

| | | |
|---|---|---|
|  | <p>Caracterización de las toxinas obtenidas de las cianobacterias presentes en los estanques de producción de peces de la estación acuícola de repelón, y el embalse El Guájaro, Atlántico.</p> |  |
|---|---|---|

Caracterización de las toxinas obtenidas de las cianobacterias presentes en los estanques de producción de peces de la estación acuícola de repelón, y el embalse El Guájaro, Atlántico.

INFORME FINAL

Ejecutado por: Autoridad nacional de acuicultura y pesca – AUNAP- y Universidad de la Costa –CUC-.

Investigador principal: Claudia Tapia Larios, MSc. Ph.D Toxicología Ambiental.

Lugar de ejecución: Estación piscícola Bajo Magdalena.

CONVENIO DE COOPERACION TECNICA NO. 000137 DEL 2014.

OCTUBRE 2015

1. RESUMEN

Actualmente la creciente eutrofización de los sistemas acuáticos por efecto del incremento de la población, agricultura, minería y aporte de nutrientes por procesos asociados a la acuicultura, se han convertido en un fenómeno frecuente en lagos y reservorios, en muchas partes del mundo. Cuando los sistemas se tornan eutróficos, la diversidad del fitoplancton disminuye, conduciendo a que prevalezcan poblaciones dominantes de cianobacterias, sobre todo en áreas con altas temperaturas, condiciones de luz-energía constante y pH alto. El desarrollo masivo de cianobacterias, capaces de producir potentes toxinas, genera graves repercusiones en la salud pública, ecología acuática y sanidad animal. Las cianotoxinas se bioacumulan en invertebrados y vertebrados acuáticos, principalmente en el zooplancton y en el hígado de peces, lo que implica que hay un considerable potencial para que los efectos tóxicos se magnifiquen en la red trófica.

El Embalse del Guájaro está ubicado en el departamento del Atlántico, Colombia, es el área de pesca más grande de la zona y tiene un nivel de eutrofización medio, debido a diferentes factores. Actualmente en él se desarrollan sistemas de cultivos intensivos de peces y camarones, como parte del Plan de Desarrollo Nacional, y los productos son comercializados en las ciudades principales de la costa Atlántica colombiana. Por el hecho de tratarse de una pesquería monoespecífica, implica un riesgo mayor, debido a que los peces pueden convertirse en un posible vector epidémico. Se propone entonces, la caracterización de cianobacterias dominantes, productoras de cianotoxinas presentes en el embalse, ya que este constituye un suministro de alimento para la población y por lo tanto se requiere identificar si existen factores de riesgos asociados al consumo de peces de esta zona. Las mejores evidencias para evaluar el potencial de las cianotoxinas sobre los organismos acuáticos provienen de estudios controlados en laboratorios con exposición de animales a cianobacterias tóxicas o a soluciones de cianotoxinas libres de células.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| 2. INTRODUCCION..... | 4 |
| 2.1 Planteamiento del problema..... | 7 |
| 2.2 Justificación..... | 8 |
| 2.3 Estado del arte..... | 10 |
| 2.4 El embalse El Guájaro..... | 13 |
| 2.5 Marco teórico..... | 16 |
| 3. OBJETIVO GENERAL..... | 18 |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 5. METODOLOGÍA..... | 19 |
| 5.1 Recolección de la muestra y aislamiento de cianobacterias..... | 19 |
| 5.2 Aislamiento de cultivos puros..... | 21 |
| 6. RESULTADOS | 22 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 31 |

2. INTRODUCCION.

El fenómeno de las floraciones de cianobacterias es mundial y Colombia no es la excepción. Actualmente, en el país no existen reglamentaciones que se refieran a la prevención o a la gestión de las floraciones de cianobacterias. A los efectos de comprender las causas del desarrollo de las floraciones de cianobacterias e implementar medidas de gestión apropiadas es necesario el desarrollo de la investigación científica.

La mayor parte de las especies de cianobacterias deben ser combatidas en estadios tempranos de su desarrollo ya que una vez establecidas, las medidas correctivas, cuando son posibles, son de alto costo y de difícil implementación (Scheffer 1998). Para predecir y gestionar correctamente las floraciones de cianobacterias es necesario entender cuáles son las condiciones particulares que las favorecen en el ecosistema. Las cianobacterias son un grupo diverso de organismos por lo que no pueden ser estudiadas como una única entidad ya que presentan una alta diversidad de respuestas y efectos ambientales (Reynolds, 2006).

Las cianotoxinas producidas por cianobacterias, pertenecen a diversos grupos de sustancias químicas cada una de las cuales muestran mecanismos distintos de toxicidad, algunas son neurotoxinas potentes otras con actividad primaria sobre hígado, y algunas con efectos gastrointestinales y de respuestas alérgicas [1]. Ciertas cianobacterias producen β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) un aminoácido neurotóxico que es capaz de unirse a proteínas endógenas y funcionar como una toxina lenta, y de esta forma estar implicado en la etiología de enfermedades neurodegenerativas de latencia prolongada como el Alzheimer.

Si bien se han hecho avances importantes, aún no hay un método estandarizado y rápido para detectar toxicidad. Por este motivo, son importantes las medidas

preventivas. Los géneros más comúnmente implicados en los incidentes de envenenamiento en distintas partes del mundo son *Microcystis*, *Anabaena*, y *Aphanizomenon* [2]. También han producido eventos de toxicidad en aguas continentales, otros doce géneros de cianobacterias y uno de dinoflagelados. Con frecuencia creciente se han verificado casos de intoxicaciones masivas como consecuencia de la introducción de las toxinas algales en la red de distribución urbana [3].

Las mejores evidencias para evaluar el potencial de las cianotoxinas sobre los organismos acuáticos provienen de estudios controlados en laboratorios con exposición de animales a cianobacterias tóxicas o a soluciones de cianotoxinas libres de células. Las microcistinas son hepatotóxicos específicos de mamíferos. Luego de la exposición aguda a altas dosis, ellos pueden causar la muerte por hemorragia o falla hepática y pueden promover el crecimiento del hígado y ciertos tumores luego de la exposición crónica a bajas dosis.

Las grandes variaciones en las concentraciones de cianotoxinas regionales, estacionales, espaciales y temporales indican que la predicción o modelación de la ocurrencia de ciertas concentraciones de toxinas requiere un conocimiento comprensivo del desarrollo de la población (cepa) en diferentes ecosistemas acuáticos, así como la variabilidad de la cantidad de toxinas. Los estudios de laboratorio de cepas puras de cianobacterias han hallado que los factores ambientales pueden inducir a cambios en la toxicidad o en la concentración de toxinas por unidad de biomasa [4]. En lagos o ríos, las toxinas liberadas desde las células son rápidamente diluidas por la gran masa de agua, especialmente si se produce una agitación vigorosa por acción de los vientos o las corrientes. Sin embargo, las concentraciones de toxinas liberadas al medio pueden ser mayores en las floraciones envejecidas o en declinación.

Las microcistinas que son las cianotoxinas del genero *Microcystis* (las cuales pueden llegar a ser predominantes en embalses tropicales) pueden sufrir degradación fotoquímica lenta y procesos de isomerización con una velocidad de reacción que aumenta por la presencia de pigmentos celulares solubles en agua. Una degradación más rápida bajo condiciones de radiación solar se ha reportado en presencia de sustancias húmicas que podrían actuar como fotosensibilizantes en concentraciones de 2-16 mg/L de carbón orgánico disuelto [5].

La sedimentación de células vivas, no lisadas, por ejemplo en contacto con el zooplancton o partículas fecales podrían llevar a la acumulación y persistencia del material toxico en los sedimentos. Estas células sedimentadas fácilmente pueden sufrir lisis por acción de las bacterias y protozoos del sedimento, liberando rápidamente las toxinas. Ha sido reportado que las microtoxinas retenidas en las células intactas en el sedimento pueden persistir por varios meses.

Resulta incierto los niveles de acumulación de microcistina que serían necesarios para poner en riesgo a los seres humanos, pero seguramente dependerá de los niveles de consumo y la severidad de las floraciones toxicas en las áreas donde se capturan los peces para consumo humano. Basado en esto se propone la realización de la caracterización de cianotoxinas presentes en la estación piscícola de Repelón ya que esto constituye un suministro de peces para la población aledaña y se considera de vital importancia mantener unas condiciones adecuadas para el mantenimiento de los animales que en ella se cultivan y garantizar que no haya riesgo en la salud pública, por consumos de peces cultivados en esta zona [5].

Para lograr esto, se requiere la implementación de sistemas de cultivos, bajo condiciones contraladas de laboratorio, donde no solamente se realice el proceso de identificación, sino que además se realicen pruebas analíticas para la caracterización de cianotoxinas producidas en estos sistemas y realizar bioensayos para determinar grado de toxicidad y bioacumulación a la que puedan estar expuestos los peces en este sistema.

Los resultados obtenidos permitirán realizar procesos de monitoreo y control e implementar sistemas de alarmas para evitar consumo de peces intoxicados que puedan ocasionar danos en las poblaciones consumidoras.

2.1 Planteamiento del problema.

Las cianobacterias muestran una alta diversidad de géneros y especies mucho más cualquier otro grupo de bacterias. La caracterización de las comunidades que conforman los blooms de cianobacterias sigue siendo un problemática debido a que la taxonomía de ciertos géneros un no ha sido resuelta [5]. Factores morfológicos y morfométricos están influenciados por las condiciones de crecimiento, complicando aún más la identificación como consecuencia de la diferenciación de la expresión génica [6].

En el sistema lagunar el Guájaro no existen estudios toxicológicos que definan el perfil de cianotoxinas a las cuales se ven expuestos los peces y otros organismos que se desarrollan en este sistema. Es de mucha importancia realizar estudios que nos permitan dilucidar inicialmente el tipo de poblaciones de cianobacterias dominante y determinar el tipo de toxinas y posibles análogos, dependiendo de las condiciones ambientales y así ayudar a evitar posibles eventos de intoxicación en la población local asociadas al consumo de peces con contenido de cianotoxinas en sus tejidos.

Es por esto que en este proyecto, se contemplan dos fases, con el fin de definir qué tipo de toxinas son las predominantes en la estación y jaulas flotantes, de acuerdo a las variaciones climáticas de la zona, y una segunda fase incluirá la realización de pruebas de citotoxicidad en línea celular de hepatocitos humanos Hep G2, para determinar el tipo de riesgo a los cuales se exponen los consumidores de la zona, al ser estos peces una fuente primaria de alimentación.

2.2 Justificación

El enriquecimiento de nutrientes y el cambio climático están planteando una nueva preocupación cada vez más importante: un aparente aumento de la toxicidad de algunas floraciones de algas en lagos de agua dulce y estuarios de todo el mundo, [6].

Debido a las fluctuaciones en los periodos de lluvia y sequía, cada vez más extensos en nuestro país, se propone una extensión en el periodo de investigación, programado para el 2015, debido a que durante la puesta en marcha del proyecto, la época seca se extendió más de lo previsto y no se obtuvieron datos que permitieran ver cambios poblacionales en la época de lluvia, no permitiendo reconocer cual sería el comportamiento toxicológico asociado a las variaciones climáticas y fisicoquímicas del sistema. Actualmente la creciente eutrofización del complejo lagunar El Guàjaro por efecto del incremento de la población, agricultura, minería y aporte de nutrientes por procesos asociados a la acuicultura, se han convertido en un fenómeno frecuente que tornan al sistema a condiciones como una disminución en la diversidad del fitoplancton conduciendo a que prevalezcan poblaciones dominantes de cianobacterias, sobre todo por las altas temperaturas, luz-energía constante y pH alto, incrementando la proporción de cepas de cianobacterias productoras de toxinas [7, 8].

Mientras algunos países de la unión europea han puesto en marcha programas nacionales o regionales sobre algas tóxicas, en Latinoamérica el problema continúa siendo subestimado o ignorado y en Colombia la situación no es distinta. Por este motivo, son importantes las medidas preventivas, sin embargo, no existen regulaciones formales sobre cómo responder a estos eventos y se debe solicitar que se aumente la conciencia pública sobre estos temas.

El desarrollo masivo de microalgas y cianobacterias, capaces de producir potentes toxinas, genera graves repercusiones en la salud pública, ecología

acuática y sanidad animal. Las intoxicaciones directas de animales a partir de cianobacterias pueden ocurrir por dos vías de exposición: a través del consumo de células, (cianobacterias) desde el agua, o indirectamente a través del consumo de otros animales que han acumulado las cianotoxinas a partir de su ingestión [7, 9]). Las cianotoxinas se bioacumulan en vertebrados e invertebrados acuáticos, principalmente en el hígado de peces y en el zooplancton, lo que implica que hay un considerable potencial para que los efectos tóxicos se magnifiquen en la cadena acuática.

Se ha establecido una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) provisional de 0,04 µg/Kg/día de equivalentes de MC-LR y en relación con este valor guía, se considera que la exposición a microcistinas MC (toxinas de cianobacterias) por consumo de alimentos puede ser del orden del 20%, una vez reconocida su bioacumulación en algunos tejidos de plantas, moluscos y pescados, ya que las cianobacterias son un importante componente de la dieta de muchos peces cíclidos tropicales y ciprínidos [11].

Son diversos los estudios de campo que demuestran la acumulación de MC en pescados, procedentes de lagos con floraciones de cianobacterias tóxicas, incluso en periodos de baja densidad fitoplanctónica, pudiéndose alcanzar valores muy próximos a la Ingesta Diaria Tolerable. Al ser los peces uno de los organismos más proclives a las intoxicaciones por MC y acumularlas, en los últimos años se ha constatado un aumento considerable de las publicaciones científicas sobre los daños fisiopatológicos inducidos por las mismas a nivel macroscópico, histológico, ultraestructural y metabólico en peces, en función de la especie piscícola, lo que justifica su revisión. Por todas estas razones, se sugiere el desarrollo de este proyecto en la estación piscícola, para determinar el grado de exposición en la cual se encuentran los peces que crecen en este sitio [10, 11,17].

2.3 Estado del arte.

Las cianotoxinas pertenecen a diversos grupos de sustancias químicas cada una de las cuales muestran mecanismos distintos de toxicidad, algunas son neurotoxinas potentes, otras con actividad primaria sobre hígado, y algunas con efectos gastrointestinales y de respuestas alérgicas (Gupta et al., 2003, Mankiewicz J, 2001). Ciertas cianobacterias producen β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) un aminoácido neurotóxico que es capaz de unirse a proteínas endógenas y funcionar como una toxina lenta, y de esta forma estar implicado en la etiología de enfermedades neurodegenerativas de latencia prolongada como el Alzheimer.

Los géneros más comúnmente implicados en los incidentes de envenenamiento en distintas partes del mundo son *Microcystis*, *Anabaena*, y *Aphanizomenon* (Gupta et al., 2003) También han producido eventos de toxicidad en aguas continentales, otros doce géneros de cianobacterias y uno de dinoflagelados. Con frecuencia creciente se han verificado casos de intoxicaciones masivas como consecuencia de la introducción de las toxinas algales en la red de distribución urbana (Necchi et al., 1991).

Microcystis es el género que contienen una potente variedad de hepatotoxinas, entre ellas las microcistinas de las cuales se han reportado más de 75 variedades y hay una limitada información acerca de su perfil toxicológico (Moreno et al., 2005, Li, Y et al., 2009). Muchos estudios han sido enfocados a determinar los efectos agudos, subcrónicos y crónicos de exposición a microcistinas-LR, MC-LR (Bláha et al., 2009; Gupta et al., 2003, Codd et al., 2005). El efecto agudo de MC-LR puede ocasionar desorganización de la arquitectura hepática, rompimiento de la estructura sinusoidal y acumulación de sangre en hígado, mientras que el efecto crónico puede resultar en infiltración de leucocitos mononucleares, degeneración hepatotóxica con necrosis, fibrosis progresiva (Li, Y et al., 2009, Hitzfeld et al., 2000, Gupta et al., 2003).

Algunos síntomas pueden confundirse con los de enfermedades infecto-contagiosas transmisibles por el agua y en adición, la exposición a cianotoxinas, puede ocurrir por diferentes rutas incluyendo la oral, dermal e intravenosa (De

Magalhães et al., 2001). En el medio rural se ha comprobado la muerte de ganado, animales domésticos, aves y otros animales silvestres, en coincidencia con densas floraciones tóxicas (Tabla 1) (Bláha et al., 2009; Duy et al., 2000).

Lejos de tratarse de eventos ocasionales y aislados, se estima que irán en aumento con la misma celeridad con que se incrementa el número de ambientes eutrofizados.

Mientras algunos países de la unión europea han puesto en marcha programas nacionales o regionales sobre algas tóxicas, en Latinoamérica el problema continúa siendo subestimado o ignorado. Si bien se han hecho avances importantes, aún no hay un método estandarizado y rápido para detectar toxicidad. Por este motivo, son importantes las medidas preventivas. El conocimiento de las toxinas de las cianobacterias es reciente. Entre las técnicas empleadas para su aislamiento e identificación se encuentran la HPLC, el análisis estereoquímico, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Lawton y Codd 1991) y otras.

Estas técnicas son muy sofisticadas para un laboratorio standard. El único método de rutina disponible para verificar la presencia de toxicidad es el bioensayo en ratas mediante la inyección intraperitoneal del extracto obtenido de un cultivo axénico o de una floración natural (Sivonen *et al.* 1999), este, permite distinguir la presencia de hepatotoxinas de las neurotoxinas y aun entre diferentes tipos de neurotoxinas; sin embargo, no las detecta en concentraciones bajas.

Tabla 1. Ejemplo de intoxicaciones, en distintas especies por cianobacterias.

| Lugar de reporte | Especie afectada | Patología | Organismo | Referencia |
|------------------|---|--|---|---|
| EEUU | Humano, | Neurotoxicidad | <i>Gomphosphaeria</i> | (Pizzolon y Hechem (1992) |
| | Perros | | <i>Anabaena flosaquae</i> | |
| Australia | Ovejas | Hepatotoxicidad | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Mahmood et al., (1998). Jackson et al., (1984) |
| Canadá | Aves acuáticas | Neurotoxicidad | <i>Anabaena flosaquae</i> | Pybus y Hobson (1986) |
| Escocia | Truchas | Enfermedad branquial, microcistina | <i>Microcystis sp.</i> | Bury et al., (1995) |
| Portugal | Humanos (más de dos millones de personas) | Intoxicación aguda (efecto gastrointestinal) | <i>Microcystis sp.</i> | Vasconcelos et al. (1993) |
| Brasil | Humanos | Dermatitis y gastroenteritis | <i>Anabaena spiroides</i> y <i>Microcystis aeruginosa</i> | Beyruth et al. (1992) |
| Noruega | Gatos | Hepatotoxicidad | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Skulberg, (1979) |

Recientemente se han hecho avances importantes en técnicas inmunoenzimáticas que permitirían detectar toxinas disueltas aun en bajas concentraciones en forma relativamente rápida y estandarizada (Lawton y Codd 1991; Carmichael 1992, Herrans et al., 2011). Se han utilizado muchas especies de zooplancton en bioensayos para detectar la presencia de cianotoxinas y microcistinas (Kirivanta et al., 1991), sin embargo, al compararlo con otros modelos, los resultados han sido bastante dispares.

2.4 El embalse El Guájaro

Ubicado al sur del departamento del Atlántico, es el resultado de la unión de diferentes lagunas naturales, y se creó con el fin de utilizar sus aguas para el riego de los cultivos de la zona. Esta área cuenta con un clima tropical húmedo y seco presentando temperaturas de 28 a 30°C.

Tiene un área aproximada de 12.000 ha actualmente debido a problemas de sedimentos y reducción del espejo de agua por las actuales condiciones climáticas, en él pescan diariamente más de 2.500 pescadores que provienen de los ocho municipios circundante, con más de 250.000 habitantes y está conectado por el sur con el Canal del Dique, a través de un sistema de compuertas (Figura 1). En cuanto a la producción pesquera el embalse ha sido intervenido por el Estado a través de varias instituciones que han desarrollado allí programas de repoblamiento pesquero usando especies nativas como *Mugil spp.* y exóticas como las tilapia roja y cachama, (Caraballo P. 2009).

Se presenta una inconsistencia en el manejo actual del embalse al insistir, por presiones sociales, en repoblar un ecosistema con una especie invasiva, como la tilapia, que tiene las condiciones biológicas para desplazar especies nativas. La tilapia se ha consolidado en los últimos quince años como dominante del ecosistema (Caraballo, P. 2009), lo que confirma su plasticidad adaptativa para

ocupar espacios con condiciones incluso de eutrofización y convertirse en un posible vector de cianotoxinas, al ser la especie de mayor consumo.

Al realizar este proyecto podemos esperar identificar posibles riesgos de intoxicación de la comunidad, por consumo de peces en contacto con cianobacterias las cuales generan como productos metabólicos, sustancias tóxicas bioacumulables. La idea de trabajar con bioensayos de *C. elegans*, se debe a las numerosas ventajas que este ofrece, entre ellas, la facilidad de analizar sistemáticamente los efectos múltiples y toxicidades causadas por las cianobacterias, en el comportamiento locomotor, reproducción y vida útil entre otros.



Figura 1. Ubicación del embalse El Guájaro, Atlántico, Colombia

2.5 Marco teórico.

La mayoría de los casos de enfermedades humanas asociadas a las cianotoxinas han sido estudiados retrospectivamente y raramente se dispone de datos epidemiológicos completos, especialmente relacionados con el número de organismos, tipo y concentración de cianotoxinas (Azevedo S. 2002, Wiegand C, Pflugmacher S. 2004). La evidencia epidemiológica resulta de los estudios realizados sobre poblaciones que han mostrado signos de intoxicación atribuibles a la presencia de cianotoxinas en fuentes de agua.

En la Tabla 2, se muestra la relación entre la presencia de las principales cianotoxinas con los órganos dianas tras una exposición aguda. Cada vez es más evidente el número de reportes de floraciones algales nocivas y es el esfuerzo de atención a estos fenómenos (Ott and Carmichael. 2006). En este momento, es imposible controlar o predecir cuando y donde se presentara una floración algal. Por lo que debemos primero entender mejor la biología y ecología de los eventos FAN, para poder crear soluciones con fines de control.

Los programas de monitoreo exitosos tienen como componente principal el trabajar en equipos con agencias nacionales y departamentales e instituciones educativas para inicialmente desarrollar nuevas tecnologías o en su defecto estrategias que pueden ser empleada de manera rápida, para mitigar los efectos de las floraciones algales y de esta forma desarrollar programas educativos y capacitaciones entre los trabajadores de la industria de productos acuícola.

Tabla 2. Principales toxinas y sus organismos productores. Órgano diana y dosis letal 50 medida en ratones.

| Tipo de cianobacteria | Grupo de toxinas | Órgano diana | DL₅₀ |
|---|-------------------------|--|--|
| <i>Anabaena, Planktothrix, Cylindrospermopsis</i> | Saxitoxinas | Sistema nervioso | 10-30 ug/Kg |
| <i>Anabaena, Oscillatoria, Microcystis, Nostoc, Woronichinia, Planktothrix, Aphanocapsa</i> | Microcistinas | Hígado | 25>100 ug/Kg |
| <i>Nodularia</i> | Nodularinas | Hígado | 30-60 ug/Kg |
| <i>Anabaena</i> | Anatoxinas | Sistema nervioso | 20-40 ug/Kg |
| <i>Anabaena, Cylindrospermopsis, Radhiopsis</i> | Cilindropermopsinas | Compromiso multiorgánico (hígado, riñón, tracto gastrointestinal, bazo, corazón, piel) | 2.1 mg/Kg (24 horas) 200 ug/Kg (5 a 6 días) |
| <i>Lymgbya</i> | Lingbiatoxinas | Gasto intestinal | 250 ug/Kg |
| <i>Phormidium</i> | Homoantotoxina | Neurotoxina | 30-60 ug/Kg |

Para resolver la falta de información con referencia a la caracterización de cianotoxinas en la estación piscícola de Repelón, durante la época de lluvia se requiere una extensión del proyecto para:

- Desarrollar una identificación de las comunidades de cianobacterias presentes en el sistema.
- Identificar posibles variaciones espaciales y temporales de las poblaciones consideradas productoras de toxinas.
- Caracterizar las cianotoxinas liberadas en el medio acuático.
- Relacionar la presencia de las poblaciones de cianobacterias con posibles afectaciones en cuantos procesos biológicos en los peces cultivados, que puedan afectar tanto las características organolépticas, como características de tipo comercial (talla, peso, coloración etc.).
- Realizar estudio de manejo y control de floraciones de cianobacterias en el sistema de cultivo.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las toxinas de las poblaciones de cianobacterias aisladas en los estanques de cultivo de la estación acuícola de Repelón, y zonas aledañas a las jaulas flotantes. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislar las cianobacterias existentes en la estación piscícola de Repelón y que son de posible riesgo para los cultivos.

Cultivar e identificar taxonómica cepas puras de cianobacterias provenientes del embalse.

Obtener diferentes extractos de las cianobacterias aisladas con solventes orgánicos de diferentes polaridades.

Caracterizar los extractos mediante técnicas cromatográficas acopladas con espectrometría de masas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Recolección de la muestra y aislamiento de cianobacterias

Muestras de aguas serán colectadas en 7 sitios representativos del embalse El Guájaro (Figura 2). Para la recolección, se obtendrán muestras superficiales (1 metro de profundidad) con ayuda de una botella Van Dorm, almacenándolas en recipientes de vidrio de 500 mL, de acuerdo con los métodos establecidos por Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF, 1998). Las muestras serán filtradas a través de una malla con poros de 20 μm , y almacenadas en botellas de polietileno, cada muestra será subdividida en dos partes para posteriores estudios.

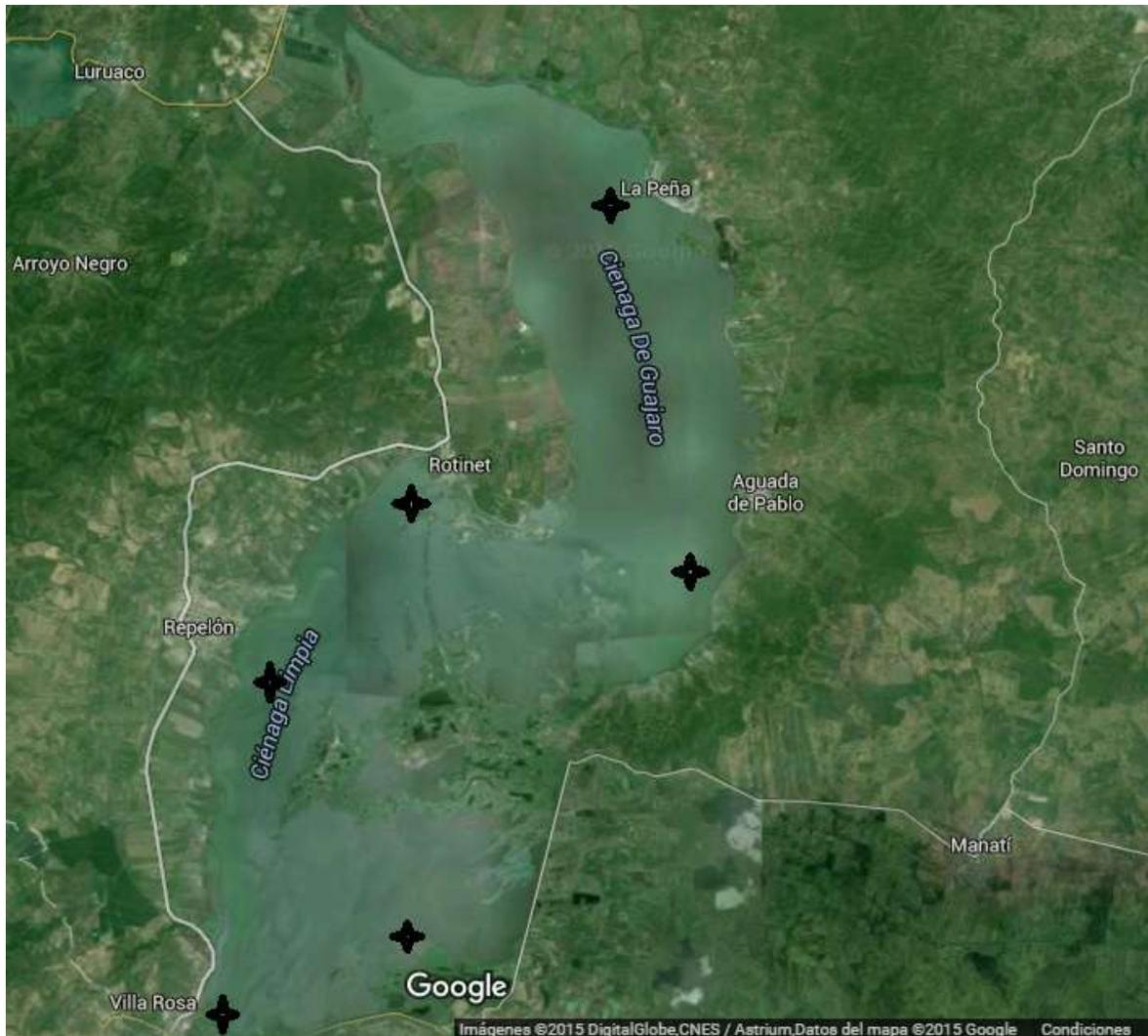


Figura 2. Puntos de muestreo en el embalse El Guájaro.

Una de las sub-muestra será preservada con solución de formaldehído al 5% a fin de llevar la identificación por medio de técnicas de microscopia.

Las muestras para cultivo, se almacenarán en botellas de polietileno y serán trasferidos al laboratorio, refrigerado y en condiciones de oscuridad. Una vez en el laboratorio las muestras preservadas y frescas serán examinadas usando un microscopio invertido, complementado con microscopia electrónica de rastreo. La identificación de las cianobacterias se realizará siguiendo claves específicas de Komárek y Anagnostidis (1999), Cyanoprocariotas (Chroococcales 1999, Oscillatoriales 2005), y las establecidas por Bicudo y Menezes (2006), en las que se tienen en cuenta las características morfológicas de las células (colonial,

unicelular o filamentosa), la presencia o no de mucílago y de estructuras especializadas (vesículas de gas, aquinetos, heterocistes y necridios), la forma celular (redonda, oval, alargada), color (verde-azul, verde oliva, rojo, amarillo, marrón) y tamaño celular (grande, mediano, pequeño).

5.2 Aislamiento de cultivos puros

Una vez en el laboratorio, se filtran 300 mL de agua con un filtro de 0,2 μm , Whatman GF/C y parte de los filtros serán almacenados a -20°C (Kormas, K. et al., 2011).

Para iniciar los cultivos, parte de los filtros se divide en tercios y se colocan en medio BMW y se deja crecer durante quince días. Las cepas son aisladas usando el método tradicional *ad hoc*, el cual consiste en realizar diluciones seriadas, centrifugaciones secuenciales, y rayados en platos de agar, hasta obtener las cepas puras. Una vez la estirpe crece bien en medio agarizado se siembran esas colonias en medio de cultivo líquido, en frascos de 150 cm^3 (los experimentos se harán en aquellos cultivos donde solo se encuentre un morfotipo).

Los cultivos serán mantenidos en matraces con tapa ventilada, incubados a 20°C con una irradiancia de $\pm 20 \mu\text{M m}^{-1}\text{s}^{-1}$ provista por lámparas de luz blanca (con fotoperíodo de 16/8 h) y aireación. El estimado de biomasa se llevará a cabo teniendo en cuenta el número de campos contados de una cámara de Neubauer de 1/10mm de profundidad de acuerdo al método de Sournia (1978) todo por triplicado.

5.3. Preparación de extractos de cianobacterias

Para la preparación de los extractos, se tomarán los medios de cultivo en fase exponencial y se someterán a centrifugación (3.000 rpm). Se utilizarán diferentes fraccionamiento se realizará desde los solventes más polares hasta menos polares probando en agua, etanol y hexano. Cada extracto será llevado a

sequedad y luego utilizado para preparar las soluciones que serán empleadas en la caracterización mediante HPLC-Masas.

6. RESULTADOS

- Se seleccionaron 5 estaciones de muestreos en el embalse El Guájaro, basados en la distribución de las jaulas flotantes, una muestra de la compuerta Villa Rosa, con conexión al Canal del Dique y una muestra final en la zona conocida como La Playa, donde se han reportado escaso crecimiento de peces en jaulas asociado posiblemente a Cianobacterias según los pescadores artesanales locales. Dentro de la estación se tomaron muestras en la zona de almacenamiento de agua para los estanques y en las piscinas donde se encuentra los padrotes de reproducción.
- Se realizaron cuatro salidas de campo con el objetivo de obtener las muestras, basados en la metodología propuesta y se obtuvieron datos *in situ* de parámetros fisicoquímicos de interés, para posteriormente simular estas condiciones a nivel de laboratorio.

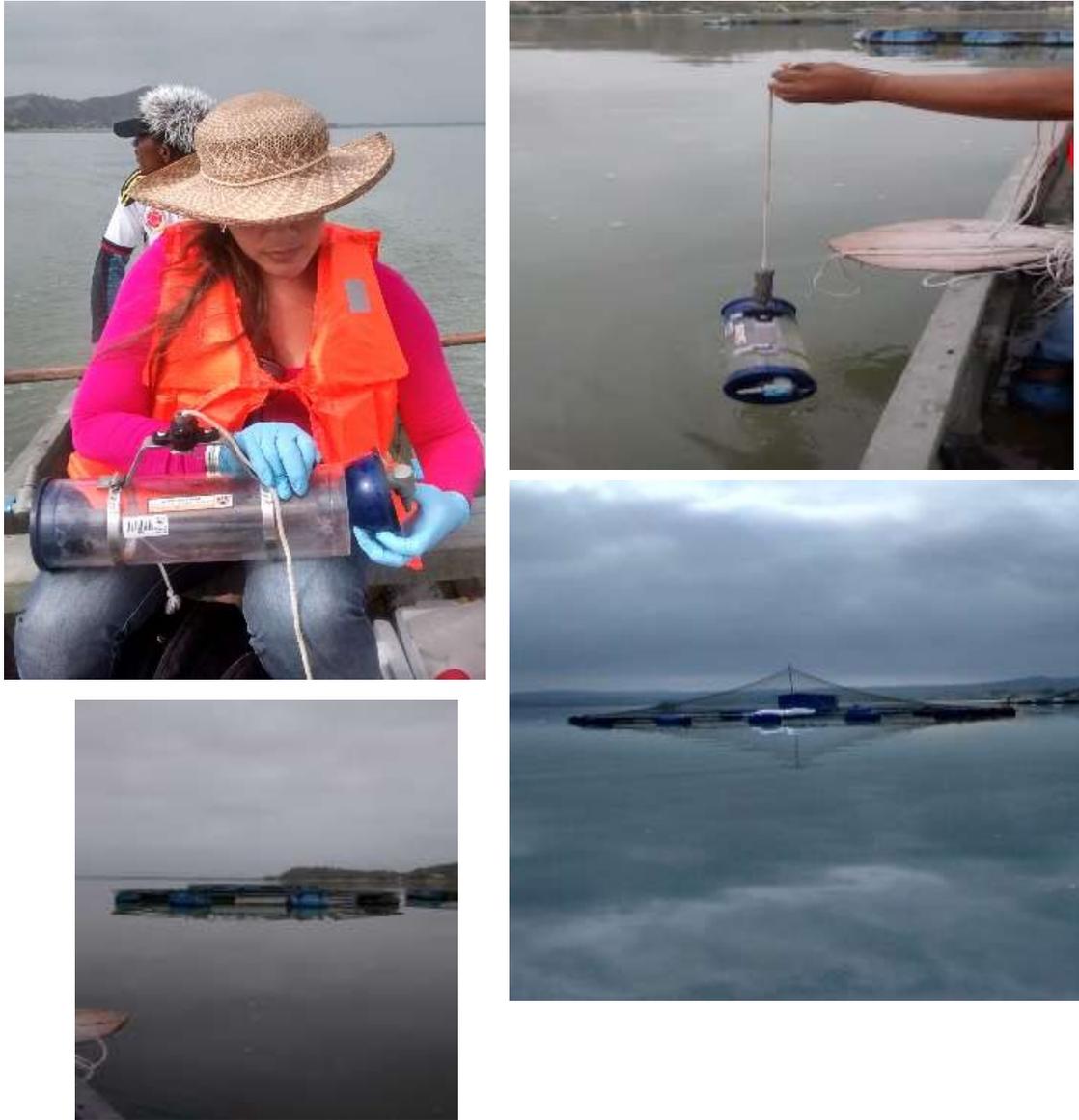


Figura 3. Toma de muestra superficial con Botella Van Dor.

Se procedió a estimular inicialmente el crecimiento en medio líquido generalizado por 24 horas, y luego se diseñó una mezcla de medio sólido Agar-Agar con medio líquido especial para cianobacterias BG-11. Este experimento se realiza con la finalidad de estimular un crecimiento mayor en platos para posterior purificación de cepas.

Luego de 7 días de crecimiento generalizado en platos, se ha procedido a realizar repiques con el objetivo de seguir purificando cepas, hasta obtener especímenes individuales y no colonias combinadas.



Figura 4. Sistema de crecimiento indiferenciado

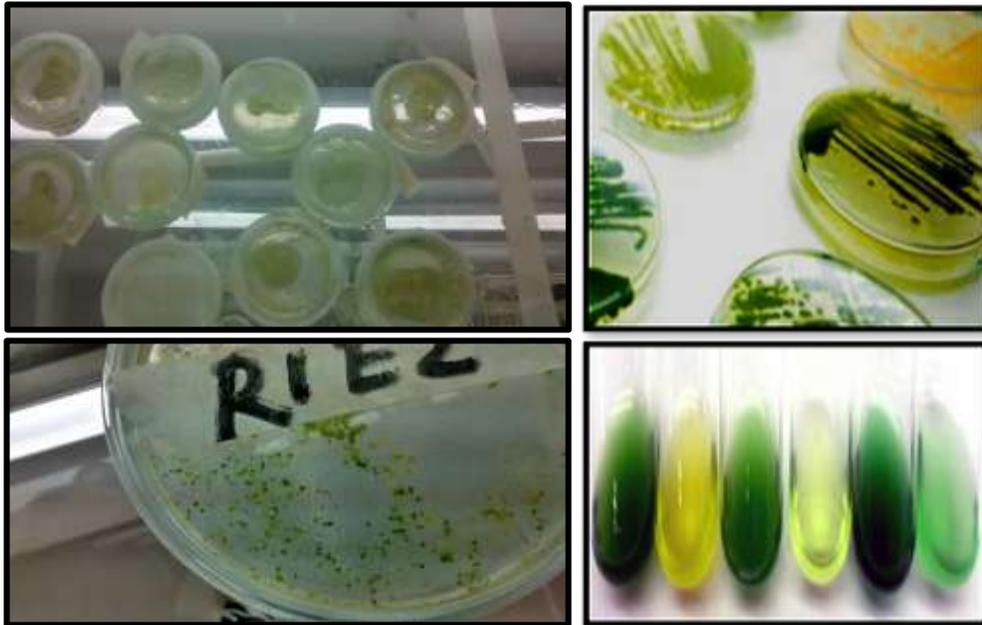


Figura 5. Sistema de purificación "at hot" sembrado en platos y tubos.

Lo que se buscaba es establecer sistemas de cultivos axenicos, en fase exponencial de crecimiento. La contaminación podría llevar a la no caracterización de las toxinas presentes o a falsos análogos de las mismas. Una vez lograda la obtención de monocultivos, se pasó a masificar los cultivos llevándolos a Erlenmeyer con volúmenes de 250 ml (Figura 6).



Figura 6. Crecimiento de cepas puras en medio liquido BG-11.

Listado de especies cultivadas como monocultivo.

Hasta el momento se han logrado identificar 8 especies, sin embargo nos encontramos aun en el proceso de reconocimiento de algunas especies, por lo que se recurrirá técnicas moleculares. Las especies aisladas y purificadas fueron las siguientes:

Microcystis aeruginosa .

Microcystis flos-aquae

Chroococcus minutus

Aphanocapsa grevillei

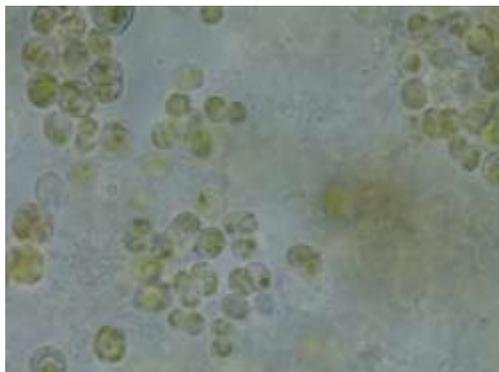
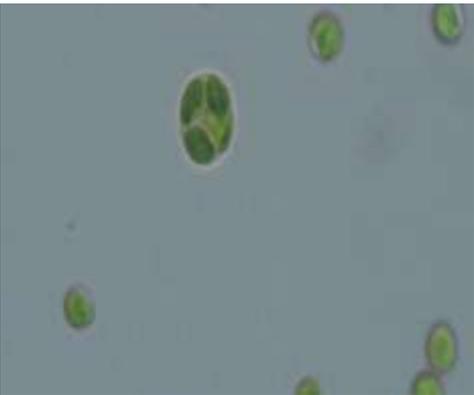
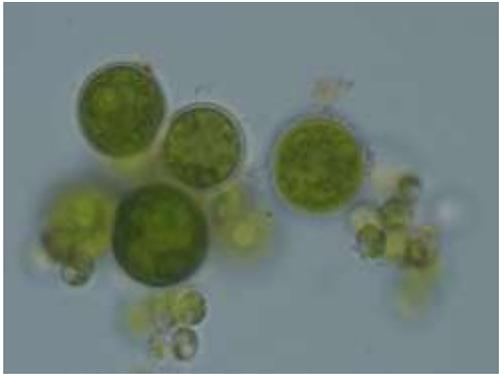
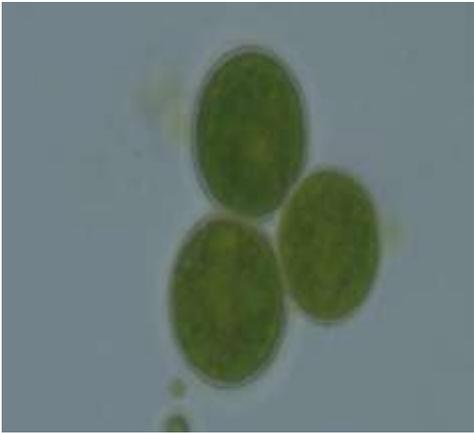
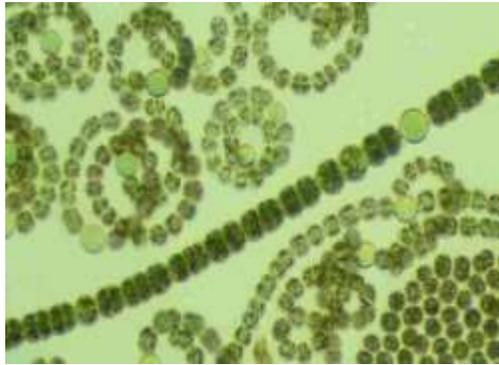
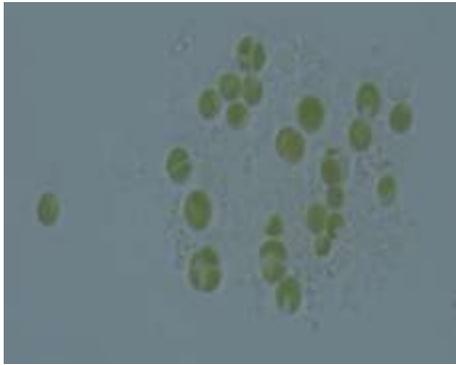
Coelosphaerium kuetzingianum

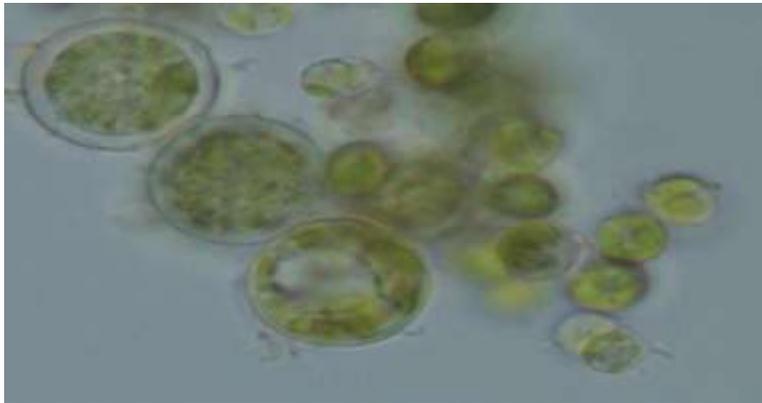
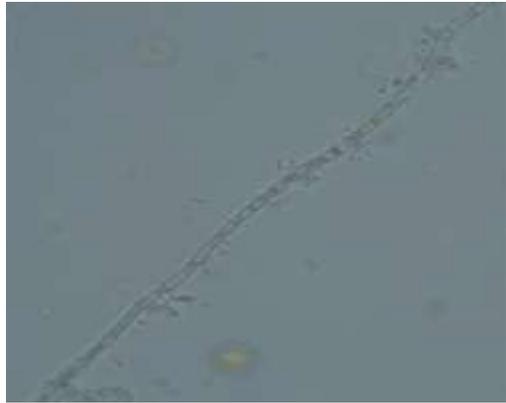
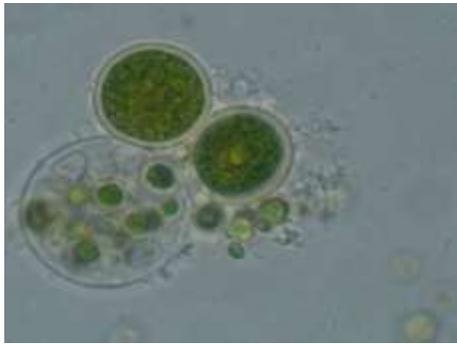
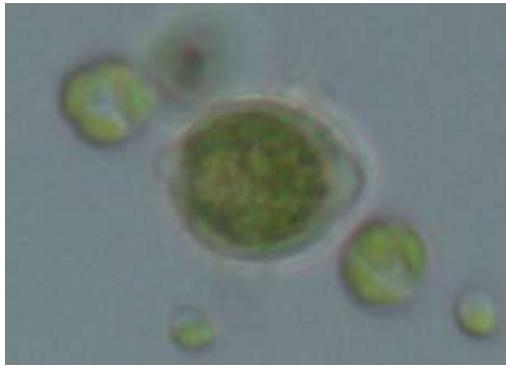
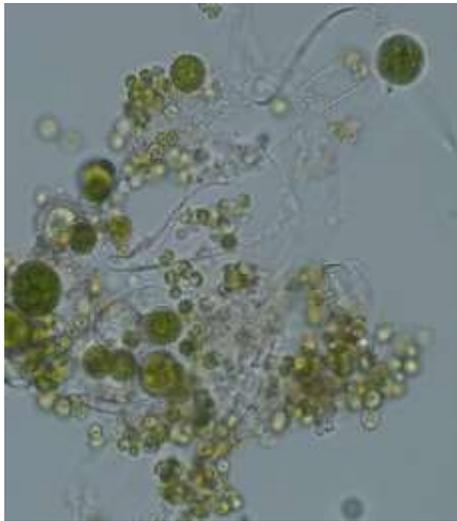
Anabaena sp.

Anabaena aphanizomenoides

Cylindrospermopsis raciborskii







CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta lo anterior, los organismos encontrados y las características que la literatura destaca en ellos y su adaptación a la contaminación se observa lo siguiente. El Embalse del Guájaro presenta los siguientes problemas: Descarga de aguas servidas de los municipios y corregimientos circundantes, la disposición de basuras en el área de influencia. La caza y la pesca indiscriminada, el control de insectos con agroquímicos, especialmente la descarga de plaguicidas organoclorados, la deforestación de las laderas aledañas al embalse. También actúan como fuente de contaminación las aguas provenientes del Canal del Dique, dado que llegan con un alto contenido de sólidos. La zona llamada "Las Compuertas" al mantenerse cerrada altera la condición natural del embalse, esto impide el lavado de la sal acumulada, se corta el equilibrio biológico de las especies migratorias y no se permite la salida de sedimentos. El arrastre de sólidos provenientes de las canteras de material triturado, la falta de una educación ambiental en la comunidad, entre otros.

En la estación La Peña el promedio obtenido para el parámetro de pH fue de 8,63, para la temperatura el promedio fue de 34,03°C, el promedio de conductividad fue de 1244,97 $\mu\text{s}/\text{cm}$ y el oxígeno disuelto es de 6,36 mg O₂ /L. La estación de Rotinet presenta un promedio de pH de 8,02, la temperatura 32,43o C, la conductividad 934,42 $\mu\text{s}/\text{cm}$ y el oxígeno disuelto 2,92 mg O₂ /L.

La mayor proporción de familias encontradas corresponde a Microcystaceae con 29 %, luego un 14,09 % Chroococcus y con un Oscillatoriaceae 6,6 %.

Aplicación de los índices de diversidad de Shannon y Hill

Al aplicar los índices de diversidad de Shannon y Hill se quería establecer los criterios de estructura y dominancia entre los cuerpos de agua del Departamento se presenta como resultado una alta contaminación y condiciones de dudosa calidad con pocas diversidades de organismos y escasa heterogeneidad en su presencia.

7. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, G.L.; Boyd, W.A.; Williams, P.L. 2004. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. Environ. Toxicol. Chem., 20, 833–838.

APHA, AWWA WEF. 1998. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20 th edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA

Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. 2002 Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicology 181-182: 441-446.

Bicudo, C. 2006. Capítulo 5: Cyanophyceae/Cyanobacteria. En Bicudo C. Menezes M. (Eds.), Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil. São Carlo, Brasil (pp. 58-95). Ed. RIMA.

Bláha L, Babica P, Marsalek B. Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and riss, Intedisciplinary Toxicicology. 2009: 2 (2): 36-41. Doi: 10.2478/v102-009-0006-2.

Boyd W, McBride S, Rice J, Snyder D, Freedman J. 2010. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *C. elegans* reproduction assay. Toxicol Appl Pharmacol 245(2):153-159

Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 77: 71–94. (PMC free article) .

Briand J.F, Jacquet S, Bernard C, J.F Humbert. 2003. Health hazard for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. Vet Res. 34: 361-377.

Caraballo G.P.2009. Efecto de la tilapia *Oreochromis niloticus* sobre la production pesquera del embalse El Guájaro, Atlántico-Colombia. Revista MVZ Córdoba, 14(3) 1796-1802. http://www.Scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttexpid=S0122.

Carmichael W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*. 72:445-459.

Castenholz R.W and T.B Norris. 2005. Revisionary concepts of species in the cyanobacterial and their applications. *Arch Hydrobiol Algal Stud*. 117:53-69.

Cheng Z; Tian, H; Chu H; Wu J; Li Y; Wang Y. 2014. The effect of tributyltin chloride on *Caenorhabditis elegans* germline is mediated by a conserved DNA damage checkpoint pathway. *Toxicol Lett* 225(3):413-421

Chorus I. 2001. Cyanotoxin occurrence in freshwaters-a summary of survey results from different countries. En: Chorus I (Ed.) *Cyanotoxins*. Berlin. Umweltbundesamt. 75-82.

Chorus, I and J. Bartram. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London.

Cood G.A, Morrison L,F, J. Metcalf . 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection, *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203: 264-272.

De Magalhães V, Soares R, Azevedo S. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39: 1077-1085.

Dimitriadi M, Hart. A. 2010. Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Disease* 40(1):4-11

Duy T.N; Lam K.S; Shaw G.R; D.W Connell. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2000;163:113–186.

Eiler A., Bertilson, S. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial Bloom in four Swedish lakes. *Environ.Microbial*. 6. 1228-1243.

Eiler A., Bertilson, S. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial Bloom in four Swedish lakes. *Environ.Microbial*. 6. 1228-1243.

Galli, M. & van den Heuvel, S. 2008. Determination of the Cleavage Plane in Early *C. elegans* Embryos. *Annu. Rev. Genet.*, 42: 389–411.

Garsin D.A, Villanueva J.M, Begún J, Kim D.H, Sifri C.D, Calderwood S.B, Runvkun G; F, Ausubel. 2003. Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science*. 300:1921.

Gupta, N.,Pant, S.C., Vijayarahavan, R., Rao, P. 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variant (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, 188. 285-296.

Herranz, S., Marazuela, M.D., Moreno-Bondi, M.C. 2011. *Biosens. Bioelectron*. 33:50-55.doi:10.1016/j.bios.2011.12.016.

Hisbergues M; Christiansen, G; Rouhiainen, L.; Sivonen, K & T. Börner. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology*, 180, 402-410

Hitzfeld BC, Lampert CS, Spaeth N, Mountfort D, Kaspar H, Dietrich DR. 2000. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Toxicon* 38:1731-1748.

Höss S, Haitzer M, Traunspurger W, Steinberg C. 2009. Growth and fertility of *C. elegans* (nematoda) in unpolluted freshwater sediments: Response to particle size distribution and organic content. *Environ Toxicol Chem* 18(12):2921–2925.

Hotto A.M, Satchwell, M; and G.L. Boyer. 2007. Molecular characterization of potential microcystin producing cyanobacteria in Lake Ontario embayments and nearshore waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(14), 4570-4578.

Hughes S.E; Evason K, Xiong C, K. Kornfeld. 2007. Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes. *PLoS Genet*. 3: 25.

Hurtado-Alarcon J.C, J. Polonia-Vorenberg. 2014. Técnicas para la detección de cianobacterias en los embalses Riogrande II y la Fe, Colombia. *Revista de Biología Tropical* [en línea]. Vol. 62. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44931382029> ISSN 0034-7744

Jingjuan Ju, Nadine Saul, Cindy Kochan, Anke Putschew, Yuepu Pu, Lihong Yin and Christian E. W. Steinberg. 2014. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11, 4589-4606; doi:10.3390/ijerph110504589

Kirivanta ,K; Sivonen K; Lathi K, Luke K; and S, Niemella 1991. Production and biodegradation toxins of cyanobacterial toxic. *Arch Hydrobiol*. 121: 281-294.

Komárek J, Anagnostidis K. *Cyanoprokaryota 1: Chroococcales*. 1998. En: Ettl H, Gartner HG, Heynig H, Mollenhauer D, editores. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Heidelberg & Berlín: Spektrum Akademischer Verlag.

Kormas K.A., Gkelis S., Vardaka E., Moustaka-Gouni M. 2011. Morphological and molecular analysis of bloom-forming cyanobacteria in two eutrophic, shallow Mediterranean lakes. *Limnologia* 41: 167-173.

Lawton LA, Codd GA. 1991. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins and their significance in UK and European waters. *J Indus. Waste Manag Eval Model* 5: 460-465.

Li, L., Xie, P., Chen, J., 2005. In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp injected with extracted microcystins. *Toxicon* 46, 533–545.

Mankiewicz J, Tarczyska M, Fladmark KE, Doskeland S, Walter Z, Zalewski M. 2001. Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environ Toxicol*, 16: 225-233.

Moreno I, Repetto R, Cameán AM. 2003. Interés toxicológico de las microcistinas. *Rev Toxicol*, 20:159-165.

Moreno, I., Pichardo, S., Jose, A., Gómez-Amores, L, Mate, A., Vásquez, C. M., Camean, A.M. 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol*, 45: 395-402.

Moustaka-Gouni, M., Kormas, K.A., Vardaka, E., Katsiapi, M., Gkelis, S. 2009. *Raphidiopsis mediterranea* SKUJA represents non-heterocystous life cycle stages of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosznska) Seenaya et Subba Raju in Lake Kastoria (Greece) its type locality, evidence by morphological and phylogenetic analysis. *Harmful Algae* 8, 864-872.

Necchi, O. Jr., Ribeiro, M. y Goes, M. 1991. Macroalgae of a stream in south eastern Brazil. *Hydrobiology*, 213: 241-250.

Nübel, U., F. Garcia y G. Muyzer. 1997. PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Appl Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332

Porfirio, Z., Ribeiro, M.P., Estevam, C.S., Houly, R.L.S., Sant'Ana, A.E.G., 1999. Hepatosplenomegally caused by an extract of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* bloom collected in the Manguaba Lagoon, Alagoas—Brazil. *Rev. Microbiol.* 30, 278–285

Prieto A., A, Puerto M, Pichardo S, Moreno y Cameán A. 2008. Efectos tóxicos producidos por las microcistinas en peces. *Rev. Toxicol.* 25: 22-31.

Sivonen K, Jones G. 1999. Cyanobacterial Toxins. En: Chorus, I, Bartram, M J (Ed.) *Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* London. E & FN Spon. 41-111.

Sournia A. 1978. Phytoplankton Manual. UNESCO. 120pp.

Vaitomaa J; Rantala A; Halinen K; Rouhiainen L, Tallberg P; Mokolke L and K. Sivonen. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy number for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 7289-7297.

Wiegand C, Pflugmacher S. 2004. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol Appl. Pharmacol* 203: 201-218.

Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas E. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of Microcystins in freshwater environments. *J Toxicol Environ Health B* 8: 1-37.

Zwar, G., Kamst-van-Agterverld M.P., van der Werff-Staverman, I., Hagen, F., Hoogveld, H.L., Gons, H.J. 2005. Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environ. Microbiol.* 7. 365-377.