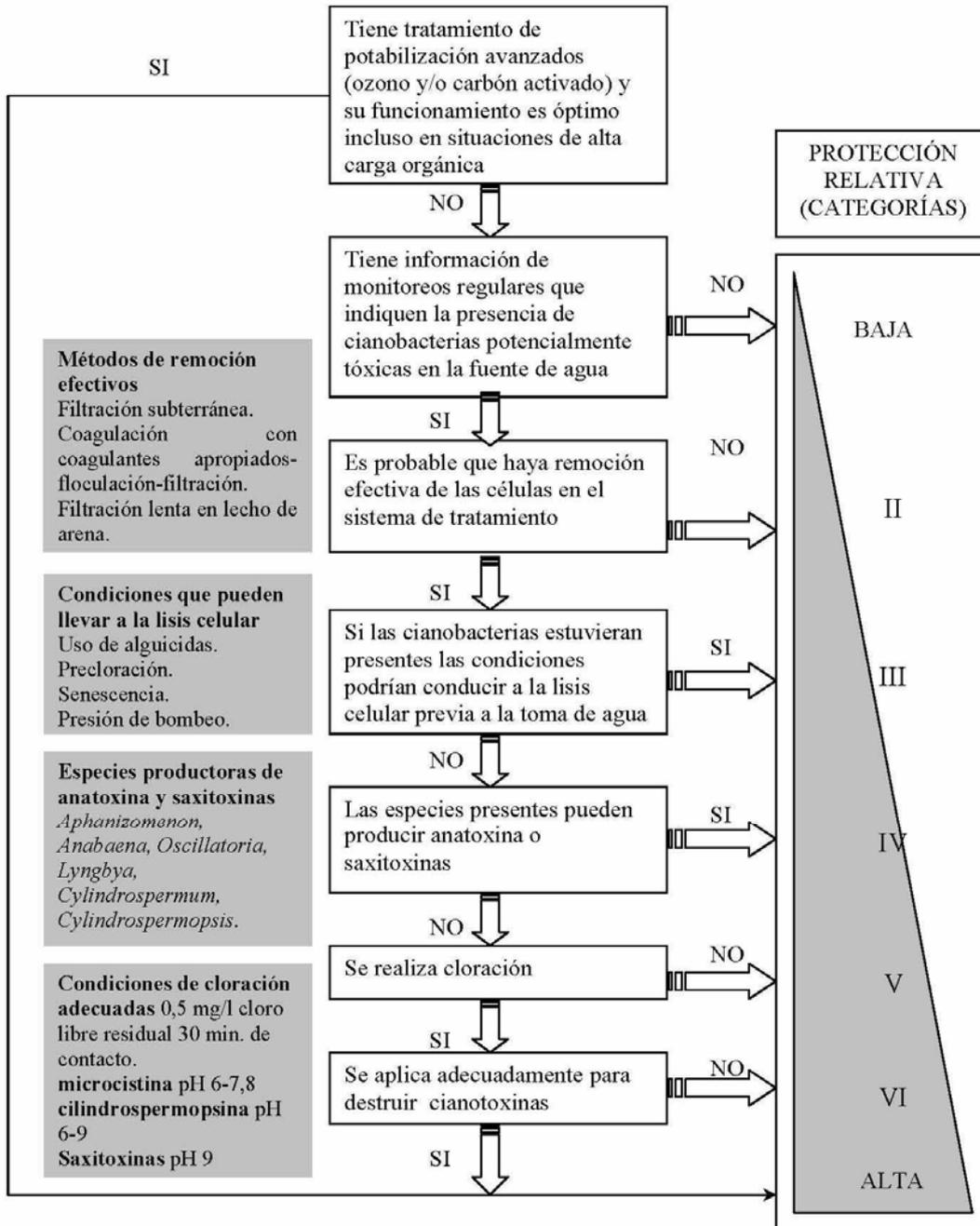


Fig. 4 Evaluación simple y rápida del grado de protección brindado por el sistema de potabilización (modificado de Chorus & Bartram, 1999)

La información sobre el medio ambiente ayuda a la evaluación de la probabilidad o presencia de desarrollos masivos de algas, y podría predecir los tipos de cianotoxinas y su localización.

Información histórica y conocimiento local: conocer sobre si el medio ha sido propenso a desarrollar algas. La información de la comunidad también es útil por ejemplo: incidentes sobre efectos en salud humana, mortandad de ganado, muertes de peces asociadas a floraciones o cúmulos de algas.



Fig. 5: Floración de algas en el Embalse de Río III, Córdoba - Argentina (Diario La Voz del Interior 31-05-99)

Datos físicos y químicos: El crecimiento masivo de cianobacterias depende de la concentración de nutrientes del cuerpo de agua. La relación entre la abundancia de algas y las concentraciones de fósforo y nitrógeno (especialmente nitratos y amonio) proveen una base valiosa para evaluar la probabilidad del desarrollo de biomasa planctónica. La temperatura del agua y la altura y los caudales de los ríos constituyen otros factores de importancia.

Datos Biológicos: Registros de monitoreos a largo plazo son necesarios para evaluar la probabilidad de la persistencia de los desarrollos de algas.

Información sobre Salud Pública: En episodios de gastroenteritis donde no ha sido encontrado el patógeno causante puede ser útil asociarlo a la presencia de cianobacterias en agua.

Otra Información: Información adicional puede provenir de inspecciones veterinarias, sintomatología de animales o registro post-mortem.

9. 2. Marcos de Gestión del Riesgo: Árboles de Decisión para AGUA POTABLE

9. 2. 1. Árboles de decisión para agua potable

Un marco de trabajo considerando niveles de Alerta es una secuencia de acciones de manejo y monitoreo que puede ser usada por operadores de plantas potabilizadoras o por personas encargadas de toma de decisiones. El siguiente modelo de manejo presentado como “árbol de decisiones” (Fig.6) se basa en los puntos críticos de control y en las categorías de protección de la Fig.4. Este esquema de decisiones debe ser considerado como un marco general y debe ser adaptado para las circunstancias locales.

A modo orientativo la Fig. 6 muestra un procedimiento que permite evaluar una floración algal potencialmente tóxica, realizar acciones y dar respuestas a través de los siguientes “umbrales de acción”:

- Nivel de Vigilancia,
- Nivel de Alerta 1,
- Nivel de Alerta 2
- Nivel de Alerta 3.

Este procedimiento, ha sido basado y adaptado a circunstancias locales tomando como base el procedimiento propuesto por Chorus & Bartram (1999) y el Ministerio de Saude (2003). Es importante destacar que en Argentina, son escasos los estudios de base que asocian la concentración de toxinas con el número de células de cianobacterias. Un estudio comparativo realizado en los Embalses San Roque y Paso de las Piedras indica que el número de células de cianobacterias que determina un determinado “umbral de acción” puede variar de acuerdo al cuerpo de agua (Ruibal Conti et al., 2005). De esto se desprende que es necesario convalidar el procedimiento a través de un monitoreo a largo plazo para cada cuerpo de agua.

La secuencia de respuestas (Fig 6) se basa en la detección de cianobacterias mediante un PROGRAMA DE MONITOREO REGULAR, progresando desde moderados hasta altos niveles de recuentos de cianobacterias y la posibilidad de detectar las toxinas por encima de los niveles guías de ALERTA 1. Las condiciones del nivel de Alerta 1 requieren decisiones a tomar sobre el agua tratada, la eficacia del tratamiento y las concentraciones de toxinas. A continuación se explican las etapas umbrales.

Programa de Monitoreo Regular:

Un cuerpo de agua destinado a suministro de agua potable, debe ser regularmente monitoreado a través de un programa de muestreo de calidad de agua. Las características de este programa (por ej.: frecuencia, estaciones de monitoreo, parámetros de calidad, etc.) se definirán en función de las características del cuerpo de agua. (Para lineamientos generales de diseño de programa de monitoreo consultar NORMAS IRAM 29012-1/ IRAM 29012-2 y IRAM 29012-1, Muestreo en Lagos IRAM 29012-4, 29012-1)

Se sugiere la inspección regular de la toma acompañada de análisis quincenales de fitoplancton y parámetros físico-químicos relevantes. En ocasiones la implementación de este programa de monitoreo puede resultar costosa, por ello en función a los antecedentes del cuerpo de agua se puede reducir el mismo, por ejemplo: monitoreo mensual en períodos de mezcla o baja productividad (bajo contenido de algas) y quincenal en épocas de mayor productividad (alto contenido de algas).

La muestra de agua simple (homogeneizada y tomada con frasco de boca ancha o con muestreador-ver capítulo 5) debe tomarse superficialmente y a la altura de la boca de extracción del agua para la planta potabilizadora.

En caso de presencia de algas que se desarrollan preferentemente en la zona del metalimnion (como es el caso de *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* y *Raphidiopsis*) tomar una muestra más a la altura del metalimnion.

Nivel de Vigilancia:

Comprende los estadios tempranos del desarrollo de una floración algal cuando es encontrada en forma dispersa durante el programa de monitoreo regular. La presencia igual o mayor a *de 500 células de cianobacterias/mL de muestra* es un valor indicativo para activar el nivel de vigilancia. Este límite puede ser adaptado de acuerdo al conocimiento local y la información histórica.

Al activarse este nivel, la frecuencia de los monitoreos de algas debe incrementarse a semanal.

Los olores y sabores pueden ser detectables en suministros donde hay un desarrollo por encima del nivel de vigilancia. Pero su ausencia no es indicativa de ausencia de cianobacterias.

Nivel de Alerta 1:

Este nivel abarca una concentración de algas igual o mayor a *5.000 cél./mL de cianobacterias* en el cuerpo de agua

Las condiciones de este nivel implican que debe hacerse una evaluación basada sobre el análisis de las toxinas por una técnica cuantitativa. Este nivel requiere la evaluación del desarrollo de la floración y de la disponibilidad de un tratamiento efectivo del agua.

- Se deben mantener los recuentos de algas en el agua cruda a una vez por semana.
- Efectuar el análisis de toxinas quincenalmente en el agua cruda. Si los valores de toxinas están por encima de los niveles guía para agua potable, realizar estos ensayos en el agua tratada.
- Si el nivel de Alerta 1 se mantiene pero las toxinas no son detectadas, el monitoreo debe mantenerse para realizar el seguimiento en el desarrollo de algas.
- Si el sistema de tratamiento es efectivo en la remoción de toxinas (tratamiento capaz de remover más del 99% de las células sin causar su lisis, o el 90% de las toxinas disueltas), se debe continuar con el monitoreo semanal del agua cruda y del agua tratada y efectuar el análisis de toxinas cada dos semanas en el agua tratada.

- Si el tratamiento resulta ineficaz se debe efectuar el ajuste en la cloración de la siguiente manera: Para microcistinas y cilindrospermopsina la cloración con dosis adecuadas según demanda para tener 1 mg/L de cloro libre con tiempo de contacto 20 minutos a pH entre 6 y 7,8 (Izaguirre y Román, 2005).
- Se deberá efectuar la remoción de barros y aumento en la frecuencia de lavado de filtros. Se deberá considerar la disposición final de los barros a los efectos de evitar la contaminación del agua con el concentrado de algas resultante de los procesos.
- Se deberá informar al Ente Regulador y/o Autoridad del Agua sobre las condiciones de algas y toxinas detectadas.

En el caso de Cianobacterias que producen otras toxinas, de no contarse con los insumos e instrumental para su determinación, será necesario hacer un análisis de riesgo basado en el peligro inherente a la especie detectada, su concentración y la exposición esperada a la misma.

Para tal fin se deberán realizar pruebas de bioensayo ratón a los efectos de determinar la existencia de toxicidad de las muestras. En el caso que los resultados sean positivos se deberán cuantificar las toxinas mediante técnicas cromatográficas en laboratorio propio o de referencia (ver nómina de profesionales a recurrir al final del manual).

La falta de insumos e instrumental para la cuantificación de toxinas conducirían a la incertidumbre en los diversos niveles de alerta.

Se efectuarán en forma regular ensayos de jarras (Jar test) a fines de determinar las diversas dosis de productos químicos y evaluar su respuesta a la remoción de algas y de toxinas de las diversas especies presentes. La información recolectada hará posible la actualización del plan de contingencia al incorporar resultados no obtenidos hasta la fecha.

Nivel de Alerta 2:

Este nivel abarca una concentración de algas de igual o mayor a 10.000 cél/mL de cianobacterias y presencia de toxinas confirmadas.

Las condiciones de este nivel indican un incremento significativo en el riesgo sobre efectos adversos en la salud por un suministro de agua que es tratado con un sistema no efectivo (los efectos adversos pueden ser a corto plazo).

En este nivel se debe:

- Incrementar los controles de algas a 2 veces por semana en el agua cruda, y extender estos análisis en el agua tratada.
- En el caso de que la remoción de células sea ineficaz, se debe optimizar el proceso de coagulación, utilizando siempre sulfato de aluminio, si es necesario prealcalinizar y agregar polielectrolito catiónico como coadyuvante. *No utilizar sulfato de cobre. No preclorar* agua natural. Si preclorar agua decantada antes del ingreso a los filtros según la demanda.
- Realizar pruebas semanales de toxicidad en el agua tratada.
- En el caso de que las concentraciones de toxinas en el agua tratada sean superiores a los valores guía, se debe utilizar carbón activado. Se sugiere seguir las especificaciones descriptas en el Capítulo 8, inyectando siempre en el lu-

gar más cercano a la toma para obtener un mayor tiempo de contacto. Las dosis de referencia podrán variar entre 20 y 80 mg/L de acuerdo a la efectividad del carbón, de la concentración de algas detectadas y de la calidad de agua cruda (Otaño y Román, 2008).

- Se considerará el cambio en el tipo de carbón utilizado efectuando pruebas en laboratorio sobre las mejores opciones para el tratamiento del agua de acuerdo a las sustancias producidas por las algas (toxinas o malos olores).
- Realizar análisis de subproductos de la cloración.
- Cambiar la profundidad de la toma.
- Si bien, en reservorios, es posible la utilización de alguicidas en la fuente de agua para reducir la abundancia de algas (sulfato de cobre, peróxido de hidrógeno, etc), su uso no es recomendable debido a su potencial efecto tóxico sobre la biota acuática. (Ver Capítulo 8). En caso de ser usado, se debe considerar hacer controles estrictos (diarios) de la remoción de toxinas o bien cerrar temporalmente la fuente de agua potable hasta tanto las toxinas solubles en agua sean eliminadas. Brasil establece la prohibición en el uso de alguicidas en la fuente de agua cuando la abundancia de cianobacterias es superior a las 20.000 células/mL (Ministerio da Saúde do Brasil, 2005).
- Controlar la presión de bombeo a menos de 10 atmósferas y controlar los gradientes de presión en los filtros a fines de evitar la lisis celular.
- Considerar otras fuentes alternativas (Ej: Agua envasada, agua subterránea, distribución en camiones de aguas de otras fuentes, etc.).
- Informar a las autoridades de salud y a otros organismos sobre los riesgos potenciales (Ente regulador, bromatología, salud pública, Autoridad del Agua etc.).
- Información precisa y responsable al público (por distintos medios masivos de comunicación).

Nivel de Alerta 3:

Este nivel abarca una concentración de algas de igual o mayor de 20.000 cél./mL cianobacterias. Toxinas por encima de los niveles guía.

En este nivel el plan de contingencia debe ser activado aún con tratamientos avanzados. En esas condiciones existe un riesgo acentuado para la salud pública, y se deberá continuar con:

- Controles de algas 3 veces por semana.
- Análisis semanales de toxinas en el agua tratada, y a la entrada de las clínicas de hemodiálisis.
- Evaluar el tipo de carbón activado utilizado para optimizar la remoción de toxinas y olores (Ver Capítulo 10)
- No utilizar alguicidas en la fuente de agua.

Para la optimización de los procesos de potabilización se podrán considerar las siguientes opciones de tratamientos avanzados:

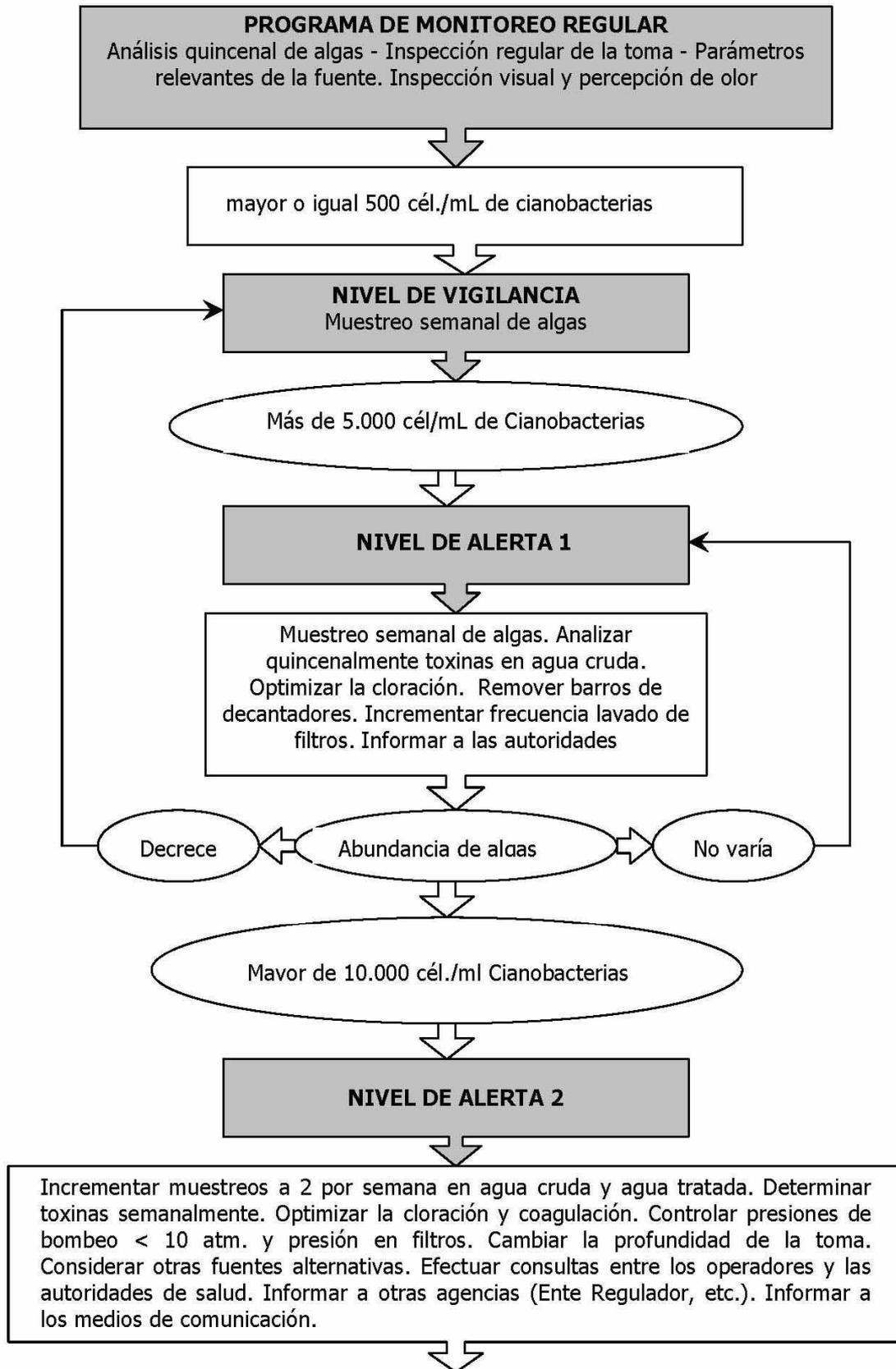
- Cambiar el proceso de Decantación por Flotación.

- Utilizar ozono para eliminación de toxinas y olores.
- Incorporar aireadores para ayudar en la eliminación de olores.

Si estas medidas continúan resultando insuficientes, se procederá a efectuar las siguientes acciones:

- Provisión de agua potable en botellas.
- Provisión de agua segura a consumidores particularmente sensibles (clínicas con pacientes sometidos a diálisis, terapias intravenosas).
- Cierre temporal de la fuente de agua hasta que los niveles de toxinas en el agua de consumo sean menores al valor guía.
- Comunicación a las autoridades sanitarias e información al público a través de los medios de comunicación

Una vez desactivado el *Nivel 3* se informará a las autoridades sanitarias y a la población sobre la regularización del servicio.



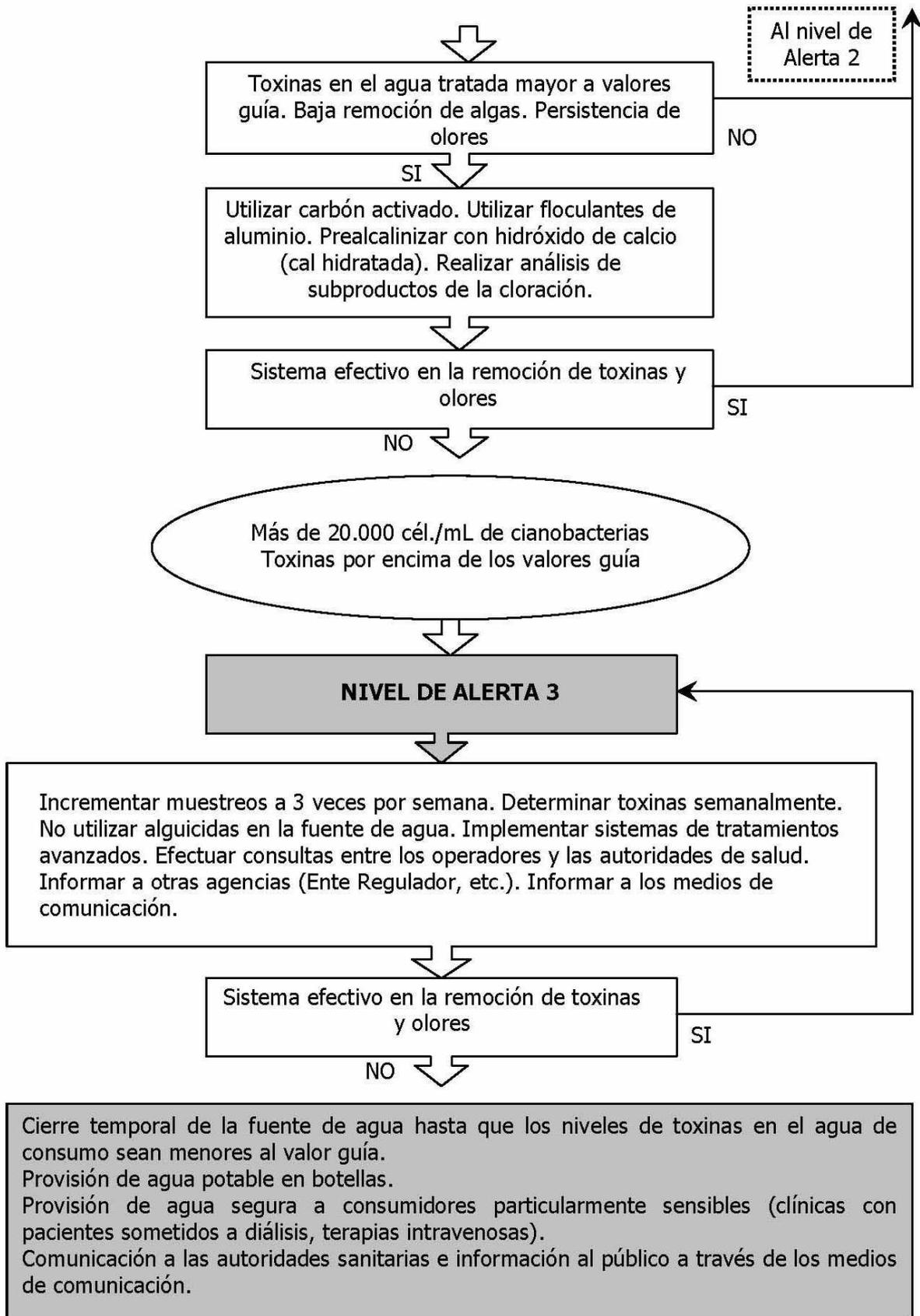


Fig. 6. Niveles de alerta por presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas

Coordinación con otros Organismos Públicos y Privados

Al alcanzar el nivel de *Alerta 1* se notificará y trabajará en forma conjunta con el ente regulador o la autoridad del agua competente, efectuando los controles en las diferentes etapas de tratamiento.

Bajo este nivel se notificará además a las autoridades sanitarias sobre los resultados de los monitoreos realizados. La información brindada permitirá establecer posibles casos de intoxicación por cianotoxinas. Cuando se reportan casos de gastroenteritis donde no se detectan patógenos, es importante localizar las zonas donde se producen a los fines de evaluar si la fuente se origina en el sistema de distribución de agua potable. Lo mismo sucede si las especies detectadas fueran promotoras de otras toxinas que causan otros síntomas (parálisis muscular, respiración abdominal pesada, convulsiones, pérdida de coordinación, temblores).

Bajo el nivel de *Alerta 2* se informará además a las autoridades que existe un riesgo bajo para actividades recreativas debido a efectos alérgicos o irritaciones, a los fines de transferir dicha información a los usuarios e iniciar un monitoreo de vigilancia. A concentraciones mayores de algas el riesgo aumenta de moderado a alto, pudiendo llegar a cerrar temporalmente el balneario.

Se publicarán en forma periódica noticias breves que tiendan a educar al público sobre la problemática de algas tóxicas, riesgos asociados y remediaciones efectuadas.

Durante episodios de niveles de alerta se mantendrá informada a la comunidad sobre los avances logrados mediante el uso de medios de comunicación (diarios, radio, etc.).

La participación del público constituye además una fuente de información adicional al ser capaz de advertir a las autoridades locales sobre la observación de formación de espumas, detección de malos olores en el agua o muerte de animales (peces, ganado).

9. 2. 2. Árboles De Decisión Para Agua Recreativa

El riesgo en la salud humana a través de la exposición a las cianobacterias y a sus toxinas durante el uso del agua de manera recreativa surge a través de 3 rutas de exposición:

1. Contacto directo, de las partes expuestas del cuerpo, incluyendo áreas sensibles como son los ojos, oídos, boca y garganta, y las áreas cubiertas por el traje de baño (en el cual puede quedar retenido material celular).
2. Ingesta accidental de agua conteniendo cianobacterias y;
3. Aspiración de agua que contenga cianobacterias (inhalación).

9. 2. 2. 1. Exposición a través de contacto directo o dérmico

Han sido reportadas reacciones alérgicas o irritantes en la dermis de numerosos géneros de cianobacterias de agua dulce, entre ellos: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Oscillatoria* y *Gloetrichia*, después de una exposición recreativa.

Los trajes de baño (particularmente cuando estos se encuentran húmedos), tienden a agravar tales efectos por la acumulación de cianobacterias y el incremento de la

rotura de las mismas y así se libera su contenido celular. Además se ha documentado sensibilidad cutánea, irritación de la piel, reacciones alérgicas, irritación de ojos y nariz en nadadores expuestos a Oscillatoriaceae.

Las reacciones alérgicas no son sólo relacionadas a cianobacterias, también pueden ser relacionadas a otras algas planctónicas. Sin embargo, para tener una reacción alérgica se requiere de una elevada densidad celular en el agua en la cual se realizó natación, y por lo general el mayor desarrollo de masa de algas en el agua dulce suele ser de cianobacterias. También se pueden distinguir otros grupos de algas las cuales no hacen espumas superficiales y por lo tanto sus metabolitos no aparecen en forma comparativa a las cianobacterias a altas concentraciones.

9. 2. 2. 2. Exposición a través de ingestión o aspiración

En muchos casos documentados de enfermedades humanas que han sido asociadas a cianobacterias una de las rutas de exposición fue la de Ingerir o aspirar.

A diferencia del contacto dérmico, la problemática de la ingesta es que también incluye un riesgo de intoxicación por cianotoxinas. Este riesgo puede ser estimado por la densidad celular, el contenido de toxina celular y conociendo los mecanismos de toxicidad.

Son bien conocidos los mecanismos de toxicidad aguda producido por las neurotoxinas y las microcistinas, y hay mucha información disponible para estimar riesgos debido a exposiciones crónicas repetidas.

En función a lo expuesto, se explican dos ejemplos de manejo del riesgo para agua recreativa (Tabla 1; Fig. 7).

Tabla 1. Guía para la práctica segura en el manejo de aguas recreativas (Chorus & Bartram, 1999)

Nivel guía o Situación	Riesgo para la Salud	Medidas recomendadas
III-Presencia de acumulaciones de algas en sitios de baño (espumas).	<ul style="list-style-type: none"> Potencial intoxicación aguda 	<ul style="list-style-type: none"> Acción inmediata para prevenir el contacto con las acumulaciones de algas. Posible prohibición de actividades de contacto directo. Seguimiento de la Salud Pública Investigación. Información a autoridades de Salud Pública.
II-Cianobacteria: 100.000 cél/mL Clorofila a: 50µg/L (con dominancia de cianobacterias)	<ul style="list-style-type: none"> Potenciales enfermedades de largo plazo (con algunas especies de cianobacterias). Efectos adversos de corto plazo (ej: irritación de la piel, problemas gastrointestinales) 	<ul style="list-style-type: none"> Observar cuidadosamente la formación de cúmulos de algas. Restringir el uso de las aguas para baño. Investigar el peligro. Colocar avisos de riesgo en las playas. Informar a las autoridades de Salud Pública.
I-Cianobacteria: 20.000 cél/mL Clorofila-a: 10µg/L (con dominancia de cianobacterias)	<ul style="list-style-type: none"> Efectos adversos de corto plazo (ej: irritación de la piel, problemas gastrointestinales). Probablemente en bajas frecuencias 	<ul style="list-style-type: none"> Colocar avisos sobre el riesgo Informar a las autoridades de Salud Pública.

Otros esquemas son seguidos por diferentes países. La Fig. 7 muestra el árbol de decisión seguido por la Agencia Ambiental Alemana (Chorus, 2005).

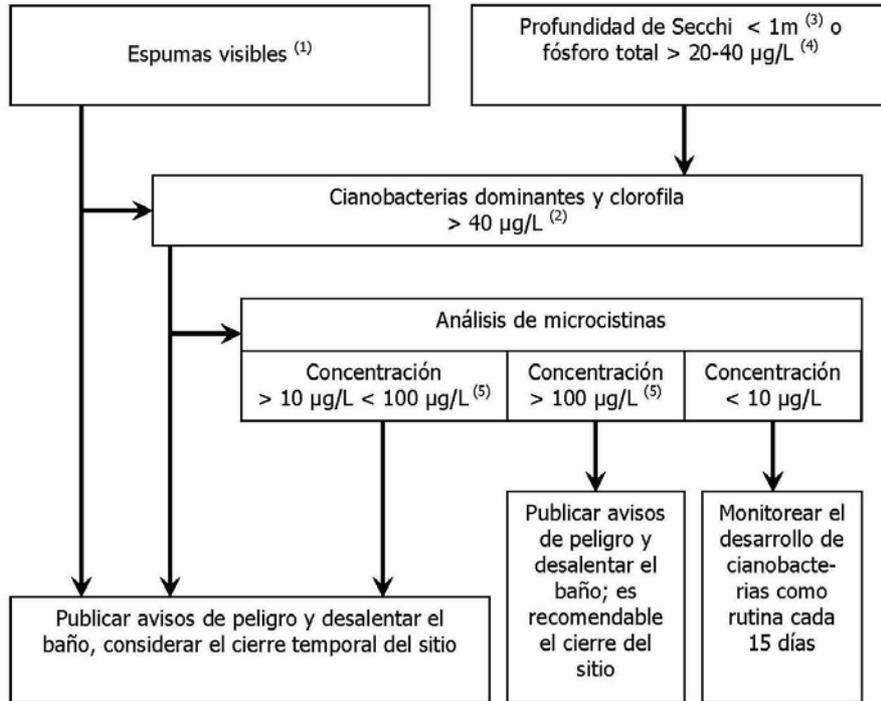


Fig. 7. Esquema de manejo de aguas recreativas con presencia de cianobacterias (Chorus, 2005)

(1) peligro directo si el cuerpo de agua presenta desarrollo masivo de cianobacterias.

(2) dependiendo de la evaluación de la situación, proceder directamente al aviso de peligro e intensificar la observación del sitio.

(3) aplicable en cuerpos de agua poco profundos; las especies formadoras de colonias pueden también formar floraciones en transparencias de hasta aproximadamente 2 m.

(4) en cuerpos de agua extensos y térmicamente estratificados, las cianobacterias pueden ser dominantes con valores de clorofila del orden de los 20 µg/L (y a veces aún menores); en cuerpos de agua pequeños y turbulentos, más probable a > 30-40 µg/L.

(5) Intensificar la frecuencia de la observación del desarrollo de cianobacterias.

9. 3. Enfoques Regulatorios

Con el paso del tiempo, ha ido progresando el conocimiento de las cianotoxinas desde el enfoque del riesgo para la salud humana así como en el manejo del riesgo. Por ello, hay diferentes acercamientos de los distintos países en este tema del riesgo.

La regulación en muchos países, surge de una necesidad de la investigación científica, otras veces por el interés en los usos del agua o como derivado de otros programas por parte por las autoridades

En países donde se han realizado normas regulatorias, se toman medidas para la protección de la salud pública. Éstas surgen de combinar distintas actividades, entre ellas:

- Programas de monitoreos de larga permanencia de fitoplancton y/o cianobacterias,
- Actividades de investigación de cianotoxinas,
- Información pública y

- Programas de reducción de la eutrofización para mejorar la calidad ecológica de los habitats acuáticos.

Esta experiencia muestra que la transición entre la recolección de información y la toma de acción puede ser gradual y por lo general comienza con la consulta de las autoridades públicas de salud. Esto puede incluir redes informales de información como es el caso de Dinamarca, en donde unidades administrativas e instituciones de investigación colaboran para recopilar información y el Instituto de Investigación Nacional Ambiental Danesa da una visión general de la ocurrencia de las cianobacterias en un sitio web.

En Sudáfrica, el trabajo en las cianotoxinas abarca muchas actividades incluyendo:

1. Asesoramiento del estado trófico.
2. Control de policía sobre la eutrofización.
3. Identificar cuales son las necesidades de investigación.
4. Manuales de monitoreo.
5. Formulación de un protocolo de investigación estratégico para cianobacterias y cianotoxinas y
6. Niveles de alerta para el tratamiento del agua de bebida.

En Estados Unidos, a nivel nacional, las cianobacterias y cianotoxinas han sido incluidas en la USEPA, como un "candidato en la lista de contaminantes", con la necesidad de que sea regulado.

9. 3. 1. Niveles guía de agua potable:

Cada país estipula sus especificaciones, aunque la mayoría adopta el límite guía sugerido por la OMS (Organización mundial de la Salud), de 1 µg/L de MC-LR para reservorios de agua, aunque Brasil y España no especifican la variedad de microcistina. Entre ellos se encuentra Brasil, República Checa, Francia, Polonia, España.

Las bases de la legislación federal **brasileña** es monitorear cuando hay ocurrencia de cianobacterias en los sistemas de suministro de agua potable y requiere un monitoreo intensivo y un análisis de cianotoxina y pruebas de toxicidad si las cianobacterias en agua cruda excede las 10.000 cel/ml o 1 mm³ de volumen. Esto incluye el estándar obligatorio de 1 µg/L aplicado a microcistina, sin variedad especificada, y como recomendación para saxitoxinas de 3 µg/L y para cilindrospermopsina de 15 µg/L.

Canadá como resultado de un esfuerzo de cooperación federal-provincial-territorial, tiene una concentración máxima aceptada (MAC) para MC-LR de 1.5 µg/L y la Salud de Canadá actualmente trata la necesidad de incluir otros congéneres en la inspección y el monitoreo.

República Checa en su legislación exige monitoreo del agua de la canilla para MC-LR con un límite de 1 µg/L y una actualización de la ley incluye alternativas de análisis de microcistinas tales como la cuantificación de biomasa de cianobacterias en agua cruda o bioensayos en conjunto con el recuento de células, requiriendo sólo análisis de toxinas si el umbral de biomasa de cianobacterias es excedido.

En cambio el Decreto de **Francia** requiere los análisis cuando hay una proliferación de cianobacterias en el agua cruda, exigiendo también el límite de 1 µg/L de MC-LR. **España** posee el mismo límite, pero al igual que Brasil, no especifica variantes, y lo interesante es que a este límite se lo deberá revisar cada 5 años con regímenes de muestreo especificado en relación a la cantidad de población servida.

En otros países como **Finlandia, Alemania e Italia** consideran a las algas como un parámetro accesorio, el cual debe ser monitoreado por las autoridades locales, sospechado como un riesgo para la salud humana y usando el límite sugerido por la OMS.

En la tabla siguiente, se resumen algunos países a modo de que quede más claro:

Tabla 2: Límites adoptados por algunos países

TOXINA	OMS (µG/L)	AUSTRALIA (µG/L)	BRASIL (µG/L)	CANADA (µG/L)	NUEVA ZE- LANDIA (µG/L)
MICROCISTINA-LR	1	1.3	1 (No específica variedad)	1,5	1 (p)
NODULARINA	sg	sg	1 (p)	sg	1 (p)
CILINDROSPERMOPSINA	sg	sg	15 (p)	sg	1 (p)
ANATOXINA-A	sg	sg	sg	sg	6 (p)
ANATOXINA-A(S)	sg	sg	sg	sg	1 (p)
SAXITOXINAS	sg	3 (p)	3 (p)	sg	3 (p)

sg: sin valor guía, p: provisorio

9. 3. 2.Exposición recreativa:

En calidad de asesorar para proteger a la salud pública se han seguido diversas aproximaciones, muchas de las cuales han estado más o menos cerca de lo que sugiere la OMS (Chorus & Bartram 1999; WHO 2003) usando dos niveles de densidad de células de cianobacterias y espumas provocando distintos grados de intervención, ya sea advirtiendo o cerrando el sitio de baño.

Los **Países Bajos** adoptaron el valor guía provisional sugerido por la OMS como advertencia de 10 µg/L para MC-LR y de 20 µg/L para cerrar los sitios de baño y cuando haya espumas provocar una advertencia y continuar monitoreando.

El Consejo Público de Higiene de **Francia**, ha definido 3 niveles de densidad celular como disparador para el manejo de responsabilidades y prohibir el contacto con el agua cuando se realizan deportes. La información del número de células es publicada en Internet dentro de un plazo no mayor a los 5 días del muestreo.

En **Australia**, es a menudo de preferencia el monitoreo de la densidad celular al límite de toxinas, porque este análisis se encuentra más disponible, debido al costo-

efectividad y la representatividad. Hay también 3 niveles, y de acuerdo a la historia de las floraciones del cuerpo de agua como a sus condiciones físico-químicas, y esto hace que se califique como bueno, regular o pobre.

En **Alemania**, se siguen 3 pasos guía basados en una inspección visual, seguido por la capacidad de producir floraciones por la carga de nutrientes, seguido por la biomasa de cianobacterias, con umbrales de advertencia y cierre, y con opción de permanecer abierto si los niveles de microcistinas se encuentran bajos y con altos niveles de cianobacterias.

En **Dinamarca** cuando ocurren floraciones masivas, el material es investigado, el riesgo evaluado y las autoridades alertan a las personas mediante señales de precaución.

En **Finlandia**, las autoridades de salud elaboraron guías de protección desde 1980, y una red de monitoreo de costo-efectividad así como ciudadanos que en forma privada, realizan inspecciones visuales.

Los **italianos** en cambio decretan la calidad del agua en forma indirecta mediante la proliferación de cianobacterias en base al oxígeno disuelto.

Hungría cuando tienen ocurrencia de floraciones de cianobacterias lo hace de forma indirecta a través de un límite para clorofila-a y espera directivas a seguir con determinación de toxinas.

9. 3. 3. Aproximaciones basadas en el riesgo

Tanto en el agua potable como en el agua recreativa, estos valores mencionados en cianotoxinas, son valores recomendados y en donde se sugiere que no sean excedidos. Para lograr esto, se necesita de un buen plan de manejo.

A modo de ej. Las Guías Australianas de Agua Potable (ADWG) proveen una guía para desarrollar tal plan de manejo. Ella incluye hojas para 4 cianotoxinas: microcistina, nodularina, saxitoxina y cilindrospermopsina. Para microcistina total se recomienda un valor de 1.3 µg/L y alternativamente un valor de densidad celular de 6.500 cel/ml, basado en una cuota de toxina por célula de 0.2 pg. La ADGW, no obliga estos valores, si no que los recomienda como un límite para analizar el peligro y asesorar en el riesgo para sistemas de suministro de agua, similar al Plan sugerido por la 3^o Edición de la Guía de calidad de agua de bebida de la OMS (WHO, 2003).

9. 3. 4. Otros temas que son necesarios que sean regulados

Hay que tener en cuenta que el ganado también se encuentra expuesto a cianotoxinas, por ello en Australia, la regulación incluye las Guías de cianobacterias para agua de bebida para ganado.

Además microcistina y nodularina puede aparecer en el pescado y mariscos, por lo cual muchos países lo han considerado a este tema. Por ej: Australia tiene niveles de alerta para la salud en un rango de 250 µg/Kg de pescado a 1500 µg/Kg de mariscos. Los límites están basados en los niveles de ingesta tolerable diaria para adultos modificada con el objetivo de proteger a la población de una exposición de corto tiempo.

Dinamarca por ejemplo tiene un servicio de línea telefónica para información cuando se cierran las áreas de cosecha de mariscos debido a toxinas algales (incluyendo las cianotoxinas).

En algunos países, la legislación también incorpora la aplicación de alguicidas y de tratamientos químicos lo cual puede promover la lisis celular y liberar las toxinas unidas a las células, por ejemplo en Brasil su aplicación no es permitida cuando se supera el límite umbral mayor a 20.000 cél/ml, y en Francia, el tratamiento con alguicidas es autorizado sólo si hay una solicitud y sólo como uso preventivo.

9. 4. Medidas de prevención, mitigación y remediación de los desarrollos masivos de cianobacterias

Todo cuerpo de agua tiene asociado un grupo de personas y organizaciones con vastos intereses creados y un variado grado de participación en el uso del recurso hídrico. Estos intereses pueden estar asociados con:

- El nivel del Agua: inundación, hidroelectricidad, transporte, recreación
- El contenido del agua: pesca y recreación
- La calidad del agua: agua para consumo humano, doméstico, recreación, bebida para ganado etc.
- La cantidad de agua: riego, industria, transporte
- La calidad del ecosistema acuático: conservación de biodiversidad, equilibrio ecológico

De esta manera, los cuerpos de agua no pueden suplir las demandas de todos los intereses creados en relación a su uso, surgiendo conflictos entre las diferentes actividades desarrolladas en una cuenca hídrica.

Ej: La derivación de demasiada agua para riego disminuye los niveles agua para transporte y puede incrementar la salinidad y el contenido mineral, reduciendo el número de peces y causando estancamiento. El aumento del estancamiento produce a su vez un incremento en la probabilidad del desarrollo masivo de cianobacterias

Es por ello que actualmente se hace imperiosa la *Gestión Integral de los Recursos Hídricos* (GIRH), la cual contempla la conservación y manejo del agua dentro de sistemas naturales con la integración tanto de sistemas sociales como económicos y la manera en que estos afectan las demandas del recurso base. Con la GIRH se propone desarrollar un enfoque más participativo de las diferentes organizaciones y personas naturales y jurídicas cuyo interés sea el agua y sus diferentes usos y beneficios en nuestro país.

Debe comprenderse que el manejo de los desarrollos masivos de cianobacterias es parte de la Gestión Integral de los recursos hídricos.

Existen cuatro niveles en los cuales se puede actuar para prevenir, mitigar y remediar los efectos adversos de los desarrollos masivos de cianobacterias:

- 1er Nivel: Prevención de eutrofización.

- 2do Nivel: Manejo del cuerpo de Agua (manejo de condiciones Hidrológicas/Hidráulicas)
- 3er Nivel: Medidas inmediatas y/o de corto plazo: (reubicación de toma de agua, barreras de contención de floración, alguicidas, etc.)
- 4to Nivel: Sistema de tratamiento de agua potable

En términos prácticos, cuando hablamos de control y manejo de las cianobacterias tenemos que tener en cuenta las siguientes circunstancias:

1. Las cianobacterias difícilmente serán eliminadas en su totalidad, pero podemos reducir la intensidad y la frecuencia de los desarrollos masivos de cianobacterias.
2. Para controlar toxinas, sabores y olores se necesita reducir la biomasa de cianobacterias.
3. Reducir la biomasa de cianobacterias requiere de un conocimiento de los factores que favorecen y limitan su crecimiento, tales como la química e hidrodinámica del cuerpo de agua.

El primer nivel a considerar para manejar los desarrollos masivos de cianobacterias es la prevención de la eutrofización de los cuerpos de agua. Las bases del desarrollo masivo de cianobacterias y otras algas fitoplanctónicas es la excesiva concentración de nutrientes y por ello el control de los mismos es una acción primordial. En muchos casos el nutriente clave es el fósforo, sin embargo las medidas tomadas para reducir la carga de este nutriente deben ser designadas simultáneamente para reducir la carga de nitrógeno.

El siguiente nivel de manejo es el manejo del cuerpo de agua lo cual puede incluir el uso de la ingeniería para alterar las condiciones hidrofísicas.

El próximo nivel incluye el uso de técnicas de control inmediatas, de corto plazo o de emergencia que pueden incluir el re-posicionamiento de la toma de agua, selección de la profundidad de la toma, toma de agua por filtración de ribera, el uso de barreras para restringir el movimiento de las natas o espumas y el uso de alguicidas (este último uso debe ser analizado cuidadosamente desde el punto de vista práctico y ambiental).

La opción final es el control del sistema de tratamiento de agua potable. Este nivel debería ser el último recurso de manejo, sin embargo, en la mayoría de los casos, al no existir una GIRH que permita prevenir el desarrollo masivo de cianobacterias, se recurre al mismo como primer alternativa para evitar efectos adversos en la salud de la población. En la Fig. 8 se esquematizan los diferentes niveles de acción.

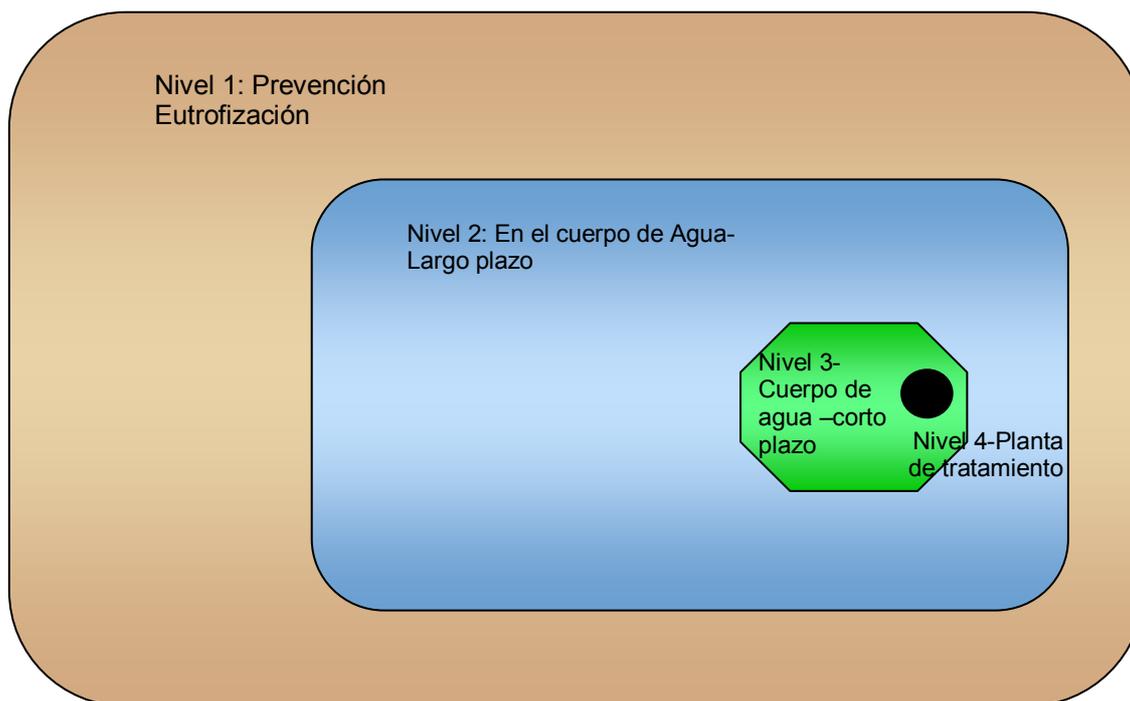


Fig 8. Esquema general de los niveles de acción para el control de los desarrollos masivos de cianobacterias

9. 4. 1. Nivel 1: Medidas de prevención de la Eutrofización

En la mayoría de los casos, la eutrofización se intensifica por actividades antropogénicas. Las tres principales fuentes externas de nutrientes al cuerpo de agua son:

- La escorrentía y erosión de zonas agrícolas fertilizadas
- La erosión resultante de la deforestación y,
- Los efluentes domésticos e industriales.

Las medidas tomadas en la cuenca deben enfocarse en el control de estos aspectos. En algunos casos puede ocurrir que la contaminación del aire por la quema de pastizales sea una fuente importante de ingreso de fósforo a través de las precipitaciones (Falconer, 2005).

Las medidas a tomar pueden ser de tipo estructural haciendo uso de la tecnología y la ingeniería o bien de tipo no estructural a través de la legislación y la educación. La Tabla 3 resume las medidas más importantes.

Tabla 3. Tipos de medidas a tomar para la prevención de la eutrofización y los consecuentes desarrollos masivos de cianobacterias.

<u>Medidas Estructurales</u>	<u>Medidas No estructurales</u>
<p><i>Control del Ciclo hidrológico y erosión de la tierra:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Reducción de la escorrentía superficial: <ul style="list-style-type: none"> ○ Forestación en la parte superior del cauce ○ Obras de recuperación de suelo ○ Protección de las vertientes. • Instalación de zonas de amortiguación entre campos cultivados y el lago. • Buenas prácticas agrícolas. Cultivo en terrazas. 	<p><i>Medidas Legislativas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Regulación rigurosa del uso de la tierra ○ Traslado de fuentes contaminantes fuera de la cuenca ○ Prohibición de explotaciones ○ Regulación de las fábricas contaminantes (producción de carne, lana, industrias alimentarias) ○ Regulación para reuso de aguas Residuales ○ Regulación venta y uso de detergentes fosforados
<p><i>Tratamiento de Aguas Residuales</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Plantas de tratamiento convencionales ○ Sistemas de tratamiento convencionales familiares ○ Humedales Artificiales ○ Separación y reuso de aguas residuales (saneamiento ecológico) 	<p><i>Medidas Educativas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Campañas de concientización sobre la reducción del uso de detergentes fosfatados en el hogar. ○ Campañas de concientización sobre buenas prácticas agropecuarias

Control del Ciclo hidrológico y erosión de la tierra

Obras de recuperación de suelo:

La erosión del suelo constituye la principal carga de fósforo que entra en los ríos si no se considera el fosfato de las aguas residuales. En los últimos 100 años ha ocurrido una erosión masiva del suelo en numerosos países, particularmente en aquellos con veranos muy secos seguidos de lluvias torrenciales. Esto ha producido una elevada concentración de sedimentos conteniendo fósforo en los cuerpos de agua. El fósforo unido a las partículas de sedimentos puede ser movilizado a formas solubles bajo condiciones anaeróbicas en el fondo de los lagos y los ríos de flujo lento, así se vuelve disponible para el crecimiento de las cianobacterias.

A continuación se muestran algunas de las distintas posibilidades de obras de recuperación de suelos degradados destinadas a evitar la erosión (CONAF 2004)



Fig. 9. Canal de Desviación: Obra de recuperación de suelos, manual o mecanizada, que se sitúa preferentemente en la parte superior o media de la ladera para capturar la escorrentía procedente de cotas superiores.



Fig 10 Gaviones: Obra de mampostería para la estabilización y protección de cursos de agua secundarios, generalmente temporales, tales como arroyos, esteros, quebradas y de cárcavas y contención de taludes.



Fig 11 Dique de Postes: obra para el control de cárcavas y de cursos de agua secundarios, generalmente temporales, tales como arroyos y quebradas, que actúa por resistencia mecánica.



Fig 12 Empalizada: obra de regulación de flujos hídricos y de contención de sedimentos en taludes, cárcavas y laderas inestables.

En Argentina, un ejemplo de estas prácticas se ha realizado en la provincia de Neuquén. Como parte del Programa Regional de Ecohidrología para América Latina y el Caribe de la UNESCO, se han realizado obras de recuperación del suelo y forestación de laderas. La Fig 13 muestra las etapas de recuperación del suelo



Fig 13: Etapas en la recuperación del suelo y forestación de la ladera. A) Pérdida de suelo, B) Obras de recuperación, C) suelo y vegetación recuperados. Sitio Demostrativo Lago Lacar. Programa Regional de Ecohidrología para América Latina y el Caribe de la UNESCO- Pcia Neuquén- Argentina.

Tareas de reforestación de ladera también se han realizado en Japón (Montañas Tanakami, Shiga Prefecture) utilizando la técnica Sabo. En este caso se involucro a la población, en las tareas de forestación para lograr una mayor conciencia y cuidado.

Recuperación de riberas e Instalación de zonas de amortiguación entre campos cultivados y el cuerpo de agua:

La reducción de la carga de nutrientes de fuentes de contaminación no puntuales tales como las zonas de agricultura extensiva requiere de la construcción zonas de amortiguación (zonas buffer) entre los cultivos y los cuerpos de agua que permitan absorber los nutrientes antes de llegar al agua. A continuación se muestran Protección y forestación de riberas con salicáceas en la localidad de Hualqui, VIII Región, Chile (Fig 14) y en el arroyo Trabunco en Neuquén Argentina (Fig. 15).



Fig 14: Forestación de riberas con salicáceas. Chile. (Fuente CONAF)

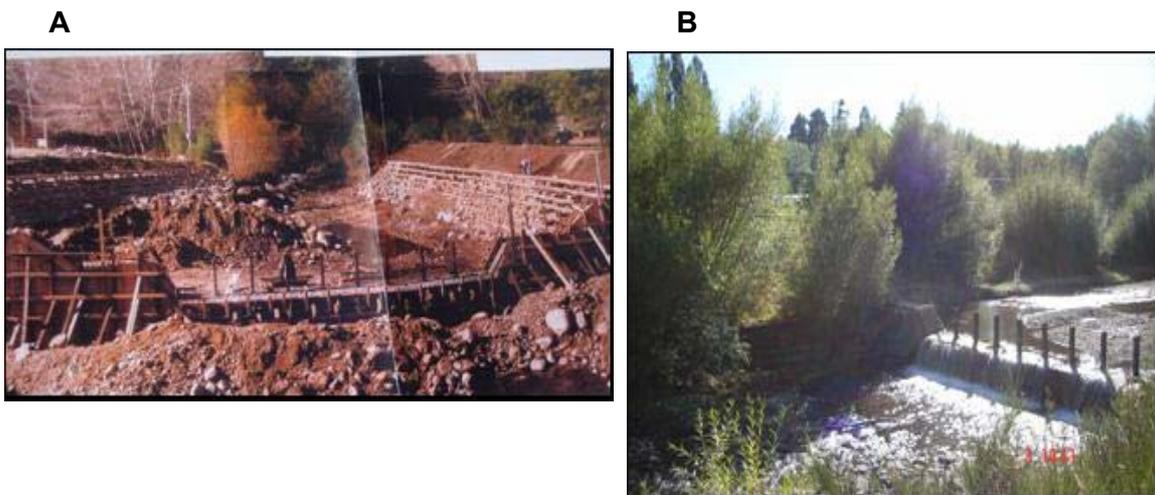


Fig. 15: Recuperación de orillas. A) Trabajos sobre el Arroyo Trabunco para la recuperación de sus márgenes. B) Márgenes del río Trabunco recuperados y reforestados. Neuquen. Argentina. Programa Regional de Ecohidrología para América Latina y el Caribe de la UNESCO. Sitio Demostrativo Lago Lácar

Educación y Legislación:

Regulación rigurosa del uso de la tierra: La calidad de los cuerpos de agua es producto de las actividades que se realizan en su cuenca, por ello la regulación del uso de la tierra es una de las medidas más importantes a tomar. El lago Bornsjon que abastece a la ciudad de Estocolmo en Suecia se puede citar como un ejemplo de estas medidas. Sobre una gran área de la cuenca de este lago no se puede realizar ningún tipo de actividades y solo algunas son permitidas. Por ejemplo, los granjeros ubicados en estas tierras no pueden tener más de 30 cabezas de animales.

Regulación del uso de detergentes fosforados: El uso de menor cantidad de detergentes y de detergentes con poco o nada de polifosfatos puede reducir las cargas de fósforo considerablemente. Una campaña realizada en Polonia "el lavado puede ser económico" resultó ser muy exitosa. La carga de fósforo en muchas ciudades y poblados cayó en más de un 20%. Los resultados de la campaña fueron monitoreados para incentivar los diferentes actores de la cuenca en continuar los esfuerzos. La campaña también despertó la conciencia del público en general y en particular la preocupación del efecto de los detergentes en la eutrofización (UNEP-IETC, ILEC. 2001). En Canadá experiencia de la prohibición de la venta de detergentes fosfatados fue exitosa (Falchner, 2005).

Regulación del reuso de aguas residuales tratadas: el tratamiento de las aguas residuales requiere de una gran inversión. Para la eliminación del fósforo y el nitrógeno se requiere de plantas de tratamiento avanzadas incrementándose aun más los costos. La reutilización de aguas residuales parcialmente tratadas para riego forestal es una práctica que, controlada, permite la reutilización de los nutrientes. Esta práctica debe ser regulada para una correcta disposición de las aguas residuales.

Campañas masivas de buenas prácticas agrícolas y uso eficiente de fertilizantes agrícolas: la construcción de zonas buffer para reducir los impactos de la agricultura no es suficiente en si misma. Se debe apoyar en campañas masivas para persuadir a los agricultores a usar menor cantidad de fertilizantes (nótese que al menos entre el 10-20% de los fertilizantes aplicados no tiene casi efectos en la producción agrícola, pero puede contribuir significativamente al la carga de nutrientes que escurre a los cuerpos de agua). Una campaña realizada en Holanda a comienzos de 1990 resultó en la reducción de la contaminación difusa, probablemente porque los agricultores calcularon que se ahorraría mas dinero reduciendo los fertilizantes. Sin embargo, la reducción no fue suficiente y se consideró la aplicación de un "impuesto verde" (UNEP-IETC, ILEC-2001).

Tratamiento de Aguas Residuales:

Aproximadamente la mitad del fósforo en un efluente cloacal proviene de los desechos humanos, y el resto de detergentes y productos industriales. Las excretas humanas (heces y orina) contiene 2 a 4 g de fósforo por persona/día. Esto implica que para una ciudad de unos 350 000 habitantes, se genera 1 tonelada de fósforo proveniente de los desechos humanos que ingresa a los sistemas de tratamiento por día. Esta concentración puede duplicarse en zonas donde el uso de detergentes fosfatados no se ha prohibido. A continuación se describen algunos procedimientos para el tratamiento de las aguas residuales.

Plantas de tratamiento convencionales:

Para que este tipo de plantas contribuya a la reducción de la carga de fósforo, deben incluir en su proceso una unidad de eliminación del fósforo ya sea por procesos químicos (ej: precipitación con sales de hierro) o biológicos (a través de microorganismos sometidos a condiciones anaeróbicas y aeróbicas). Las técnicas de reducción de fósforo ya sean químicas o biológicas pueden ser usadas para mejorar la calidad del agua entrante en el cuerpo de agua, sin embargo el uso de estos métodos resulta costoso.



Fig. 16: Planta municipal de tratamiento de efluentes cloacales

Sistemas de tratamiento convencionales a pequeña escala o familiares:

En el caso de zonas rurales donde no es posible instalar una red cloacal, se utilizan unidades de tratamiento familiares. El sistema de tratamiento tiene dispositivos de alarma que indican al propietario sobre algún problema en su funcionamiento.



Fig. 17: Sistemas descentralizado de tratamiento de efluentes domésticos Lago Borsjön. Suecia.

Humedales Artificiales:

Los humedales artificiales son ampliamente utilizados para la reducción de nutrientes de aguas residuales, aguas de escorrentía urbana, y ríos que drenan en tierras agrícolas. Este sistema puede ser usado también como parte final en el tratamiento de los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales.



Fig. 18: Humedal artificial para tratamiento de aguas residuales. México.

Saneamiento Ecológico:

Un aspecto innovador en el tratamiento de excretas humanas son los sistemas de saneamiento ecológico o ecosan. Los sistemas tradicionales de saneamiento con transporte de agua trasladan los nutrientes a los cuerpos de agua y requieren de un tratamiento avanzado al final del proceso para su eliminación. Los sistemas de saneamiento ecológico implican un cambio en este concepto. Basados en el principio de que la orina contiene la mayor concentración de nutrientes (fósforo, potasio y nitrógeno) se realiza la separación de las heces y la orina. La disposición separada de las heces y orina y su reutilización, posterior al tratamiento, son conceptos claves del saneamiento ecológico. Recientemente la organización de Mundial de la salud ha editado LAS GUÍAS PARA REUSO SEGURO DE AGUA RESIDUAL, LAS EXCRETAS Y EL AGUA GRIS. Las guías están disponibles en el sitio web de la OMS y tratan los siguientes aspectos:

Volumen 1: Aspectos Políticos y Regulatorios

Volumen 2: Uso del agua residual en Agricultura

Volumen 3: Uso de Agua Residual y Excretas en Acuicultura

Volumen 4: Uso de Excretas y Agua Gris en Agricultura.

(http://www.who.int/water_sanitation_health/norms/en/index.html)

9. 4. 2. Nivel 2: Medidas en el Cuerpo de Agua

Cuando la reducción de la carga de nutrientes desde la cuenca al cuerpo de agua resulta impracticable o los sedimentos del embalse contienen gran carga de nutrientes es posible utilizar una serie de técnicas físicas, químicas y biológicas que permiten la disminución de los desarrollos masivos de cianobacterias.

Debido a la dificultad de reducir las cargas de nutrientes, lo cual requiere la cooperación de varios sectores de la población ubicados en la cuenca aguas arriba, muchas plantas potabilizadoras han optado por soluciones ingenieriles aplicables al cuerpo de agua. En la tabla se presenta algunas técnicas utilizadas.

Tabla 4 Medidas Internas al cuerpo de agua		
Tipo de Medidas	Mediatas	Inmediatas
Medidas Físicas	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mezcla y desestratificación térmica ○ Aireación y oxigenación en el estrato inferior del lago ○ Prevención de las disolución de sedimentos: Dragado, recubrimiento del fondo ○ Ajuste del nivel o flujo de agua 	
Medidas Químicas		Alguicidas, precipitantes o selladores
Medidas biológicas	Biomanipulación	Eliminación mecánica de las algas (cosecha de algas)

Mezcla y Desestratificación térmica:

A través de la mezcla artificial, las cianobacterias son transportadas hacia debajo de la zona eufótica y de esta manera su crecimiento se ve limitado por la reducción de luz. Las diatomeas y las algas eucarióticas son transportadas hacia la zona superior con disponibilidad de luz permitiendo de esta manera la competencia por nutrientes. Por otra parte, debido a la oxigenación del estrato de agua inferior se reduce la liberación de fósforo desde el sedimento. Uno de los problemas más importantes de esta técnica es la energía necesaria para desestratificar todo el cuerpo de agua.



Fig. 19: Mezcladores de superficie. (Foto: gentileza Dr. Michael Burch-CRC for water quality and Treatment-University of Adelaide-Australia)



Fig. 20: Desde adelante hacia atrás, sistema de circulación del estrato superior, sistema de aireación del estrato inferior y fuente de aireación. (Fuente: Lagos en el mundo-Agencia Japonesa de Medio Ambiente)

Aireación y oxigenación en el estrato inferior del lago:

Se insufla aire con un compresor a través de tuberías que se ubican en el fondo del embalse para lograr la oxigenación de los estratos inferiores y así limitar la liberación de fósforo desde los sedimentos. La utilización de este sistema en un pequeño embalse en Palm Island en Australia ha tenido efectos sustanciales en el control de los desarrollos masivos de cianobacterias. Sin embargo, su instalación en el Embalse Myponga en Australia del Sur resultó ser ineficaz. En Argentina, se está en proceso de instalación de aireadores en el Embalse San Roque

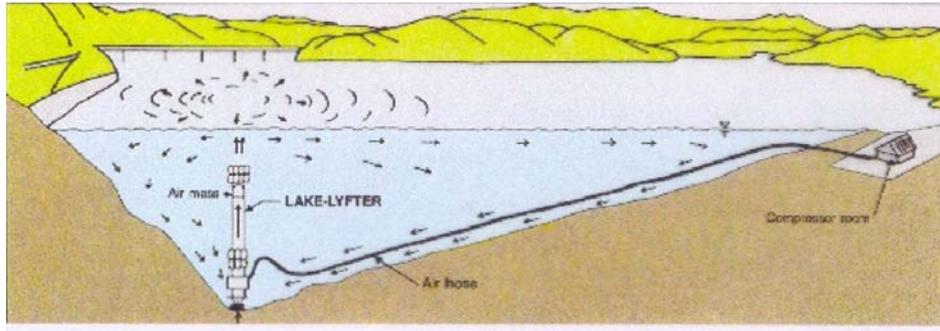


Fig. 21: Esquema ilustrativo de sistemas de aireación de capas inferiores

Prevención de las disolución de sedimentos: Dragado, recubrimiento del fondo

El recubrimiento del fondo con arcilla o arena se ha utilizado para suprimir la solubilización del fósforo en pequeños lagos recreativos. Adicionalmente las microcistinas se adsorben en la arcilla. El dragado se realiza a los fines de remover el sedimento rico en fósforo. Este procedimiento requiere que se cumplan ciertas condiciones para ser efectivo. El sedimento puede estar a gran profundidad, podría haber una resuspensión del mismo durante el tiempo de dragado y el mismo debe ser removido y llevarlo a un destino final

9. 4. 3. Nivel 3: Medidas en el Cuerpo de Agua inmediatas

Cosecha de algas: Practicas de cosecha de algas se ha implementado en el lago Kasumigaura, Japón, utilizando una embarcación con una bomba aspirante. Las algas recolectadas luego son deshidratadas, tratadas y reutilizadas como fertilizantes.

Barreras de contención: Son utilizadas especialmente en la zona de la toma de agua para prevenir el desplazamiento de las espumas en la zona de captación.



Fig. 22: Barreras de contención (Fuente: Chorus & Bartram, 1999)

Uso de Alguicidas: El control de los desarrollos masivos de cianobacterias en los embalses utilizando cobre es el método más antiguo y comúnmente aplicado en vastas áreas del mundo. Sin embargo, su uso resulta controvertido ya que es un tóxico no específico para los organismos acuáticos y se acumula en los sedimentos. Como resulta-

do del probable daño ecológico derivado de repetidas aplicaciones de cobre en los cuerpos de agua, su uso esta sujeto a regulación por las autoridades locales y/o nacionales y esta totalmente prohibido en algunos piases.

El cálculo de la dosis de cobre a aplicar se puede basar en el volumen de 1 o 2m de profundidad desde el pelo del agua. A 1mg/l de concentración final y 2m de profundidad, serán necesarias dos toneladas de cobre por kilómetro cuadrado de área (8 toneladas de cristales de sulfato de cobre).



Fig. 23: Aplicación de alguicidas. (Foto: gentileza Dr. Michael Burch-CRC for water quality and Treatment-University of Adelaide-Australia).

La lisis de cianobacterias genera dos problemas más, una gran carga orgánica y la liberación de toxinas. Para minimizar estos problemas la aplicación debe realizarse en los estadios tempranos del desarrollo algal.

Ubicación de la Toma de agua: Las cianobacterias pueden estar dispersas en diferentes formas en el cuerpo de agua (Fig 24), de allí la importancia de monitorear y conocer la distribución de las mismas a los fines de extraer el agua de las capas donde las mismas no se encuentran o se desarrollen escasamente.

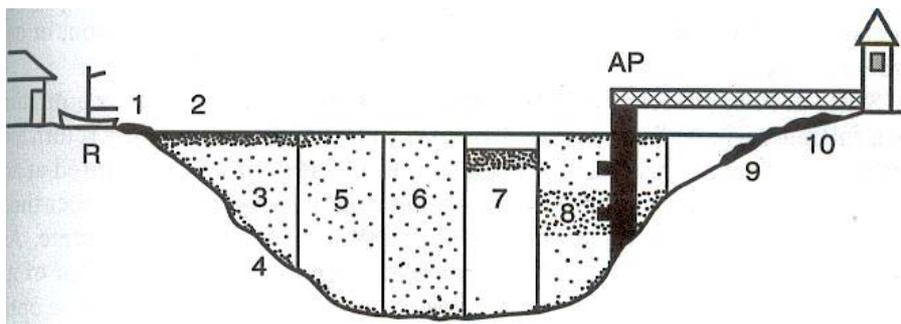


Fig. 24: Posibles localizaciones de las cianobacterias.

Bibliografía

- Aranda-Rodríguez R., Benoit F. and Giddings M. 2005. Canada: The Development of a Microcystin Drinking Water Guideline. In: Chorus I. (Ed.). *Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment, Risk Management and Regulations in Different Countries*. Federal Environmental Agency. Dublin. 117p (disponible en: <http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/downloads/trinkwasser/Cyanotoxinregelungen-international.pdf>)
- Burch M, Brookes J and Newcombe G. 2007. Management and treatment of toxic cyanobacteria. Invited speaker. VIIIth International Conference on Toxic Cyanobacteria-
- Chorus I. 2005. Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environmental Agency. Editorial: Section II 3.3. Berlin- Alemania. ISSN 0175-4211. Disponible en: www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/2910.pdf
- Chorus I Bartram J. 1999. Toxic cyanobacterias in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Published on the behalf of WHO by E&FN Spon, London.
- Falconer R, Ian R. 2005. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: Cylindrospermopsins and Microcystins. CRC Press – USA.
- Fomento a la Forestación y Recuperación de Suelos Degradados. 2004. Gobierno de Chile. CONAF. Departamento Fomento y Desarrollo Forestal. Sección Programas y Proyectos. 14pp
- ILEC/Lake Biwa Research Institute [Eds]. 1988-1993. Survey of the State of the World's
- Izaguirre, C. Román N. 2006. Remoción de microcistina por acción del cloro. Revista AIDIS.
- Lakes. Volumen I-IV. International Lake Environment Committee, Otsu and United Nations Environment Programme, Nairobi.
- Ministério da Saúde. 2003. Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano. Ed. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, Brasília, 56 p. Disponible en: http://bvsm.sau.gov.br/bvsm/publicacoes/mnl_ciano_bacterias.pdf
- Ministério da Saúde. 2005. Portaria MS n.º 518/2004. Editora do Ministério da Saúde. Brasília, 28 p. (Série E. Legislação em Saúde) ISBN 85-334-0935-4
- Ministry of Health. 2005. Draft Guidelines for Drinking-water Quality Management for New Zealand. (Disponible en: www.moh.govt.nz/moh.nsf/by+unid/5A25BF765B400911CC25708F0002B5A8?Open)
- NORMA IRAM 29012-1:2002. Calidad ambiental- Calidad de agua. Muestreo. Parte 1: Directivas generales para el diseño de programas de muestreo. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (Argentina).
- NORMA IRAM 29012-2:1996. Calidad del medio ambiente. Agua. Muestreo. Directivas generales sobre técnicas. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (Argentina).
- NORMA IRAM 29012-4:97-12-26. Calidad del medio ambiente. Agua. Muestreo. Parte 4: Directivas para el muestreo de aguas de lagos naturales y artificiales. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (Argentina).
- Otaño, S. Román N. 2008. Floración de cianobacterias sobre la costa del Río Uruguay: Verano del 2008. V Taller Internacional sobre Enfoques Regionales para el Desarrollo y Gestión de Embalses en la Cuenca del Plata. Itaipú (Paraguay- Brasil), 11-14 de marzo 2008. Instituto Argentino de Recursos Hídricos. 12 pp
- Ransom R., San Soong F., Fitzgerald J., Turczynowicz L., El Saadi O., Roder D., Maynard T. and Falconer I. 1994. Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae). National Health and Medical Research Council. Australia, Looking Glass Press. 108 p.
- Ruibal Conti, A.L.; Reguerira, M. and Guerrero, J.M. 2005. Levels of microcystins in two reservoirs used for water supply and recreation: Differences in the implementation of safe levels, *Environ Toxicol* 20: 263–269.
- Ryding S.-O. Rast W. (Eds). 1989. The control of eutrophication of lakes and reservoirs. Man and the Biosphere series. UNESCO. Vol 1.
- The Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment. Cyanobacteria Management and Implication for Water Quality. Australia. 36 p (disponible en: http://www.waterquality.crc.org.au/dwfacts/techfact_cyanobacteria.pdf)
- UNEP-IETC,ILEC. 2001. Lakes and Reservoirs. Water quality: the Impact of Eutrophication. (Vol 3) 26p.
- UNEP-IETC/ILEC. 2001. Lakes and Reservoirs: Water quality: The impact of Eutrophication. Vol.3.
- WHO. 2003. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: Coastal and fresh waters. Geneva.

Capítulo 10: Tratamientos para disminuir la incidencia de cianobacterias y cianotoxinas en plantas potabilizadoras

Carmen Izaguirre
Nancy Román
Cinthia G. Bogarin

10. 1. Generalidades

Las plantas potabilizadoras convencionales en la Argentina por lo general cuentan con las siguientes etapas básicas de tratamiento:

- Captación de agua cruda
- Dispersión del coagulante (generalmente con sulfato de aluminio)
- Floculación
- Sedimentación (por gravedad en tanques con purga de lodos)
- Filtración rápida (manto de arena y grava)
- Desinfección (cloro gas o hipoclorito de sodio)
- Alcalinización
- Impulsión a la red

El agua de suministro público de acuerdo al Código Alimentario Argentino debe tener cloro residual total mínimo de 0.30 mg/l y pH entre 6.5 y 8.5 o pH de saturación ± 0.2 .

10. 2. Datos técnicos de plantas potabilizadoras

De acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud los operadores de planta potabilizadoras de captación superficial deberían realizar una evaluación de la capacidad de amortiguar floraciones algales en el agua cruda, para lo cual es fundamental que cada operador conozca en detalle aspectos técnicos de la operación de cada planta en particular como ser:

- *Presiones de bombeo* (altas presiones conducen a lisis celular que puede liberar toxinas en el agua cruda).
- *Tiempos de retención de lodos en sedimentadores* (alta permanencia de flocs en sedimentadores puede producir liberación de toxinas).
- *Tiempos de retención del agua en cada etapa del proceso* (es fundamental conocer el tiempo que transcurre desde el punto de captación hasta la dispersión de coagulante para evaluar la potencial eficiencia de aplicación de PAC en

el punto de toma, así como el tiempo de contacto del agua tratada con el cloro antes de salir de la planta para remover toxina disuelta con cloro).

- *Caudales empleados en cada etapa del tratamiento.*
- *Dosis de productos químicos aplicados.*
- *Frecuencia de lavado de filtros, velocidades de filtración.*
- *Parámetros de calidad de las fuentes de captación y de cada etapa del proceso.*

Deben estar muy bien definidos los puntos de aplicación de productos químicos.

Con los datos citados se podría hacer una proyección de la capacidad de remoción de algas y toxinas en cada planta.

Esta proyección solo será corroborada cuando se esté frente a una floración, dado que las características particulares de cada floración y la evolución de la misma (recuentos de algas, especies de algas, metabolitos liberados, condiciones ambientales, materia orgánica acompañante, etc) son las que determinarán en definitiva el comportamiento de cada unidad de tratamiento y la necesidad o no de implementación de tratamientos especiales.

10. 3. Controles que se deberían realizar en la planta cuando se detectan floraciones en la fuente de captación de agua

Cuando se detecta la floración en el agua cruda por los controles de rutina es fundamental realizar:

10. 3. 1. Recuentos de algas en cada etapa del proceso, para evaluar remociones celulares.

10. 3. 2. Determinación de toxinas en cada etapa del proceso, para evaluar remociones y efectividad de cada etapa.

Es importante conocer el porcentaje de toxina intra y extracelular, en la bibliografía se pueden encontrar datos para determinadas condiciones ambientales para cada especie, es conveniente corroborar para las condiciones de cada planta en particular para cada etapa del proceso.

Los porcentajes de toxina intracelular de mayor a menor de acuerdo a ensayos a escala laboratorio de diferentes autores serían: microcistina mayor que anatoxina mayor que saxitoxina mayor que cilindrospermopsina.

Este dato es importante conocer para enfocar el tratamiento en optimización de coagulación y eliminación de células enteras para las especies con mayor proporción de toxina intracelular como las productoras de microcistina, así como optimización de la postcloración para especies con menor proporción de toxina intracelular pero mayor sensibilidad al cloro como las productoras de cilindrospermopsina.

En los casos de floraciones mixtas, se deben tener en cuenta ésta variabilidad.

10. 3. 3. Panel de olores para detectar en forma temprana la presencia de metabolitos (Ver desarrollo en apartado 10.6).

10. 3. 4. Ensayos de jarra en agua cruda (ver procedimientos) para encontrar dosis óptima de coagulante para remoción de células, así como dosis óptima de polielectrolito catiónico. Se debe registrar porcentaje de remoción para cada especie en particular, sobre todo ante floración de especies nuevas con comportamiento desconocido para el operador.

Este punto es muy importante sobre todo para floraciones de *Microcystis aeruginosa*, dado que en ésta especie la microcistina es entre un 95 y 98 % intracelular y en condiciones normales de operación las células no son lisadas por sulfato de aluminio, con lo cual la optimización de la coagulación resulta en una alta eficiencia del tratamiento.

En la planta potabilizadora de Corrientes capital con tratamiento convencional con sedimentación acelerada por seditubos, se logró amortiguar una floración de *Microcystis aeruginosa* en el año 2004 solamente con optimización de coagulación, lográndose remociones celulares superiores al 99,9% y remociones del 100% de microcistina en agua decantada, con recuentos celulares en agua cruda que alcanzaron los 5000-6000 cél/ml con 1.3 µg/l de microcistina.

Por lo tanto la necesidad de implementación de tratamientos especiales es en función de la naturaleza, evolución de la floración y metabolitos asociados, la optimización de procesos y la eficiencia de los mismos.

10. 3. 5. Control periódico de trihalometanos (THM) en agua clorada: cuando aparecen floraciones en el agua del río la evolución de la misma va acompañada de importante cantidad de materia orgánica intra y extracelular que al estar disuelta en el agua puede superar la etapa de coagulación y puede ser precursora de subproductos de la cloración, por lo tanto es importante hacer ésta determinación.

10. 3. 6. Ensayo de demanda de cloro (procedimiento b) es fundamental conocer la dosis requerida de cloro a aplicar para tener cloro libre superior a 0.5 mg/l.

10. 3. 7. Control de carbono Orgánico: la materia orgánica presente en el agua natural es muy variada, las mediciones del carbono orgánico total y disuelto proporcionan información de las características químicas y concentración.

10. 4. Evaluación de remoción de algas, toxinas y metabolitos para tratamientos convencionales y especiales

En base a los resultados obtenidos de los controles de proceso mencionados se puede evaluar la necesidad de incorporación de tratamientos especiales u opcionales para mantener la calidad del agua dentro de parámetros de calidad requeridos por las normas y que sean aceptables para los consumidores.

Para implementación rápida de éstos tratamientos las plantas potabilizadoras deben tener adecuadas sus instalaciones, contar con lugar para almacenamiento de productos especiales con las condiciones ambientales adecuadas a cada producto, tanques de preparación de soluciones, que sean suficientes para asegurar dosificación continua,

dosificadores adecuados para inyectar los caudales requeridos en los puntos de inyección necesarios.

10. 4. 1. Alguicidas: no se recomienda el uso de alguicidas como sulfato de cobre, quelatos de cobre, etc en el agua cruda que ingresa a la planta potabilizadora cuando son floraciones importantes debido a que producen lisis celular y liberación de toxinas.

10. 4. 2. Coagulantes y coadyuvantes existe evidencia de que las sales de aluminio como las de hierro usadas como coagulantes no lisan células, por lo que si se ajusta éste proceso y se incorpora un coadyuvante como el polielectrolito catiónico se puede eliminar elevado porcentaje de células enteras. Este proceso no elimina o elimina muy bajo porcentaje de toxina disuelta o extracelular y es muy poco eficiente en la eliminación de olores y sabores.

Por lo general la dosis óptima de coagulante aplicada en planta es la que produce valores mínimos de turbiedad en el ensayo de jarra, ésta dosis no siempre coincide con la dosis óptima para remoción de células, generalmente ésta es más alta.

La floculación-coagulación de cianobacterias se produce por los mismos mecanismos que la remoción de partículas coloidales bacterias, virus y otros microorganismos, en suspensión, cada especie algal influencia el tratamiento, así la especie *Microcystis aeruginosa* que forma por lo general colonias grandes que pueden llegar hasta el milímetro, su forma esférica favorece la coagulación – floculación por mecanismos de adsorción y neutralización de cargas, en cambio especies filamentosas como *Cylindrospermopsis raciborskii* requieren mayores dosis de coagulante y predominan los mecanismos de barrido. Cuando el florecimiento algal es importante puede haber problemas de flotación de colonias o filamentos.

Generalmente se requieren dosis mínimas de polielectrolito (0.20 mg/l) cuya función es aumentar el tamaño de los flocs para mejorar la etapa de sedimentación, si se supera la dosis de polielectrolito requerida se produce el efecto inverso al deseado con reestabilización de la suspensión de algas. En el **procedimiento** se presenta la forma de preparación y dosificación de polielectrolito.

Los mecanismos de coagulación-floculación poseen un rango óptimo de pH, entre 5 y 8 para coagulantes de aluminio (experimentalmente se encuentra el mejor rango; para desestabilización de arcillas está entre 6-7) y requieren de valores de alcalinidad que están en función de la dosis de sulfato de aluminio necesaria, esto se debe tener en cuenta para evaluar la necesidad de prealcalinización o acidificación, que puede realizarse con solución de cal hidratada, soda cáustica o solución de ácido sulfúrico concentrado o ácido clorhídrico comercial (37%) respectivamente.

Cuando el florecimiento algal es importante el pH puede alcanzar valores de hasta 10 unidades de pH.

10. 4. 3. Pre-oxidación:

10. 4. 3. 1.Precloración: Algunas plantas convencionales incorporan al tratamiento una etapa de preoxidación con cloro del agua cruda, éste tratamiento no es recomendable por que valores tan bajos como 0.2 mg/l producen liberación de toxina intracelular y la formación de subproductos de la cloración como los Trihalometanos (THM) que son compuestos cancerígenos; en caso de realizarse precloración debe ser

bajo condiciones controladas, THM en agua de salida de planta y red no debe superar 100 µg/l.

La sensibilidad de las toxinas al cloro de acuerdo a ensayos de laboratorio de diferentes autores sería:

Cilindrospermopsina mayor que anatoxina mayor que microcistina mayor que saxitoxina.

La precloración además de liberar toxinas puede liberar otros metabolitos como los productores de olores y sabores que pueden incluso intensificarse por cloración.

10. 4. 3. 2. Preozonización: El ozono tiene un gran poder como agente oxidante y es ampliamente usado en el tratamiento de agua de los países desarrollados para remover los poluentes orgánicos peligrosos y para hacer la desinfección.

Como el ozono no es un agente oxidante selectivo, algo de la materia orgánica también será atacada, o sea, que la oxidación de las toxinas ocurrirá en competencia con la de la materia orgánica. Por lo que la concentración de ozono deberá superar ésta demanda para remoción eficiente de microcistinas.

Comparando, ozono, permanganato de potasio y carbón activado en polvo, agregado en el paso de pre-floculación experimentando en una planta piloto indicaron que la concentración más baja de microcistina soluble en el agua tratada fue con el carbón activado. Tanto el permanganato como el ozono, producen la ruptura de la célula en la etapa de floculación/filtración.

10. 4. 3. 3. Otros oxidantes: Hart et al. (1998) informa que la radiación ultravioleta y el peróxido de hidrogeno no son efectivos en la remoción de toxinas, mientras que el permanganato de potasio presenta gran potencial de remoción de toxinas disueltas.

En relación a los oxidantes en general, es importante destacar que la selección del punto de aplicación (pre o post-oxidación) tiene impacto sobre la efectividad de la remoción de toxinas intra y extracelular. Una pre-oxidación puede causar lisis celular liberando toxinas. El uso de oxidantes antes de la remoción de células debe ser analizado con mucha precaución.

10. 4. 4. Carbón activado

10. 4. 4. 1. Generalidades

El carbón activado, tanto en polvo (PAC) como granular (GAC), han sido ampliamente usado durante décadas para eliminar contaminantes, como productos químicos orgánicos sintéticos (SOC), compuestos orgánicos volátiles (COV), y el sabor y el olor que causan los compuestos (Snoeyink 1990).

Dado que el gusto y el olor son a menudo episodios de temporada e impredecibles, el PAC se utiliza con más frecuencia que los GAC, ya que se pueden agregar en cantidades variables en función de las condiciones del agua y el grado de "olor" que presenta el episodio. El PAC sigue siendo una opción común para eliminar estos compuestos, ya que es más eficaz que otros procesos de tratamiento como la cloración, la aireación, la biodegradación y la filtración (Lalezary 1997); además la popularidad en el uso del PAC es también a causa de su bajo capital y los gastos de mantenimiento, así como su capacidad de adaptación al tratamiento. Esta adaptabilidad es muy importante, como los episodios de olores suelen ser estacionales y en ocasiones esporádicas,

los costos del GAC necesarios para el tratamiento serían altísimos a fin de proveer de agua estéticamente agradable e innecesarios para la mayor parte del año (MacLeod 2000). Estas inversiones se justificarían cuando se capta agua de reservorios con floraciones permanentes.

Otra ventaja del carbón activado en polvo es que el tamaño inferior de las partículas contribuye mejor a la difusión; los pequeños granos del PAC adsorben los compuestos orgánicos más rápidamente que el GAC (Najm 1990).

10. 4. 4. 2. Carbón activado en polvo (PAC): Las prácticas convencionales de tratamiento de agua (coagulación - floculación - sedimentación – filtración - cloración) no son suficientes para eliminar metabolitos como metilisoborneol (MIB) y geosmina generadores de olores y sabores y algunas veces tampoco son suficientes para remover toxinas disueltas.

- La adición de PAC para el tratamiento de las aguas es el método más utilizado para la extracción de compuestos orgánicos en general entre los que se encuentran las toxinas y los generadores de olores y sabores.
- Uno de los principales problemas cuando se utiliza carbón activado en polvo consiste en el desconocimiento de la dosis a agregar. Sobredosis con PAC generan un alto costo de exceso mientras que bajas dosis se traducirán en la persistencia de los problemas de sabor y olor en el sistema de distribución, con las consecuencias probables de las quejas de consumidores y la insatisfacción general.

Los siguientes factores presentan impacto en la cantidad de carbón activado en polvo para ser usado en la dosificación.

Tiempo de contacto. Un aumento en tiempo de contacto incrementará la cantidad removida hasta alcanzar el equilibrio de adsorción.

Tipo de carbón activado en polvo. Algunos PAC's funcionan mejor que otros en la eliminación de MIB, geosmina y toxinas.

La calidad del agua. Los cambios en la concentración y el carácter de materia orgánica natural (MON) pueden afectar el rendimiento del PAC.

El punto de aplicación del PAC en la planta. La aplicación de PAC en el punto más cercano a la toma de agua previo a la floculación – coagulación tiene la ventaja de adsorber compuestos orgánicos en general (MON, Toxina disuelta, geosmina y MIB) lo que minimiza la formación de THM en la etapa de cloración, pero la desventaja de competencia de MON cuando el objetivo es remover toxinas u olores por lo que se necesitan dosis mayores que cuando se aplica en otras etapas posteriores del tratamiento.

Una ventaja adicional es la optimización de la coagulación, ya que forma un floc de mayor peso con mejor sedimentación lo que da valores de turbiedad menores en agua decantada.

En plantas potabilizadoras convencionales operadas por Aguas de Corrientes S.A. sobre la costa del río Uruguay, frente a una floración de *Anabaena spiroides*, la combinación de aplicación de PAC en el punto de toma de agua cruda con postcloración, demostró eficiencia de remoción de geosmina entre un 79 y 99 % para geosmina inicial en agua cruda entre 240 y 463 ng/l con THM residual total entre 9 y 40.5 µg/l con predominio de cloroformo.

En ensayos de laboratorio donde se probaron dos marcas comerciales de PAC se obtuvo los siguientes resultados para remoción de microcistina en una muestra del río Uruguay con floración de *Aphanizomenon schindleri* como especie dominante con un recuento celular de 4.000.000cél/ml y 10 µg/l de microcistina inicial.

Tabla 1-Ensayos con PAC para remoción de microcistina

Tiempo (min.)	% Marca A	% Marca B
5	43	59
60	61	66

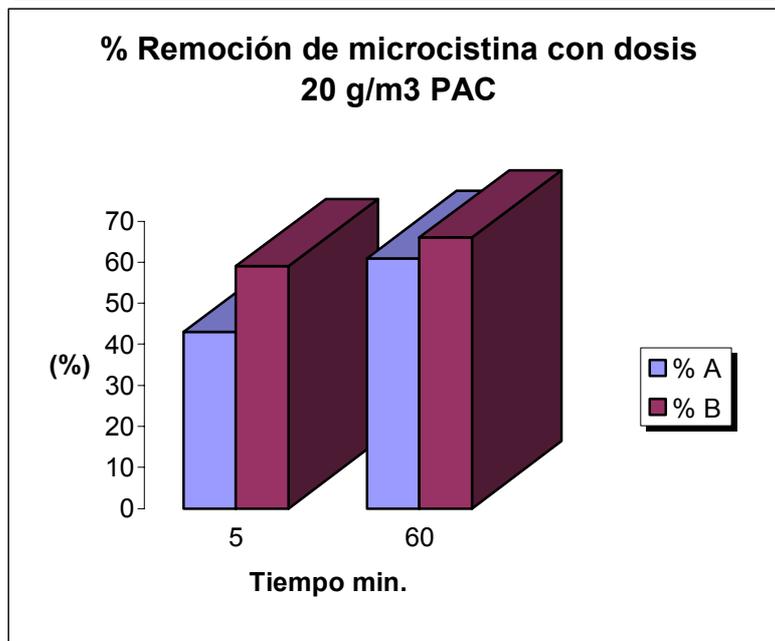


Fig. 1: Ensayos con PAC para remoción de microcistina

Puede observarse diferencia entre ambas marcas, se puede ver además que entre un 70 y 90 % de remoción total se alcanza con tiempos de 5 min.

En el **procedimiento** se presenta la forma de preparación y dosificación de PAC.

En el apartado 7 se presenta la metodología para la realización de ensayos con PAC.

10. 4. 4. 3. Carbón activado granular (GAC)

Es usado generalmente en un filtro postratamiento después de que la mayor cantidad de materia orgánica es removida durante la etapa de clarificación, la capacidad

del GAC para remover compuestos orgánicos está caracterizada por isothermas de adsorción.

La única diferencia entre un carbón granular y uno pulverizado es el tamaño de la partícula. De lo que se deriva que, el tiempo requerido para obtener el mismo resultado es mucho mayor con carbón granular, ya que se utiliza una columna empacada a través de la cual fluye el líquido. Este tipo de operación es sobre todo recomendable en procesos continuos con una calidad relativamente estable del agua a purificar y grandes caudales. Tiene la ventaja de que el carbón se puede regenerar y en consecuencia los consumos son menores; sin embargo la inversión requerida es alta y no siempre se justifica.

Es importante recalcar que la capacidad de un carbón granular es la misma que la de uno pulverizado, por lo tanto, la forma de determinar la facilidad de adsorber una determinada impureza es moliendo el carbón y determinando en el laboratorio las **Iso-termas de Freundlich**.

En el apartado 7 se presenta las consideraciones de ensayos de calidad realizados generalmente por los proveedores.

10.4. 4. 4. Resumen de ventajas y desventajas en el uso de carbón activado

Ventajas PAC	Desventajas PAC
Se usa cuando se requiere.	Difícil de manipular.
Relativamente económico si es usado por cortos períodos.	Caro si es requerido por largos períodos y altas dosis
Se puede variar la dosis.	Altas dosis puede ser problemática en la planta.

Ventajas GAC

Protección constante.

Alta remoción de contaminantes por superficie de área.

Desventajas GAC

No es perdurable, requiere reemplazo o regeneración.

Alto capital y costo de reemplazo.
No se justifica ante floraciones eventuales

10. 4. 5. Desinfección:

10.4. 5 .1 Postcloración: La etapa de postcloración debe ser suficiente para eliminar toxina intracelular de células que hayan superado las etapas anteriores de tratamiento y toxina disuelta.

Ensayos realizados en laboratorio con 2 µg/l de microcistina disuelta inicial demostraron efectividad del cloro en la oxidación de la microcistina a pH 7.8 y tiempo de contacto de 20 minutos, para dosis entre 3 y 5 mg/l de cloro activo, (el cloro libre residual se mantuvo en todo momento superior a 0.50 mg/l).

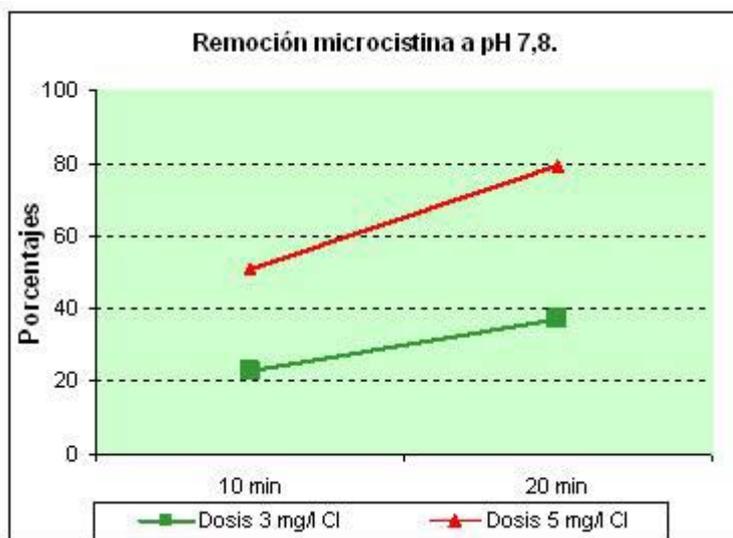


Fig. 2: Remoción de microcistina a pH 7.8

Por lo tanto es importante mantener un cloro libre superior a 0.5 mg/l con tiempo de contacto de 30 min a pH entre 6.5 y 8.0 para lo cual se debe conocer el valor del punto crítico de cloro mediante el ensayo de demanda de cloro en el agua a ser clorada, aplicar ésta dosis en planta, corroborar cloro libre luego de 30 min y ajustar dosis en caso de ser necesario.

Los tratamientos convencionales por lo general cuentan con una etapa de desinfección y una de alcalinización en la que se ajusta el pH a lo requerido por el Código Alimentario Argentino o la reglamentación vigente en cada provincia, es importante que el punto de postcloración sea previo al de alcalinización y que tenga suficiente tiempo de contacto al pH óptimo de acción del cloro, esto se debe a que las concentraciones de las diferentes formas químicas del cloro en el agua dependen del pH, la especie reactiva es el ácido hipocloroso que predomina en el rango 6.5 - 8.

Las saxitoxinas son solo parcialmente destruidas por cloración a pH 6,5-8 y requiere cloro residual de 20mg/l por 40 minutos. Altas tasas de remoción son obtenidas a pH 9.0.

10. 4. 5. 2.Postozonización: por lo general se usa una dosis de 1 mg/L, sin embargo puede ser insuficiente para mantener un ozono residual bajo condiciones de floraciones de cianobacterias debido al incremento de la carga orgánica soluble asociada con la biomasa.

El ozono también tiene sub-productos que pueden ser perjudiciales para la salud, por lo cual en la planta de tratamiento después deben seguir filtros de adsorción de carbón activado granular. Ya que no hay mucho conocimiento a cerca de los subproductos, generados tanto de microcistinas como de nodularinas, por eso es aconsejable después de la oxidación pasar a través de un filtro de carbón activado granular.

10. 4. 6. Consideraciones en el tratamiento de metabolitos generadores de olores y sabores.

Las Cianobacterias pueden producir compuestos que alteran el sabor y olor como la geosmina y 2 metilisoborneol (MIB) que impactan notablemente sobre la calidad del agua.

El tratamiento convencional de agua (coagulación / sedimentación / filtración) es un proceso eficaz para la eliminación de estos compuestos siempre que estén contenidas dentro de las células algales. Sin embargo, cuando se encuentran disueltas se requerirán otras opciones de tratamiento .

El ozono y carbón activado, en polvo o granulado, son las opciones de tratamiento que son capaces de eliminar MIB y geosmina extracelular. La medida de remoción depende de la calidad del agua, en particular, las características y concentración de materia orgánica natural (MON). Cada Planta establecerá el mejor carbón activado para la eliminación y la dosis necesaria para alcanzar una concentración satisfactoria de estos compuestos en el agua.

La acción de los agentes oxidantes como cloro, dióxido de cloro, permanganato de potasio y ozono se resumen, según Lalezary, en:

- *Cloro*: los olores causados por especies como Anabaena, ceratium, Synura, Synedra, son controlados por medio de cloración con residual de 1 a 5 mg/L de cloro libre
- *Dióxido de cloro*: efectivo para control de olores a tierra, peces u otros asociados a generos de anabaena, Synura y Vorticella, asi com actinomicetos. La remoción fue satisfactoria en el orden de 4 mgCl₂/L
- *Permanganato de potasio*: es efectivo para la remoción de sabor y olor. En el rango de pH 3.5 a 11 se produce un precipitado de MnO₂ que adsorbe gran parte de los orgánicos presentes en el agua. Se debe controlar el manganeso residual.
- *Ozono*: El ozono ha sido efectivo en la reducción de olor y sabor del agua natural, con dosis cercanas a 4 mg O₃/L y tiempo de contacto de 10 min
- La eficiencia de remoción fue verificada siguiendo el orden: MIB < Geosmina < 2,4,6-Tricloroanisol < 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP) < 2-isopropil-3-metoxi-pirazina (IPMP), excepto para el permanganato donde el orden se invierte para el IBMP con IPMP.

Dado que las cantidades en que se presentan el MIB y la geosmina están dadas en el orden de los nanogramos / litro (ng/L) la tarea de eliminar de manera eficaz estos compuestos en servicios de agua potable es un desafío; como el PAC es típicamente añadido a la entrada de las plantas de tratamiento, la competencia de la materia orgánica natural (NOM) es mayor y otros productos químicos para el tratamiento (por ejemplo, cloro, aluminio) que se presentan comúnmente, pueden ser nocivos para la adsorción (Gilligly et al. 1998b, MacLeod 2000). Oxidantes como el cloro pueden afectar negativamente la capacidad del PAC para eliminar MIB (Cummings 2000). Un estudio sobre las interacciones de cloro y carbón activado indica que el cloro oxida la superficie de carbono (McGuire 1984). Otras pruebas de trabajos sobre la capacidad del PAC para eliminar MIB en la presencia de cloro mostró un efecto arbitrario en una variedad de tiempos de contacto (Gilligly 1998). Coagulantes, específicamente sales de

aluminio, pueden disuadir la adsorción del MIB en carbón activado en polvo (MacLeod 2000, Cummings et al. 2000).

10. 5. Resumen de la efectividad de los tratamientos

TOXINAS	Cloro residual 0,5mg/L 30 min.	Permanganato de Potasio 1mg/L 30 min	PAC madera dosis 30mg/l 60 min.	GAC madera	Ozono resi- dual 0,3 mg/L 5 minutos
Microcystina	pH<8 Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Cylindrospermopsina	pH 6-9 Muy alta				
Saxitoxinas	pH 9 Alta				
Anatoxina	Alta				

OLORES Y SABORES	Cloro residual 0,5mg/L 30 min.		PAC madera > 20mg/l 60 min.	GAC madera	Ozono re- sidual 0,3 mg/L 10 minu- tos
Geosmina y 2-MIB	Inefectiva		Alta	Muy Alta	Moderada

10. 6. Evaluaciones organolépticas

10. 6. 1. Generalidades

La calidad estética de agua es a menudo utilizada por los consumidores de agua potable para evaluar la calidad global de la misma, independientemente de los demás parámetros físicos químicos y biológicos. La apariencia, sabor u olor afectará la confianza del producto.

La Geosmina y el 2-methylisoborneol (MIB) son los principales compuestos que alteran el sabor y olor en el agua; sobre todo en los períodos de verano con condiciones climáticas cálidas y poca lluvia, donde floraciones de cianobacterias pueden producir niveles elevados de geosmina que varían en función de la especie y recuentos algales.

10. 6. 2. Técnica de evaluación de olores en agua potable

El olor se reconoce como un factor de calidad que afecta la aceptabilidad del agua potable (y de los alimentos preparados con ella), que puede corromperse con la presencia de procesos metabólicos de organismos acuáticos, la acción de sustancias orgánicas e inorgánicas procedentes de vertidos de residuos domésticos, cloacales e industriales y otros factores naturales como descomposición de materiales vegetales o actividad microbiana asociada.

El dispositivo supremo para la realización de pruebas de olor es la nariz humana. Las pruebas de olor se llevan a cabo para proporcionar descripciones cualitativas y medidas cuantitativas aproximadas de la intensidad del olor.

Existen métodos estandarizados para cualificar y cuantificar sabores y olores en agua.

El método de medida de la intensidad es la *prueba de umbral de olor*. Las pruebas sensoriales son útiles para indagar la calidad de las aguas tratadas y no tratadas, y para controlar el olor a lo largo de los procesos de tratamiento. Con ello se puede valorar la eficacia de distintos tratamientos y proporcionar un medio de detectar la fuente de contaminación.

Las condiciones en que se realizan estos análisis son muy importantes.

10. 6. 2. 1. Consideraciones Ambientales

El ambiente de trabajo debe estar al abrigo de corrientes de aire que puedan afectar la percepción de las muestras, debe ser confortable y tranquilo para evitar distracciones al momento del análisis.

Separado de lugares que generen olores fuertes o interferentes, por ejemplo medios de cultivo o solventes.

La temperatura del ambiente debe ser controlada, en $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los panelistas no deben usar cosméticos o perfumes y 30 min antes de la degustación, no deben beber, comer o fumar, así como lavarse las manos con jabones neutros.

No deben participar personas que presenten cuadros alérgicos o de resfrío.

10. 6. 2. 2. Condiciones de la muestra

Las muestras deben ser recolectadas sin cámaras de aire en botellas de vidrio. Tiempo de conservación es de hasta 48 hs.

Los recipientes deben utilizarse con este único fin.

Los recipientes se deben lavar y secar en estufa a 180°C . Transportarlas a 4°C .

Se puede eliminar el cloro presente con hiposulfito de sodio en la proporción estequiométrica

Las muestras de agua cruda se deben esterilizar con lámpara UV durante 20 min, antes del análisis de sabor.

10. 6. 2. 3. Materiales y Equipos

Baño termostático $\pm 1^{\circ}$ regulado $20\text{-}60^{\circ}\text{C}$

Lámpara UV

Vasos descartables sin olor ni sabor

Erlenmeyer con boca y tapa esmerilada de 500 ml

Soluciones de referencia para el sabor: cloruro de sodio, (salado), azúcar en polvo (dulce), Ácido Cítrico (ácido), Cafeína (amargo)

Soluciones de referencia para el olor: Geosmina, 2-Metil isoborneol, 2,4,6- Tricloroanisol, cloro, clorofenol, cyclocitral, entre otros.

10. 6. 2. 4. Determinación del umbral de olor y sabor

Se realizan diluciones con agua libre de olor y sabor: agua destilada filtrada por carbón activado o agua mineral con características fisicoquímicas próximas a la muestra.

Se anota la temperatura a la que se realiza la prueba, en general 25°C para el sabor y 25 - 45°C para el olor. Puede ser hasta 65°C según el propósito.

De acuerdo a la intensidad estimada se realizan diluciones de la muestra a un volumen final de 200 ml. Se intercalan blancos en la serie y la dilución que se presume corresponde al umbral se ubica en la mitad.

El valor Umbral de olor o sabor es la mayor dilución a la que se percibe olor o sabor

$$\text{Calculo del TON: } \frac{\text{volumen de la muestra} + \text{volumen agua referencia}}{\text{Volumen de muestra}}$$

Cuando varios panelistas participan de la determinación, el TON se calcula con la media geométrica de los umbrales individuales.

Como parte del test, se hace la descripción del tipo de olor y sabor que perciben lo que es conveniente realizar comparando con soluciones estándar de sabor y olor.

El método Umbral no es un valor absoluto y preciso ya que varía con la capacidad sensitiva de los panelistas, la cual puede cambiar.

Este método no tiene un procedimiento de entrenamiento estandarizado, pero debe evaluarse la capacidad sensorial de los panelistas para ciertas sustancias. El número de panelistas depende de la precisión estadística que se quiere alcanzar. Debe tenerse como precaución, que la muestra al ser diluida puede cambiar su naturaleza por lo cual el olor o sabor detectado puede ser el resultado de interacciones químicas entre los compuestos presentes y no ser el que ha sido objetado por los consumidores.

El perfil de olor se realiza a 25 °C y 45°C y el perfil de sabor a 25°C. Los panelistas caracterizan cualitativamente la muestra según la rueda de olor y sabor.

La cuantificación de la Intensidad se hace con la escala del 0 al 12, considerando los números pares. Se informa 0 cuando no se diferencia olor o sabor y uno cuando apenas puede diferenciarse un olor pero no cuantificarlo.

Cada panelista da una descripción independiente de la muestra, el líder reúne todos los resultados e informa la naturaleza de la muestra en que el 50% de los panelistas coincide.

La intensidad resulta de un promedio de las intensidades de esas coincidencias.

Se puede corregir la descripción original para llegar a una mejor definición de un olor o sabor particular

10. 6. 3. Entrenamiento de panelistas

Puede contar con dos etapas, en la primera emplear soluciones estándares en concentraciones superiores al umbral para el reconocimiento y memorización evaluando la capacidad sensitiva. Posteriormente se refuerza el entrenamiento empleando

concentraciones mas bajas, muestras ciegas para comprobar la memoria sensorial y soluciones mezclas para ver la habilidad en la diferenciación de compuestos.

Estos entrenamientos se ejercitan de manera continua para mejorar la sensibilidad y evaluar posibles pérdidas de capacidad sensorial.

10. 6. 4. Procedimiento de Análisis de olor

300 ml de muestra en erlenmeyer de 500 ml con tapa.

Ajustar temperatura de baño termostático a temperatura indicada 20 min antes del análisis (45° C y a 25°C)

Realizar el análisis de olor antes del de sabor

Tomar el erlenmeyer con una mano, sostener la base y con la otra abrir el tapón sin tocar el cuello.

Agitar con movimientos circulares para desprender los compuestos volátiles.

Acercar a la nariz, quitar el tapón y oler en el momento de destapararlo.

Registrar las impresiones de acuerdo a su naturaleza, en el orden que se asigna y asignarle una intensidad.

Oler agua de referencia una o dos veces entre muestras.

No discutir ni interactuar mientras se realiza el análisis.

10. 6. 5. Procedimiento de Análisis de sabor

Agitar para desprender compuestos volátiles

Colocar 5 ml de muestra aproximadamente en un vaso.

Tomar una porción del contenido del vaso, enjuagando todo el paladar.

Expresar el resultado.

Olor
Tierra – húmedo – moho – medicinal – hierba –frutal
Sabor
Acido- dulce – amargo – salado

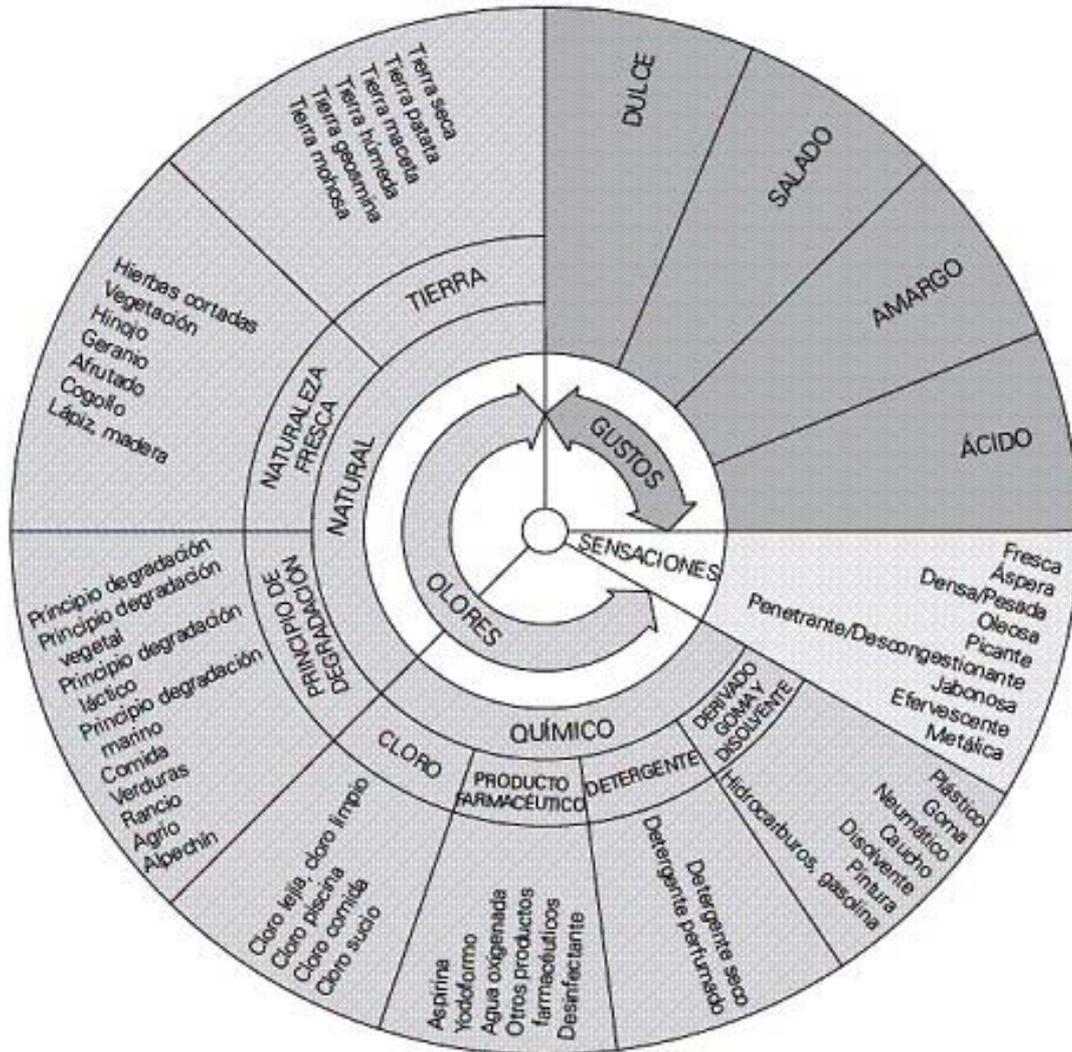


Fig. 3: Rueda de olores y sabores

10. 7. Ensayos de calidad del PAC:

Las normas de referencia son las siguientes:

ASTM D4607-94(2006) Standard Test Method for Determination of Iodine Number of Activated Carbon

ASTM D1193-06 Standard Specification for Reagent Water

ASTM D2652-05a Standard Terminology Relating to Activated Carbon

ASTM D2867-04 Standard Test Methods for Moisture in Activated Carbon

ASTM D3860-98 (2003) Standard Practice for Determination of Adsorptive Capacity of Activated Carbon by Aqueous Phase Isotherm Technique

Pueden ser adquiridas en el Instituto Argentino de Normalización y Certificación - Centro de Documentación TEL.: (+54) (11) 4346 0719 E-mail: documentacion@iram.org.ar / eacuña@iram.org.ar . Perú 552/556 - Buenos Aires - Argentina

10. 7. 1. Influencia de la matriz orgánica

La influencia de la materia orgánica natural (MON) en las aguas superficiales asociada a los florecimientos algales presenta complicaciones en su tratamiento a la vez que proporciona información básica cuyas alteraciones debido a la presencia de metabolitos proporciona un medio de control y seguimiento a través de la medición del carbono orgánico presente.

El material orgánico puede ser responsable de aguas con sabor y olor desagradable y cambios en el color. Los compuestos orgánicos también pueden conducir a la formación de subproductos de desinfección después de que reaccionan con desinfectantes durante el tratamiento de las aguas. MON puede estar relacionada con la proliferación de organismos dentro de los sistemas de distribución. Por lo tanto, el control de la materia orgánica ha sido reconocido como una parte importante del control en las plantas de agua potable y su sistema de distribución.

La fuente de materia orgánica se debe a la excreción y descomposición de organismos incluyen generalmente bacterias, algas y organismos acuáticos. Del medio externo la materia orgánica entra en el flujo de agua a partir de la degradación de la vegetación terrestre y por lixiviación.

La MON generalmente incluye sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos), y no húmicos, materiales hidrofílicos incluidos los ácidos, aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono, ácidos carboxílicos y otros.

La Caracterización química de la materia orgánica es dificultosa debido a la gran complejidad de la matriz orgánica y por encontrarse a muy baja concentración.

La MON comúnmente existe en las aguas crudas con concentraciones en las partes por millón (mg/L), con magnitudes superiores a compuestos como el MIB, expresados en partes por billón (ng/L). Por tanto, la NOM es nociva para la eliminación MIB, ya que también se adsorbe con el PAC, y puede competir por los sitios de sus poros (Newcombe et al.: 1997, 2002a, 2002c). Es difícil predecir exactamente el efecto que tendrá la MON sobre el desempeño del MIB porque constituye una amplia gama de moléculas con una variedad de diámetros y sustancias químicas. Por lo tanto, no se trata sólo de la cantidad de materia orgánica en el agua lo que determinan la capacidad de la PAC, sino el tamaño y la estructura química de las moléculas.

10. 7. 2. Ensayos de adsorción

10. 7. 2. 1. Generalidades

En el laboratorio es posible evaluar la capacidad del Carbón Activado para remover sustancias de una solución por el mecanismo de adsorción, mediante la construcción de "isotermas de adsorción". Conocer la isoterma de adsorción de un parámetro que mide la concentración de una sustancia o conjunto de sustancias que se quiere remover, permite comparar diferentes tipos de carbón activado, determinar la capaci-

dad de remoción de un carbón activado y/o determinar la dosis de carbón que hay que utilizar para alcanzar un propósito dado.

Si bien las isotermas representan las mínimas dosis necesarias para cada tipo de carbón, las condiciones en que se realizan son en el equilibrio; por tanto deben realizarse ensayos considerando las condiciones de cada planta y aproximarse de manera más certera a lo que ocurre en la misma.

Por eso se tendrá en cuenta:

Tipo de carbón empleado. Dependerá no solo de los resultados de las isotermas para el analito en cuestión y/o para la evolución del carbono orgánico disuelto (representa una medida de la materia orgánica presente en el agua natural que se cuenta) sino también de las condiciones operativas: pH de dosificación, agregado de coagulantes y coadyudantes, inyección de cloro, etc. Se deben registrar sus especificaciones técnicas (granulometría, índice del analito a evaluar, humedad, índice de yodo, etc).

Considerar el stock que cada planta posee

El punto de dosificación

Los parámetros fisicoquímicos y de recuento y remoción algal.

La concentración de analitos (Geosmina, MIB, etc.) no solo en los ensayos sino en cada etapa del proceso. Estas determinaciones son muy específicas por el tipo de instrumental que se necesita (GC-MS) por tanto debe preverse un plan de desarrollo analítico en el laboratorio.

10. 7. 2. 2. Materiales

- Diferentes tipos de carbón activo secados a 110°C durante 24 hs
- Micropoluentes orgánicos: Geosmina (puede utilizarse toxinas u otros poluentes)
- Agua Natural (o agua a ser tratada con el PAC)

10. 7. 2. 3. Desarrollo: Prueba reactor discontinuo

Para la obtención de las isotermas de adsorción y los parámetros de equilibrio según el carbón activo en polvo (PAC) para un compuesto dado en agua pura y agua natural.

- Armar 7 reactores de vidrio con capacidad de 1 litro, éstos contarán con un dispositivo de agitación magnético y un sistema regulador de temperatura constante; se realiza a reactor cerrado para evitar pérdidas de evaporación de la fase líquida.

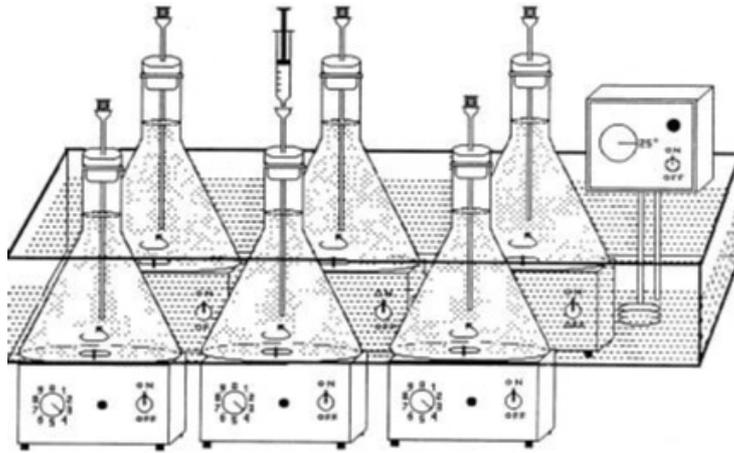


Fig. 4: Reactores para ensayos con carbón

- Tomar 500 ml de agua a tratar colocar en los 7 reactores
- Ajustar el pH: se seleccionará 6 - 7 - 8 (dependiendo de las condiciones del proceso)
- Ajustar en los seis reactores la concentración de geosmina inicial, luego colocar dosis crecientes de PAC (ver tabla) a partir de la solución madre de 1gr/L, dejando el ultimo reactor como testigo con una concentración inicial C_0 . Cubrirlos posteriormente con papel aluminio. La concentración del analito evolucionará constantemente hasta alcanzar el equilibrio.
- Poner a la mezcla agua – carbón en agitación durante 24 hs (o más) para asegurar obtener el equilibrio de fases. En dinámica el carbón activo en el reactor se satura progresivamente hasta alcanzar su máxima adsorción, por lo que su concentración no varía con el tiempo.
- Separar las fases por filtración con papel Wathman GF/A o milipore de 0.45 μ m
- Almacenar en recipientes de vidrio ámbar la fase líquida hasta determinación de los valores residuales.

10. 7. 2. 4. Interpretación de Resultados

Se presentan diferentes maneras de interpretar los ensayos, la primera es graficando el % de remoción remanente del Analito (C_{geo}): Concentración de geosmina vs la dosis de Carbón empleado para diferentes carbonos y diferentes condiciones de proceso (pH, temperatura, etc.) obteniéndose curvas como:

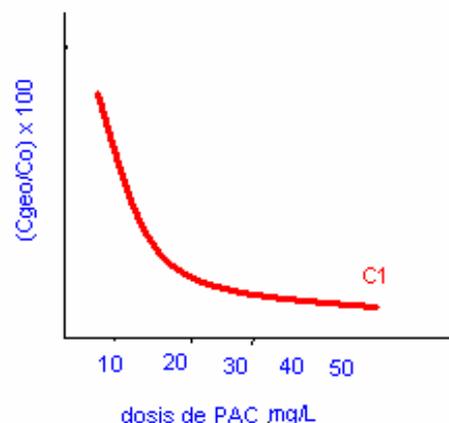


Fig. 5: Porcentaje de Remoción de analito vs Dosis de carbón

Si no se cuenta con los valores de concentración de geosmina, se puede representar los valores de carbono orgánico disuelto COD (mg/L) en función de dosis de Carbón Activo (mg/L).

A veces estas curvas no son fáciles de interpretar, se aplanan debido a altas concentraciones de analitos a remover o la variabilidad entre las dosis no es muy significativa. Por ello se emplean las isotermas de adsorción con base en los modelos lineales de Freundlich: $X/M=K \cdot C^{1/n}$ aplicando logaritmo: $\ln (X/M)= 1/n \ln C$.

Donde:

X : cantidad de analito adsorbido en el equilibrio

M : cantidad de carbón empleado

n y K : constantes específicas que dependen de las condiciones del test y del tipo de carbón usado.

C : concentración del analito remanente en la fase líquida

Se representa: Para Freundlich:

$\ln X/M$ (mg COD/gCA) vs $\ln C$ (mg COD/L)

o bien $\ln (C_{geo}/grCA)$ vs $\ln (C_{geo}/L)$ representando una gráfica

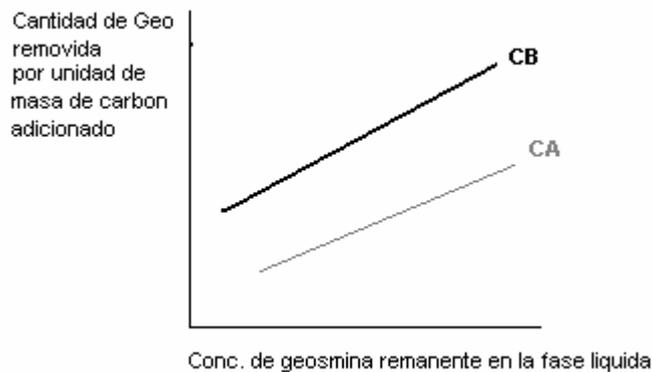


Fig. 6: Cantidad de Geosmina removida vs Concentraci{on de Geosmina remanente.

El carbón B es mejor que el carbón A debido a que la cantidad de analito adsorbido por unidad de masa de carbón empleada para el caso B es más alto para una concentración final remanente del mismo en la fase líquida.

10. 7. 2. 5. Tasa de Carbón empleado

Si la concentración inicial de Geosmina es de 100 ng/L y si el objetivo es alcanzar una remoción de hasta 10 ng/L, de la grafica se obtiene X/M para cada tipo de carbón (ej para el B 45 ng/gr), la cantidad de analito removido sería (100-10) ng/L, la tasa de carbón empleado sería de: $(100 - 10)/45 = N$ gr carbón/L

10. 7. 2. 6. Evaluación del Costo del tratamiento con PAC asociado a la dosis empleada.

Se podrá expresar de acuerdo a la siguiente índice:

Valor del Índice = $(C/Co) \times (\text{costo unitario del PAC})$

Donde (C/Co) es la fracción remanente

C: concentración del metabolito luego de estar en contacto con el carbón activado

Co: concentración inicial (o la dosificada inicialmente al blanco) del analito

La marca de PAC con el índice más bajo es el valor más rentable. Alto dosis de PAC puede aumentar los costos asociados a la frecuencia, los traslados, los lodos de producción, manipulación y gastos de mantenimiento de los equipos, etc

10. 7. 3. Cinética de Adsorción

La adsorción de una molécula específica depende de la capacidad de adsorción en el equilibrio del carbón activo, la cinética de adsorción; es decir, de la velocidad con la cual una molécula específica pasa de la fase líquida a la fase sólida, implica varias etapas y diversos mecanismos de difusión externa (a través de la película líquida) e interna (poroso o superficial). Esto se puede realizar aplicando el modelo de *HSDM: Transferencia Externa Acoplada a la Difusión Superficial*, el cual permite predecir la cinética de adsorción para una concentración inicial diferente de la molécula específica. (Ortiz, UNAM).

En la práctica estas predicciones pueden variar por los parámetros de proceso, el punto de aplicación, la matriz orgánica y los indicadores de calidad.

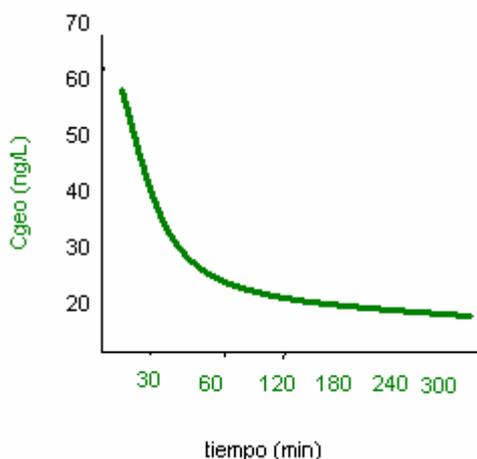


Fig. 7. Concentración de Geosmina en función del tiempo

Se pueden realizar diferentes ensayos cinéticos conociendo los tiempos de permanencia del flujo del analito en contacto con el carbón activo desde la dosificación hasta la siguiente etapa del proceso.

10. 7. 3. 1. Ensayo 1: Prueba Cinética para una dada concentración de analito y un tiempo de contacto de 30 min para diferentes carbones para una dosis fija.

En este caso se podrá variar el tiempo, dependiendo del proceso en cada planta potabilizadora.

10. 7. 3. 1. 1. Preparación de la solución de carbón

Transferir en un vaso seco e identificado, una alícuota de muestra de 15 ± 5 gr. Mantener en desecador.

Tarar la balanza analítica con un erlenmeyer de boca esmerilada seco e identificado.

Pesar una masa de carbón necesaria para preparar una suspensión de 5 g/L (5 gr para balón de 1000 ml o 2,5 para 500 ml).

Adicionar al erlenmeyer de boca esmerilada 150 ml de agua desmineralizada.

Aplicar vacío durante 15 min para expulsar el aire y saturar los poros del carbón con agua.

Transferir la suspensión con ayuda de un embudo a un matraz identificado y completar volumen.

10. 7. 3. 1. 2. Preparación del Blanco

Colocar agua desmineralizada en recipiente de 20L.

Nota: un volumen necesario de agua debe ser colocado teniéndose en cuenta un volumen de ± 200 ml para un blanco de 1000 ml de muestra.

Mezclar o agitar mecánicamente y con una micro jeringa adicionar un volumen de patrón de MIB/GEO necesario para que la concentración en el recipiente de vidrio sea de 100 ng MIB-GEO/litro

Calculo:

$$V \text{ del patrón } (\mu\text{l}) = \frac{100 \text{ ng/L} \times V \text{ de agua desm. en el recipiente}}{\text{Concentración del patrón (mg/L)}}$$

Dejar la solución en agitación por 10 min.

Tomar una muestra e identificarla (por duplicado), sin dejar cámara de aire.

Realizar el análisis de los analitos, si el resultado no se aleja de un desvío de un 20% de la concentración teórica, proseguir el ensayo, de lo contrario rehacer la solución.

Transferir en una probeta 1000 ml de la solución del blanco y para los recipientes de jar test.

Mantener los recipientes en agitación a una velocidad de 80 rpm aproximadamente.

Homogeneizar la suspensión de carbón. Transferir inmediatamente una volumen de 150 ml, manteniendo en agitación magnética.

Retirar la agitación, y del recipiente que se extrajo los 150 ml se toma una alícuota 4 ml (20 mg/L de carbón activo para 1000 ml de agua) adicionando a los recipientes., disparando el cronómetro.

Después de 30 min de tiempo de contacto retirar una alícuota de 150 ml en un erlenmeyer.

Filtrar la muestra bajo vacío con membrana de porosidad de 0.45 um.

Transferir el filtrado en un recipiente, sin dejar cámara de aire.

Colectar de la misma forma el blanco.

10. 7. 3. 2. Ensayo 2:

Con la solución de carbón preparada se puede realizar la extracción de muestras y las determinaciones de remoción a diferentes tiempos. Manteniendo constante la concentración inicial del analito y la dosis empleada.

10. 7. 4. Ensayo para carbón granular

Para obtener los parámetros de diseño de una columna (diámetro, altura de carbón, flujo.etc.) es necesario efectuar pruebas piloto. Una forma sencilla de realizar estas pruebas es usando varias columnas en serie de 3 ½ "ó 4" de diámetro.

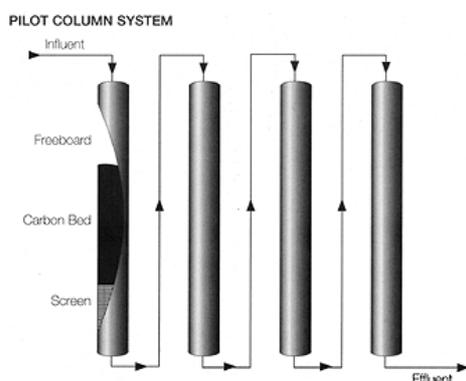


Fig . 8: Sistemas de Columnas para ensayos de CAG -fuente: NORIT AMERICA INC.

Los procedimientos se realizaran evaluando: granulometría, longitud de la columna, control de caudales y carga de alimentación.

Se realizan pruebas en reactor discontinuo para obtener el mejor tipo de carbón activado para remover el MIB de agua natural (isotermas de adsorción) y en reactor continuo para determinar los parámetros de diseño de una columna prototipo de adsorción (altura del lecho y columna, la relación altura de carbón y diámetro de las columnas, tipo de flujo, carga hidráulica, tiempo de contacto, diámetro de partícula, etc.) y estimación económica de los costos del prototipo.

Las pruebas en reactor continuo se pueden realizar en mini-columnas empacadas con el mejor carbón activado obtenido en las pruebas de reactor discontinuo.

El sistema de adsorción en continuo se constituye de un tanque de alimentación de 50 L, una bomba peristáltica y mini-columnas de adsorción. Las columnas se empacan con carbón activado, con tres diferentes alturas de lecho, para simular tres dife-

rentes tiempo de contacto de lecho vacío (EBCT Empty bed contact time) a un flujo dado, se determina la expansión del lecho. Las columnas se alimentan continuamente de manera ascendente, hasta la finalización del experimento, para evitar los fenómenos de difusión causados por el paro de operación. Los experimentos se suspenden en la saturación del lecho.

Procedimientos

Ensayo de Coagulación:

El ensayo de coagulación consiste en agregar dosis crecientes de coagulante a una serie por porciones de agua, contenidas en vasos de un litro, determinando después de un período de agitación adecuado, las características del coágulo formado como así también el pH, la alcalinidad y la turbiedad de las muestras tratadas, que permiten establecer la dosis óptima de coagulante que debe agregarse al agua para su tratamiento.

El tiempo y la velocidad de agitación del ensayo de coagulación dependen de las características constructivas de cada planta, por lo tanto en cada una de ellas deberán hacerse una serie de ensayos para encontrar cuales son los valores con los que se deben manejar para encontrar la dosis óptima.

Solución de coagulante para el ensayo:

Se trabaja con solución al 1 % la que debe ser preparada diariamente, ésta se obtiene a partir del 10% (tomar 10 ml de la solución al 10% y diluir con agua de canilla a 100 ml). Si se parte de la solución de trabajo de la planta deberá hacerse la solución correspondiente según sea la concentración de aquella. Por ejemplo: si la solución de la planta es al 20 % tomar 5 ml de la misma y llevar a 100 ml, si es al 10% tomar 10 ml y llevar a 100 ml, si es al 5% tomar 20 ml y llevar a 100 ml. *Un ml de esta solución representa 10 mg/l de coagulante.*

Equipos y elementos necesarios:

Agitador de paletas múltiples movido por un motor sincrónicamente, con velocidad regulable e iluminado.(Jarr-test)

Seis vasos de precipitado de 1 litro.

Bureta, erlenmeyer, pipetas, turbidímetro, medidores de pH.

Soluciones de sulfato de aluminio y polielectrolito catiónico al 1%

Procedimiento:

Tomar agua a tratar en un recipiente adecuado, enjuagar con una porción de la misma todos los vasos, y mediante una probeta de 1 litro cargar cada uno de los 5 vasos, el sexto vaso se reserva para el control de entrada de decantadores.

Colocar los vasos en el equipo jarr-test, bajar las paletas y poner en marcha el agitador a baja velocidad, proceder al agregado de solución de coagulantes en dosis creciente, introduciendo la pipeta a 5 cm por debajo de la superficie del líquido y en las proximidades del eje. Aumentar la velocidad a 100 rpm aproximadamente durante un minuto, bajar luego a 70 rpm y cuando se visualice el floc bajar la paleta correspondiente al vaso que contiene el agua de entrada de decantadores, continuar con la agitación de 10 a 15 minutos, según las características de la planta, proceder luego a le-

vantar las paletas manteniendo la rotación y esperar a que sedimente, 10 a 15 minutos.

Observar el aspecto del agua sedimentada en cada vaso, determinar turbiedad a cada uno de ellos retirando el sobrenadante con cuidado de no remover floc, el vaso que presenta menor turbiedad se considera la dosis óptima, a éste y a los vasos correspondientes a la dosis inmediata anterior y posterior extraer el sobrenadante haciendo sifón con una manguerita para efectuar el recuento de células algales y evaluar el porcentaje de remoción en esta etapa del tratamiento, no siempre coincide la dosis óptima de coagulante para remoción de turbiedad con la óptima para remoción de células, en éste caso aplicar en planta ésta última.

Al vaso de dosis óptima se hará pH, alcalinidad, color y se compara con la entrada de decantadores; en el caso que los parámetros determinados en el ensayo de dosis óptima no coincidan con los parámetros de calidad de agua de entrada a decantadores se harán las correcciones que sean necesarias, o sea, se procederá a subir o bajar la dosis en planta según lo indique el ensayo de coagulación.

Es importante realizar el ensayo de coagulación todos los días porque la dosis depende de las características físico-químicas del agua.

Una vez obtenida la dosis óptima del coagulante, repetir el ensayo pero manteniendo en cada vaso la misma dosis, y agregar en forma creciente el polielectrolito catiónico, a partir de la solución usada en planta (1kg en 100 l de agua), diluir 10 ml en 100 ml y agregar el volumen a ensayar, por ejemplo 1ml para dosis 1g/m³, 0.8 ml para dosis 0.8 g/m³, 0.2 ml para dosis 0.20 g/m³). Efectuar las mismas determinaciones que en el caso anterior.

Ejemplo de ensayo con dosis variable de sulfato de aluminio

Vasos N°	1	2	3	4	5	6
Vol.sol. SO ₄ Al ₃ 1 %	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	
SO ₄ Al ₃ en mg/ l	12	16	20	24	28	Dosis de planta
Agitación rápida (100 rpm)	1 min					
Agitación lenta (70 rpm)	14 min					

Ejemplo de ensayo con dosis óptima de sulfato de aluminio y dosis variable de polielectrolito-suponiendo dosis óptima 16

Vasos N°	1	2	3	4	5	6
Vol.sol. Sulf. De Al 1 %	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	
Dosis de SO ₄ Al ₃ en mg/ l	16	16	16	16	16	Dosis de planta
Vol sol de Poli.(ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	
Dosis de poli (mg/l)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	

Agitación rápida (100 rpm)	1 min					
Agitación lenta (70 rpm)	14 min					

En este ejemplo se han tomado tiempo y velocidades de dispersión, de agitación y de sedimentación en forma arbitraria, debe existir concordancia entre estos parámetros del ensayo con los de la planta.

Por lo tanto la velocidad de agitación, tiempo de agitación y el tiempo de sedimentación deben adecuarse en el ensayo para que a igual dosis de coagulante, en planta y en ensayo, se obtengan aguas decantadas de la misma turbiedad, alcalinidad y pH.

Es conveniente por razones prácticas que el tiempo de floculación, agitación y decantación no lleven más de 25 minutos.

Los valores de turbiedad y color de estas muestras no deben ser superiores a 5 y a 10 respectivamente para asegurar un buen tratamiento, un valor aceptable de remoción de células es mayor al 95%.

Se debe controlar también el tiempo de formación del floc y la velocidad de decantación, son parámetros muy importantes para determinar el porcentaje de remoción.

La dosis óptima depende de los siguientes factores:

- Turbiedad y color del agua natural.
- Alcalinidad del agua natural
- Eficiencia de la mezcla de coagulante con el agua en la etapa de dispersión
- En caso de que el agua cruda sea prealcalinizada, preacidificada o con carbón activado en polvo, los ensayos descritos deben ser realizados con el agua natural con el agregado de éstos productos químicos, manteniendo la misma relación que en planta.

Ensayo de demanda de cloro:

Procedimiento:

Realizar un ensayo en vasos de 1 litro con el agua a ser clorada, agregando volúmenes de agua de cloro de concentración conocida para obtener dosis crecientes de 1; 2; 3; 4 y 5 mg/l de cloro activo.

Medir el cloro libre a los 20 minutos y a los 30 minutos. El vaso que presente una concentración superior a los 0,50 mg/l de cloro libre después de los treinta minutos de contacto, es el que corresponde a la dosis de cloro a agregar en planta.

Preparación y dosificación de polielectrolito catiónico:

Datos:

Caudal (Q m³/h): dato de Macromedidor o canaleta Parshall

Dosis (d): Cantidad de polielectrolito a agregar de acuerdo al ensayo de jarras. Depende de las características del agua natural y de la dosis de sulfato de aluminio.-

Concentración de Polielectrolito (C): 10g/l o 1%. Se disuelve 1 kg de polielectrolito en 100 l de agua, para realizar los ensayos se diluye 10 ml de la solución de planta se diluye a 100 ml y se agrega el volumen a ensayar, por ejemplo 1ml para dosis 1g/m³, 0.8 ml para dosis 0.8 g/m³).

El caudal a inyectar se calcula con la siguiente fórmula:

$$q \text{ (ml / min)} = \frac{Q \text{ (m}^3\text{/h)} \times d \text{ (g/m}^3\text{)} \times 1000 \text{ ml/l}}{10\text{(g/l)} \times 60\text{min/h}}$$

Preparación y dosificación de PAC:

Procedimiento:

Se prepara una suspensión que puede ser entre 1 y 10%, por lo tanto para 1000 litros de agua se coloca entre 10 kg y 100 kg de carbón activado en polvo (por lo general el PAC se comercializa en bolsas de 20 o 25 kg).

En un tanque de 1000 litros colocar aproximadamente 50 cm de agua, sobre él volcar los kg de carbón activado de acuerdo a la solución que se desea preparar, de esta forma se minimiza que se levante mucho polvo de PAC. Encender el agitador, luego continuar con el agregado de agua hasta completar los 1000 litros. A continuación se continúa la agitación por un tiempo no menor a una (1) hora, tiempo necesario para humectar el carbón activado, una vez humectado sedimenta, si no permanece en la superficie.

Se debe contar con más de un tanque de preparación para asegurar dosificación continua, debido a que la humectación lleva tiempo, existen en el mercado productos que se comercializan con un determinado porcentaje de agua, tienen la ventaja de levantar menos polvo en la preparación, pero la desventaja de mayor peso para el traslado.

Usar elementos de protección personal para manejo de productos químicos.

Una vez lista la suspensión para la dosificación, no debe cortarse la agitación, de lo contrario el carbón activado sedimenta.

Aplicar esta suspensión con bomba dosificadora, o bien por gravedad, ajustando el caudal de acuerdo al cálculo que figura abajo.

Cálculo de dosificación:

Datos:

Caudal (Q): es el caudal de agua a tratar en m³/h se obtiene de medición con Macromedidor o canaleta Parshall.

Dosis (d): es la cantidad de carbón activado/m³ de agua necesario para remover olor/sabor/toxinas/algas. Depende de las características del agua natural, se obtiene mediante ensayos, por lo general se usan dosis que van desde 4g/m³ hasta 80g/m³.

Concentración de Carbón (C): es la concentración del PAC en g/l que depende de la forma de preparación de la suspensión, para suspensiones al 10%(100kg/1000l) C= 100 g/l.

Fórmula:

El caudal a inyectar se calcula con la siguiente fórmula:

$$q(\text{ml} / \text{min}) = \frac{Q (\text{m}^3/\text{h}) \times d (\text{g}/\text{m}^3) \times 1000 \text{ ml/l}}{C (\text{g}/\text{l}) \times 60 \text{ min}/\text{h}}$$

Ejemplo: para un caudal de 400 m³/h, una dosis 10 g/m³, y una suspensión de PAC al 10% el caudal a inyectar es:

$$q(\text{l}/\text{h}) = \frac{400 \times 10 \times 1000}{100 \times 60} = 667 \text{ ml}/\text{min}$$

Lo que significa que para una caudal a tratar de 400 m³/h, con una suspensión de carbón al 10% se deberá dosificar 667 ml/min para alcanzar una dosis de 10 g/m³, para lo cual se debe disponer de dosificador acorde al caudal a inyectar.

El control de dosificación se realiza con probeta, controlando que en un minuto dosifique los 667 ml requeridos.

Bibliografía

- OTAÑO S. y ROMÁN N. 2008. Floración de cianobacterias sobre la costa del río Uruguay verano de 2008. V Taller Embalses Itaipú
- IZAGUIRRE C. y ROMÁN N. 2004. Remoción de microcystina por acción del cloro "XIV Congreso Argentino de saneamiento y Medio Ambiente", AIDIS Bs.As.
- DUGET J.P. y SAGEP G. 2000. Do algal toxins cause any problema alter the water treatment disinfection – EAU DE PARIS- AIDIS/IWA Internatinal Seminar on "Identification and control of algae turing drinking water production"-Rosario- Santa Fe.
- ORR P. T. and SCHNEIDER P. M. 2006. Toxic Cyanobacteria Risk Assessment Reservoir Vulnerability and Water Use Best Practice. South-East Queensland Water Corporation 61 p.
- MINISTERIO DA SAUDE. Fundação Nacional de Saúde. 2003. Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano. Ed. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, Brasília, 56 p. (está disponible en: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/mnl_ciano_bacterias.pdf)
- CEPIS División Salud y Ambiente OPS Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la OMS. Lima 2002. Operación y mantenimiento de plantas de tratamiento de água- Manual de capacitación para operadores- 407-521 p.
- TENNANT M. 2004. Activation and use of powdered activated carbon for removing 2-methylisoborneol in water utilities, University of Florida.
- LINDE J. and JONES M. The evaluation of powdered activated carbon for taste and odour removal, , rand water scientific services, proces development
- COOK D., NEWCOMBE G. and SZTAJNBOK P. 2001. The application of powdered activated carbon for MIB and geosmin removal: Predicting PAC doses in four raw waters. *Water Research*, 35(5):1325-1333.
- COOK D. 1998. Optimising pac dosing to remove mib and geosmin in four adelaide mropolitan water treatment plants. Australian Water Quality Centre
- NEWCOMBE G. and COOK D. 2002. Influences on the removal of tastes and odours by PAC. *Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua*, 51(8):463-474.
- BAUDIN I., CAGNARD O., GRANDGUILLAUME J., DO-QUANG Z. Algae and associated toxins & metabolites: Methodology for risk assessment and risk management, Suez environnement – cirsee, 38 rue du président wilson, 78230 le pecq, france
- FERREIRA FILHO S. and MARCHETTO M. 2005. Multi-objective optimization of water treatment plants: turbidity, total organic carbon and taste & odor removal. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- FERREIRA FILHO S. and MARCHETTO M. 2005. Coagulation process and its interference on the taste and odor removal in drinking water treatment by powdered activated carbon application. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- VOLK C., WOOD L., JOHNSON B. and ROBINSON J. Diciembre 2001 – Enero 2002. Monitoring dissolved organic carbon in surface and drinking waters.
- DI BERNARDO L. 1995. Algas e suas influencias na qualidade das Aguas e nas Tecnologias de Tratamento.
- TUNG S. and FUSH LIN S. 2006. Identification and oxidation of 2-MIB and Geosmin in source water. Departamento Nacional de Ingenieria Ambiental, Universidad de Cheng Kung.
- SOMMERFELD M. 2002. Reducing Taste and Odor and Other Algae-Related Problems for Surface Water Supplies in Arid Environments Arizona State University.

Glosario

Acineta o acineto: célula vegetativa con acumulación de materias de reserva que puede funcionar como elemento de propagación.

Aerotopos: grupos de vesículas gaseosas que ayudan en la flotación.

Anisogamia (=heterogamia): unión sexual de dos gametas móviles de diferente tamaño.

Axial: perteneciente o relativo al eje.

Bentónico: relativo al bentos.

Bentos: conjunto de organismos que viven en contacto con el fondo marino.

Caroteno: pigmento carotenoide amarillo o rojo, que absorbe energía luminosa y la trasmite a la clorofila para la fotosíntesis.

Célula apical: célula terminal de un tricoma. Extremo superior del alga.

Cenocito: estructura con numerosos núcleos y organelas, no tabicada, propia de algas sifonales.

Cepas: población de microorganismos de un mismo linaje.

Corteza: parte externa del talo.

Cromatoforo: organela que lleva los pigmentos fotosintéticos (cloroplasto, feoplasto, rodoplasto).

Cromatografía: técnica de separación de sustancias, basada en la separación de una muestra en una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas y una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

Dicótoma: división en dos mitades equivalentes.

Diploide: con doble número de cromosomas que las gametas, con dos juegos de cromosomas.

Diplonte: individuo con complemento cromosómico diploide.

Distal: que se encuentra ubicado en el extremo más alejado de la base del talo.

Dorsal: ubicado sobre el dorso de un talo.

Endofito: planta que vive en el interior de otro organismo.

Epifito: planta que vive sobre otro organismo.

Espermatozoide: células reproductivas masculinas flageladas en oogamia.

Espora: célula reproductiva más o menos modificada con respecto a las vegetativas, producida dentro de esporangios y que sirve a la reproducción.

Esporangio: estructura dentro de la cual se producen esporas.

Feoplasto: cromatoforo de algas pardas.

Ficología: estudio de las algas.

Filamento: conjunto de células alineadas en una hilera.

Filiforme: en forma de filamento.

Flagelo: estructura fibrilar inserta en las porciones anteriores o laterales de zooides.

Fotófilas: algas que viven en ambientes con altos niveles lumínicos.

Fotófobas: algas que viven en la sombra.

Fusiforme: en forma de huso.

Gameta: célula sexual.

Gametofito: planta que forma gametangios.

Haplonte: individuo con complemento cromosómico haploide.

Helicoidal: en forma de hélice.

Heterocisto: célula vegetativa de las Cyanophyta con contenido refringente diferente del resto de las células donde ocurre la fijación de nitrógeno atmosférico.

Hialino: estructura transparente o translucido .

Hormogonio: pequeño segmento de células vegetativas originados por la ruptura del tricoma.

Intercalar: estructura que se encuentra entre la base y el ápice.

Intermareal: zona costera entre la bajamar y la pleamar comunes.

Isodiamétrica: el diámetro de las células es mas o menos constante a lo largo de su filamento.

Muestra Simple: muestra discreta extraída de la masa acuosa en forma aleatoria.

Metalimnion: Es una capa intermedia entre el epilimnion y el hipolimnion. En esta capa es en donde se producen cambios relativamente más rápidos de los parámetros (temperatura, densidad). El plano del cambio máximo de la temperatura con la profundidad se le llama termoclina. En la mayoría de los lagos se establece durante el verano, debido al calentamiento gradual de las capas superiores del agua del lago. Como presenta una estructura de densidad relativamente estable, constituye una barrera eficiente contra la mezcla vertical.

Parásito: organismo que toma toda o parte de las sustancias que requiere para subsistir de un huésped en el que se desarrolla.

Parietal: ubicado sobre la pared.

Perifiton: comunidad microscópica de plantas, animales y detritos asociados, adheridos.

Pirenoide: organela asociada a los cloroplastos, su función parece asociada a la síntesis de las sustancias de reserva, mostrando usualmente en algas verdes varias placas de almidón asociadas.

Plancton: organismos que viven en suspensión flotando libremente en la masa de agua.

Procariota: célula que carece de orgánulos rodeados de membrana.

Proliferación: porciones nuevas del talo que se forman a partir del borde, la superficie o la base de uno más viejo.

Proximal: cercano al origen o al eje.

Retículo: en red.

Rizoide: célula adaptada a la adhesión.

Septo: tabique entre dos secciones abiertas de un talo o cenocito.

Sésil: órgano asentado directamente sobre el eje, sin pedúnculo.

Submareal: ubicado en el litoral por debajo del nivel de las bajamares ordinarias.

Talo: cuerpo vegetativo de plantas no vasculares.

Toxinas: sustancias tóxicas producidas por organismos o células.

Tricoma: fila o hilera de células dispuestas linealmente, sin vaina.

Vaina mucilaginosa: capa mucilaginosa que envuelve las células o tricomas formado por polisacáridos que son excretados por las células.

Vegetativo/va: se dice de la célula, porción del talo o talo que no está modificado para la reproducción, ya sea por estar destinado a la función de fotosíntesis o por no haber emprendido aún un proceso de diferenciación reproductiva.

Glosario Biología Molecular

Ácidos nucleicos: denominación que se da al conjunto de ADNs y ARNs presentes en las células de los organismos.

ADN ambiental: Es el conjunto de ADN total que se encuentra presente en una muestra tomada de un ambiente dado. Este ADN pertenece a todos los organismos presentes en la muestra.

ADN polimerasas: Enzimas que intervienen en la reacción en que una hebra de ADN (molde) se duplica, utilizando los nucleótidos como sustratos.

ADN: Ácido desoxirribonucleico. Es el encargado de la transmisión de los caracteres genéticos. Es un polímero compuesto por nucleótidos que forman una estructura de doble hélice. Constituye el material genético heredable de la mayoría de los organismos, se puede autorreplicar en la célula. El ADN está constituido por cuatro tipos de nucleótidos: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C).

ARN: ácido ribonucleico. Es un ácido nucleico de cadena sencilla compuesto por los nucleótidos Adenina (A), Uracilo (U), Guanina (G) y Citosina (C). El ARN mensajero (ARNm) en las células sirve como intermediario de la información genética ya que copia ésta del ADN y luego dirige la síntesis de proteínas según su secuencia de nucleótidos. Los ARN ribosomales (ARNr) forman parte de los ribosomas. El ARNr 16S es uno de los ARNr asociados con la subunidad pequeña de los ribosomas de los procariontes.

Gen cianobacteriano: Es una secuencia o segmento de ADN (que forma parte del genoma de la cianobacteria) que es necesario para la síntesis de ARN que tendrá una función determinada. Entre las funciones que tienen los ARNs, se pueden mencionar la de constituir los ribosomas que intervienen en la síntesis de las proteínas (ARN ribosomales, o ARNr), y las de transmitir la información genética del ADN que será traducida a proteínas. Estos últimos se denominan ARN mensajeros (ARNm) y que posteriormente se traducirán a proteínas. La secuencia de bases presente en el ARNm determina la secuencia de aminoácidos de la proteína de acuerdo al código genético.

Kits: es un conjunto de componentes que sirven para realizar una función determinada. En el texto se refiere a reactivos y otros elementos que constituyen un conjunto para por ej. determinar la concentración de toxinas, purificar ADN, etc.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction). Esta técnica utiliza una enzima denominada ADN polimerasa particular (Taq polimerasa) que copia cadenas de ADN en un proceso que simula la forma en la que el ADN se replica de modo natural en la célula. Esta replicación *in vitro* se suele denominar amplificación, y permite obtener gran número de copias a partir de un solo segmento determinado de ADN, incluso en presencia de otras moléculas de ADN (como ocurre con el ADN ambiental).

Termociclador: Es la denominación general que se da a los equipos para llevar a cabo las reacciones de la PCR en tubos (tipo eppendorfs) que se colocan en las gradillas del mismo. Estos aparatos permiten programar ciclos de distintas duraciones y con distintas temperaturas controladas, con mucha precisión. Los cambios de temperatura son muy rápidos de manera que todos los tubos conteniendo as mezclas de reacción para la PCR alcanzan la misma temperatura la mismo tiempo. Hay distintas marcas comerciales.

Autores

Aguilera Anabella

Estudiante de la Licenciatura en Biología, Orientación Ecología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Pasante "ad-honorem" en el programa de Entrenamiento y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) en el tema de Cyanobacteria toxigenas en ambientes acuáticos continentales. Ha participado en proyectos de investigación: *Monitoreo de algas toxígenas del Río de la Plata*, y ha realizado servicios a terceros: Análisis de muestras de agua del Canal Este (Ensenada).

Dirección: Departamento Científico Ficológia, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque S/N, La Plata, (1900).

Andrinolo Dario

Doctor en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile. Licenciado en Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata. En base a trabajos durante 10 años en ficotoxinas marinas (Mareas Rojas) ha obtenido los grados de Magister en Ciencias Fisiológicas y. Actualmente se desempeña como Investigador de CONICET y docente de la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Posee publicaciones y proyectos de investigación en el área de Cianobacterias y cianotoxinas, específicamente identificación, cuantificación y farmacología de las cianotoxinas.

Dirección: Cátedra de Toxicología General. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900), La Plata.

e-mail: dandrinolo@yahoo.com.ar

Bogarin Cinthia Griselda

Ingeniera Química en la Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Resistencia, realizando la Maestría en Ingeniería y Tecnología Ambiental.

Participó de diferentes programas de monitoreos de los ríos Bermejo, Paraná, Paraguay, Negro y sus afluentes, en control de diferentes contaminantes. Realizó capacitaciones y controles sobre análisis de aguas, suelos y diferentes en matrices por cromatografía líquida y gaseosa con sistemas de detección por espectrometría de masa, microcaptura electrónica y detección por arreglo de diodo y fluorescencia. Actualmente trabaja para la empresa Aguas de Corrientes efectuando principalmente el control de compuestos orgánicos en aguas por cromatografía y ensayos de evaluación de carbón activado.

Dirección: Aguas de Corrientes S. A. Gobernador Pampin 115. 3400 Corrientes.

e-mail: cinthiabogarin1976@hotmail.com

Busso Fanny

Bióloga. Responsable Laboratorio Central del Departamento Calidad Aguas Cordobesas S. A. Ha trabajado en Proyectos de investigación: Monitoreo de la calidad del agua del Embalse Los Molinos, UNC-DiPAS.ACSA, desde 2001 a la fecha. Cordoba-Assessment of reservoir processes with particular reference to algae bloom occurrence, ACSA-ASTRAM. Argentina-Malaysa. Monitoreo de la calidad del agua del embalse San Roque" INA-ACSA desde 1999 a la fecha. Analysis of Cyanobacterial toxins – An overview" Convenio ACSA-ASTRAN-CSIRO Brisbane, Australia. Propuesta de un protocolo de concentración y recuento de fitoplancton ACSA-ASTRAN, Kuala Lumpur, Malaysa. Frequently asked questions on algae toxin & algae related problems ACSA-ASTRAN. Kuala Lumpur, Malaysa. Dirección: Laboratorio Central, Calidad, Gerencia de producción, Aguas Cordobesas. Camino de la Calera Km 12.5 (5151). Córdoba. e- mail: fbusso@aguascordobesas.com.ar

Echenique Ricardo O.

Doctor en Ciencias Naturales (or. Ecología y Conservación de los Recursos Naturales Renovables) UNLP. Investigador Adjunto (sin Director) de la CIC, Prov. Buenos Aires. Departamento Científico Ficología. Fac. Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Area de trabajo: Taxonomía de algas del fitoplancton de ambientes acuáticos continentales. Ecología de fitoplancton de ambientes acuáticos continentales. Monitoreo y control de especies de Cyanobacteria nocivas en sistemas de potabilización de agua. Publicó un libro y 34 trabajos científicos y cuatro trabajos de divulgación. Ha participado en reuniones científicas tanto nacionales como internacionales. Ha dictado mas de 20 conferencias, en Reuniones Científicas (Congresos, Seminarios, Talleres y Mesas Redondas). Dirección: Departamento Científico Ficología Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Paseo del Bosque S/N, La Plata, (1900). e-mail: rechen@fcnym.unlp.edu.ar.

Giannuzzi Leda

Doctora en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ha obtenido 9 distinciones y premios en Congresos y eventos a los trabajos científicos. Es Profesor Adjunto ordinario simple en la Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. Investigador Independiente CONICET. Autor y expositor en 150 trabajos presentados en Congresos nacionales e internacionales. Autor de 70 trabajos científicos en revistas internacionales y 30 en Proceeding con referato. Ha dirigido tesis de grado, y tesis doctorales y de maestrías de Post grado. Es evaluador de proyectos de investigación diversas Universidad del país y del exterior, del CONICET y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, CIC. Dirección: Cátedra de Toxicología General. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900), La Plata. e-mail: leda@biol.unlp.edu.ar

Izaguirre de Verrastro María del Carmen

Profesora en Biología, egresada de la Universidad Nacional del Nordeste. Jefe del sector efluentes y contaminación hídrica de la administración Obras Sanitarias Corrientes. 1983 – 1991 analista de laboratorio del ente regulador de la AOSC 1991-2003. Jefe de laboratorio y control de calidad de la misma repartición 2003-hasta la fecha. Numerosos trabajos presentados en diferentes congresos. En noviembre de 2004 en el XIV Congreso Argentino de AIDIS obtuvo el segundo premio con el trabajo "Remoción de Microcistina por acción del cloro".
Dirección: Administración de Obras Sanitarias de Corrientes (AOSC) Ente Regulador. Gobernador Pampin 198. 3400 Corrientes.
e- mail: carmeniza2002@yahoo.com.ar

Llano Victor Martín

Licenciado en Genética de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones (UNaM). Inscripto al doctorado en la Univ. Nac. de Mar del Plata, tema: Estudio sobre la estructura y dinámica poblacional de floraciones cianobacterianas en el río Alto Paraná (CIB-FIBA). Becario de Perfeccionamiento, Proyecto: Comunidades Planctónicas y Bentónicas (UNaM). Integrante PICT "Desarrollo de estrategias para la comprensión y el manejo de floraciones cianobacterianas tóxicas en la Cuenca del Plata". Red FIBA-UNaM-CIDCA-Museo (UNLa Plata). Ha presentado varios trabajos en congresos y participado en convenios entre la Facultad y otros organismos públicos y privados.
Dirección: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Rivadavia 2370 (3300), Posadas, Misiones.

Meichtry de Zaburlin Norma R

Profesora en Biología y Magíster en Ecología Acuática Continental, egresada de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. Docente, Investigadora de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Líneas de investigación: Taxonomía y Ecología del Fitoplancton, Limnología, Cianofíceas Tóxicas, Calidad de Agua en Embalses. Integrante del Consejo del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET) de la FCEQyN. Directora del Area Hidrobiología del Programa Calidad de agua en el Embalse Yacyretá, Convenio entre la FCEQyN y la Entidad Binacional Yacyretá. 55 trabajos presentados en Congresos, 17 de ellos publicados en revistas científicas. Formación de 25 becarios de diferentes categorías. Ha trabajado en numerosos estudios relacionados con la calidad del agua, diversidad y ecología de organismos acuáticos y en Proyectos Hidroeléctricos (COMIP, Urugua-í, Garabí, Yacyretá), realizando más de 50 Informes Técnicos.
Dirección: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Rivadavia 2370 (3300), Posadas, Misiones.
e- mail: meichtry4@hotmail.com

Martens Irmgard Sandra Mabel

Lic. en Genética, egresada de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones (UNaM). Becaria del Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT) y en el Proyecto de Investigación FCEQyN, UNaM: "Comunidades Planctónicas y Bentónicas", desarrollando trabajos en el área de fitoplancton, con énfasis en cianobacterias. Ha participado como personal técnico en convenios entre la Facultad y otros organismos públicos y privados. Ha participado en cursos de perfeccionamiento en el tema, presentado varios trabajos en congresos y colaborado en numerosos informes técnicos.

Dirección: Aguas de Corrientes S. A. Gobernador Pampin 115. 3400 Corrientes.

Román Nancy

Bioquímica otorgado por la Universidad Nacional del Nordeste-Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura-Corrientes (UNNE-FACENA). Recertificación del Ente Certificador del Nordeste Argentino (ECNEA) año 2007 Nro de registro C172. Matrícula Profesional otorgada por Salud Pública de la Provincia de Corrientes N°: 333. Ha realizado cursos de Posgrados internacionales en calidad de aguas. Posee el Diploma Universitario en Gestión de la Calidad de la Deutsche Gesellschaft fur Qualitat e.V. European Organization for Quality, INCALIN. Se desempeña desde el año 1995 como Bioquímica en el Laboratorio de control de calidad de Aguas de corrientes S.A., actualmente como Responsable del Sector Aguas, productos químicos y bacteriología.

Dirección: Aguas de Corrientes S. A. Gobernador Pampin 115. 3400 Corrientes.

Ruibal Conti Ana laura

Bioquímica egresada de la Universidad Católica de Córdoba. Magíster en Ingeniería del Ambiente Global en Universidad de Kyoto-Japón.

Investigadora del Instituto Nacional del Agua en el Área de Limnología Aplicada y Calidad de Agua.

Capacitación de postgrado en el exterior sobre temas de Calidad de Agua, Manejo de Cuenca, Ecohidrología, tratamiento de aguas residuales y saneamiento ecológico.

Participación en proyectos de asesoramiento y servicios a terceros en Estudios de Impacto Ambiental y en Estudios de Calidad de Agua especialmente asociados a eutrofización y desarrollo de floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas.

Contacto Argentino de la Red Internacional de cianobacterias tóxicas en el proyecto UNESCO- CYANONET.

Encargada de formación académica y técnica en análisis de laboratorio de personal en el Instituto Nacional del Agua-Centro de la Región Semiárida.

Dirección: Instituto Nacional del Agua. Centro de la Región Semi-árida. Ambrosio Olmos 1142 (5200). Córdoba.

e-mail: calidadaguas@ina-crsa-ccap.gov.ar

Oliver Cristian

Bioquímico recibido en la Universidad Nacional de La Plata, desarrolla su actividad docente y de investigación en la Cátedra de Toxicología General de la UNLP. En la misma se encuentra abocado al desarrollo de indicadores de exposición a microcistinas y a sistemas de depuración con agentes fisicoquímicos para eliminación de ficotoxinas en aguas. El mismo se desempeña además como perito en la actividad forense en el ámbito judicial.

Dirección: Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900), La Plata.

Otaño Silvia Haydee

Se recibió de Oceanógrafa en la Universidad Nacional de la Patagonia en el año 1985. Desde el año 1989 se ha desempeñado como investigadora sobre la problemática de las mareas rojas y de las floraciones de algas de agua dulce en diferentes universidades nacionales argentinas. Ha participado además en trabajos de investigación financiados por el Global Environment Facility y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (GEF/PNUD), la Unión Europea, el Banco Mundial y el Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. Ha publicado numerosos trabajos en revistas nacionales e internacionales sobre fitoplancton, calidad de agua y floraciones de cianobacterias.

Dirección: Aguas de Corrientes S. A. Gobernador Pampin 115. 3400 Corrientes.

Rasile Alejandra

Bioquímica. Docente de la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Ejerce funciones como Perito Forense en el área de Manchas Biológicas (Análisis Inmunológico) en el ámbito judicial de la Provincia de Buenos Aires.

Dirección: Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900), La Plata.

Ruiz Marcia

Bioquímica y Farmacéutica (UCC). Especialista en Ingeniería Ambiental (UTN). Magister en Ingeniería del Agua (Universidad Politécnica de Sevilla, España).

Investigadora del Instituto Nacional del Agua en el Área de Limnología Aplicada y Calidad de Agua. Capacitación de postgrado sobre temas de Calidad de Agua, y tratamiento de aguas residuales. Participación en proyectos de asesoramiento y servicios a terceros en Estudios de Impacto Ambiental y en Estudios de Calidad de Agua. Formación de recursos humanos de pasantes que ingresan al INA.

Dirección: Instituto Nacional del Agua. Centro de la Región Semi-árida. Ambrosio Olmos 1142 (5200). Córdoba.

e- mail: marciar Ruiz74@hotmail.com

Salerno Graciela L.

Doctora en Ciencias Químicas, de la UBA. Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Inv. Principal), Prof. Titular del Area Química Biológica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Directora del Grupo de Investigación: Biología Funcional y Molecular de Organismos Fotosintéticos y Aplicaciones Biotecnológicas. Directora del Centro de Investigaciones Biológicas (FIBA) y del Centro de Estudios de Biodiversidad y Biotecnología (grupo vinculado al IByF-CONICET). Directora de la Escuela Argentina del Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología (CABBIO) Miembro del Consejo de Gestión del BIOLAB-Azul (Laboratorio de Biotecnología, Fac. de Agronomía, Univ. Nac. Centro de la Prov. de Buenos Aires. Dirección de 12 tesis doctorales concluidas y de 29 trabajos para obtener el título de Licenciado en Cs. Biológicas o Cs. Químicas. Ha publicado 62 trabajo científicos en revistas internacionales con referato y más de 100 presentaciones a congresos internacionales. Dirección: Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA, Mar del Plata, Pcia. Bs. As. e- mail: gsalerno@fiba.org.ar

Sedan, Daniela Yazmine

Bioquímica, egresada de Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Tema de tesis: Evaluación de los efectos tóxicos de la exposición subcrónica a Microcystinas en ratones NIH swiss. Beca de Iniciación otorgada por la UNLP. Participación como docente de la cátedra de Toxicología de la carrera de Bioquímica y del curso de post-grado Cianobacterias y Cianotoxinas, dictados en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Participación en calidad de integrante del Grupo de Investigación de Cianobacterias Toxígenas que funciona en la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP (2004-actual) en la realización de numerosos proyectos de investigación, presentación y exposición oral de trabajos científicos.

Dirección: Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900), La Plata.

Dirección: Cátedra de Toxicología General. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900), La Plata.

INDICE

Prólogo.....	5
A modo de presentación.....	7
Prefacio.....	9
Sumario Cianobacteria y Cianotoxinas.....	15
Sección I: Introducción al tema de Cianobacterias y Cianotoxinas. Fundamentos Toxicológicos.....	17
Capítulo 1 Cianobacteria planctónicas: su impacto en ambientes acuáticos continentales.	
Descripción de los géneros más frecuentes.....	17
Norma Meichtry de Zaburlín Irmgard Sandra Martens Victor Llano.....	17
1. 1. Introducción.....	17
1. 2. Eutrofización, floraciones y calidad del agua.....	20
1. 3. Reconocimiento de las Cianobacteria.....	22
1. 4. Taxonomía. Descripción de los géneros más frecuentes.....	23
CHROOCOCCALES.....	23
OSCILLATORIALES.....	23
NOSTOCALES.....	23
STIGONEMATALES.....	23
Clave de identificación de los géneros planctónicos más frecuentes de Cianobacteria.....	24
ORDEN CHROOCOCCALES.....	26
ORDEN OSCILLATORIALES.....	28
ORDEN NOSTOCALES.....	30
Bibliografía.....	34
Capítulo 2: Cianobacteria toxígenas. Aspectos generales para su identificación taxonómica.....	37
Ricardo O. Echenique Anabella Aguilera.....	37
2.1. Introducción.....	37
2. 2. Taxonomía.....	40
2. 3. Principales géneros toxígenos presentes en Argentina.....	41
Bibliografía.....	51
Capítulo 3: Floraciones de Cianobacteria toxígenas en la República Argentina: antecedentes.....	53
Ricardo O. Echenique Anabella Aguilera.....	53
Bibliografía.....	56
Capítulo 4: Efectos sobre la salud humana y animal. Mecanismos de acción tóxica.....	67
Darío Andrinolo Mariela Caneo.....	67
4. 1. Introducción.....	67
4. 2. Principales rutas de exposición a cianobacterias y sus toxinas.....	67
4. 3. Niveles de Alerta propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).....	68
4. 4. Situación en Argentina.....	68
Intoxicaciones con Microcistinas.....	69
Farmacocinética.....	70
Mecanismos de acción.....	71
Valores guía y agua potable.....	72
Nodularinas.....	72

Cilindrospermopsinas (CYNs)	72
Saxitoxinas (Veneno Paralizante de los Moluscos, VPM)	73
Anatoxinas	74
Anatoxina-a/ homoanatoxina-a	75
Anatoxina-a(s)	76
Lipopolisacáridos	76
Bibliografía	77
Capítulo 5: Olores y Sabores en Agua	79
Fanny Busso	79
5. 1. Introducción	79
5. 2. Clasificación de olores y sabores	80
5. 2. 1. Geosmina	81
5. 2. 4. Trichloroanisol	82
5. 3. Eliminación de olores y sabores	82
5. 4. Análisis sensorial	82
5. 4. 1. Herramientas fisiológicas	83
5. 4. 2. Métodos de Análisis sensorial	83
Método Perfil de Olor y Sabor	83
5. 5. Determinación de geosmina en aguas utilizando microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía gaseosa con detector de masas	86
5. 5. 1. Preparación de la muestra y análisis	87
Bibliografía	88
Sección II: Metodología Analítica	91
Capítulo 6: Fundamentos de las técnicas analíticas utilizadas para detectar células, toxinas y parámetros físico químicos relevantes	91
Cristian R. Oliver Alejandra Rasile	91
6.1. Introducción	91
Control de calidad	94
6. 2. Métodos Analíticos utilizados en la Determinación de Toxinas	96
6. 2. 1. Métodos Cromatográficos	96
Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)	97
Espectrometría de Masas	100
Ionización	101
Distribución de masas	101
Interpretación de los resultados:	102
Extracción en Fase Sólida (SPE)	102
6. 2. 2. Métodos enzimáticos	105
Ecuación de Michaelis-Menten:	106
Interpretación de resultados:	107
6. 2. 3. Métodos Espectrofotométricos	107
Leyes de Absorción	107
Ley de Beer	108
6. 2. 4. Metodos Inmunológicos	109
Método de ELISA para detección de Cianotoxinas	110
Interpretación de Resultados:	112
6. 3. Validación de Métodos	112
Cuantificación mediante Cromatografía	112
Exactitud	112
Precisión	113

Linealidad y Rango	113
Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	113
Método del Estándar Interno	113
6. 4. Elaboración del informe.....	114
Bibliografía	115
Capítulo 7: Toma de muestra de agua en diferentes ambientes para determinaciones de algas y toxinas. Procedimientos analíticos.....	117
Métodos de detección de cianotoxinas	117
Darío Andrinolo Ricardo Echenique Daniela Sedan	117
7. 1. Introducción.....	117
7. 2. Toma de Muestra.....	118
7. 2.1. Toma de muestra de agua de río , lagos y lagunas	118
7. 2. 2. Toma de muestra de agua de red.....	122
7. 3. Análisis de Fitoplancton	123
7. 3.1. Análisis Cualitativo.....	123
7. 3. 2. Análisis Cuantitativo (Recuento de fitoplancton).....	124
7. 4. Determinación de pigmentos fotosintéticos.....	126
7. 4. 1. Extracción de clorofila y determinación de absorbancia.....	126
7. 4. 2. Cálculo de concentración de clorofila.....	127
7. 5. Determinación de toxinas en diversas muestras.....	128
7. 5. 1. Criterios de estabilidad de las toxinas en las muestras.....	129
7. 5. 2. Procesamiento de las muestras.....	129
7. 5. 3. Métodos Bioanalíticos	133
Preparación de muestras.....	134
Preparación de animales	134
Técnica de inyección de la muestra.....	134
Observación post-inyección	135
Necropsia.....	136
Cálculos e informe de resultados	137
Reacción Enzimática	139
Cálculos y gráficos	139
7. 5. 4. Métodos Analíticos. Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC).....	143
Bibliografía	150
Capítulo 8: Herramientas moleculares para la detección de estirpes de cianobacterias productoras de toxinas	151
Graciela L. Salerno Fabiana Consolo Corina Berón.....	151
8. 1. Introducción.....	151
8. 2. Fundamentos de los ensayos desarrollados para la identificación y clasificación de las cianobacterias con potencialidad de producir toxinas.....	152
<i>Secuencias de genes más informativas usados actualmente para identificar cepas de cianobacterias.....</i>	<i>152</i>
8. 3. Identificación molecular de cepas tóxicas y de las toxinas que pueden producir.....	153
8. 4. Ensayos de PCR para detectar cianobacterias tóxicas.....	154
8. 5. Importancia de la toma de la muestra ambiental para un exitoso análisis molecular.....	155
8. 6. Pasos que se siguen en el laboratorio molecular.....	156
Bibliografía	157
Capítulo 9: Enfoques para la evaluación y manejo del riesgo de cianobacterias.....	159
Ana Laura Ruibal Conti Marcia Ruiz Silvia Otaño	159
9. 1. Marco general.....	159
9. 1. 1. Conceptos básicos de manejo de riesgo.....	161
9. 1. 2. Evaluación del Riesgo o Valoración de la Situación.....	162

9. 2. Marcos de Gestión del Riesgo: Árboles de Decisión para AGUA POTABLE	166
9. 2. 1. Árboles de decisión para agua potable	166
Programa de Monitoreo Regular:	166
Nivel de Vigilancia:	167
Nivel de Alerta 1:	167
Nivel de Alerta 2:	168
Nivel de Alerta 3:	169
Coordinación con otros Organismos Públicos y Privados	173
9. 2. 2. Árboles De Decisión Para Agua Recreativa	173
9. 3. Enfoques Regulatorios	175
9. 3. 1. Niveles guía de agua potable:	176
9. 3. 2. Exposición recreativa:	177
9. 3. 3. Aproximaciones basadas en el riesgo	178
9. 3. 4. Otros temas que son necesarios que sean regulados	178
9. 4. Medidas de prevención, mitigación y remediación de los desarrollos masivos de cianobacterias	179
9. 4. 1. Nivel 1: Medidas de prevención de la Eutrofización	181
Control del Ciclo hidrológico y erosión de la tierra	182
9. 4. 2. Nivel 2: Medidas en el Cuerpo de Agua	187
9. 4. 3. Nivel 3: Medidas en el Cuerpo de Agua inmediatas	189
Bibliografía	191

Capítulo 10: Tratamientos para disminuir la incidencia de cianobacterias y cianotoxinas en plantas potabilizadoras

plantas potabilizadoras	193
Carmen Izaguirre Nancy Román Cinthia G. Bogarin	193
10. 1. Generalidades	193
10. 2. Datos técnicos de plantas potabilizadoras	193
10. 3. Controles que se deberían realizar en la planta cuando se detectan floraciones en la fuente de captación de agua	194
10. 3. 1. Recuentos de algas en cada etapa del proceso.	194
10. 3. 2. Determinación de toxinas en cada etapa del proceso	194
10. 3. 3. Panel de olores	194
10. 3. 4. Ensayos de jarra en agua cruda.	195
10. 3. 5. Control periódico de trihalometanos (THM) en agua clorada	195
10. 3. 6. Ensayo de demanda de cloro	195
10. 3. 7. Control de carbono Orgánico	195
10. 4. Evaluación de remoción de algas, toxinas y metabolitos para tratamientos convencionales y especiales	195
10. 4. 1. Alguicidas	196
10. 4. 2. Coagulantes y coadyuvantes	196
10. 4. 3. Pre-oxidación:	196
10. 4. 4. Carbón activado	197
10. 4. 5. Desinfección:	200
10. 4. 6. Consideraciones en el tratamiento de metabolitos generadores de olores y sabores	202
10. 5. Resumen de la efectividad de los tratamientos	203
10. 6. Evaluaciones organolépticas	203
10. 6. 1. Generalidades	203
10. 6. 2. Técnica de evaluación de olores en agua potable	203
10. 6. 3. Entrenamiento de panelistas	205
10. 6. 4. Procedimiento de Análisis de olor	206
10. 6. 5. Procedimiento de Análisis de sabor	206
10. 7. Ensayos de calidad del PAC:	207
10. 7. 1. Influencia de la matriz orgánica	208

10. 7. 2. Ensayos de adsorción	208
10. 7. 3. Cinética de Adsorción.....	212
10. 7. 4. Ensayo para carbón granular.....	214
Procedimientos.....	215
Ensayo de Coagulación:	215
Solución de coagulante para el ensayo:	215
Equipos y elementos necesarios:	215
<i>Procedimiento:</i>	215
Ensayo de demanda de cloro:.....	217
Preparación y dosificación de PAC:.....	218
Bibliografía	220
Glosario	221
Glosario Biología Molecular	225
Autores	227
Aguilera Anabella	227
Andrinolo Dario.....	227
Bogarin Cinthia Griselda	227
Busso Fanny	228
Echenique Ricardo O.....	228
Giannuzzi Leda	228
Izaguirre de Verrastro María del Carmen.....	229
Llano Victor Martín	229
Meichtry de Zaburlin Norma R.....	229
Martens Irmgard Sandra Mabel.....	230
Román Nancy.....	230
Ruibal Conti Ana Laura	230
Oliver Cristian.....	231
Otaño Silvia Haydee.....	231
Rasile Alejandra	231
Ruiz Marcia	231
Salerno Graciela L.....	232
Sedan, Daniela Yazmine.....	232

