

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CIANOBACTERIAS POTENCIALMENTE  
TÓXICAS EN EL EMBALSE GATÚN EN PANAMÁ

KATHERINE LINETT GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL  
GRADO DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

Javier Sánchez-Guillén, Profesor del programa de maestría de Microbiología Ambiental de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: KATHERINE GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondientes a su Tesis de Maestría, con el título: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CIANOBACTERIAS POTENCIALMENTE TÓXICAS EN EL EMBALSE GATÚN EN PANAMÁ.

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente replicado en Panamá el 20 de mayo de 2022.

## DEDICATORIA

Para todos aquellos que quieren conocer, aprender y cuidar el medio ambiente y la salud a través de las cianobacterias.

A mi abuelo (que en paz descanse), a mis familiares, profesores, amigos, compañeros que han aportado a mi crecimiento personal y profesional, con mucho cariño para ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por la fuerza, perseverancia y la luz que siempre me acompaña.

Agradezco a mi familia, amigos, compañeros por el apoyo y entusiasmo para poder cumplir esta meta.

A mi asesor el Dr. Javier Sánchez-Guillén, a mi asesora la Mgt. Marisela Castillo por sus orientaciones y consejos para el desarrollo de la investigación.

A la secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) y en la Universidad de Panamá por acogerme como estudiante del programa de maestría en Microbiología Ambiental y su apoyo económico a través del convenio de colaboración educativa entre SENACYT-UP N°68-2017.

A la Autoridad del Canal de Panamá especialmente a la Dra. Marilyn Diéguez, al Departamento de Calidad de Agua en Miraflores y Corozal por proporcionar la oportunidad de formar parte de su equipo, conocer y apoyar en la ejecución de mi trabajo final.

A Abdiel Del Cid, Enrique Rodríguez, Carlos De León, Lumir Calvo, Isaac Barría, Manuel González, Eric Álvarez, Adán Zurita, Marietta Ng, Víctor Bazán, Dorian Barría por enseñarme los procedimientos y responder todas mis dudas, indispensables para la ejecución de este trabajo.

Agradezco a los verdaderos amigos que me acompañaron en este proceso, especialmente a Kathleen, Génesis, Evelyn y Marlon por estar siempre presentes.

A todas las personas que, de alguna manera, me ayudaron y que, por error, olvidé mencionar.

<b>Capítulos</b>	<b>Página</b>
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice General.....	vi
Índice de Cuadros.....	x
Índice de Figuras.....	xi
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>6</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Generalidades de las Cianobacterias .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Antecedentes .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Afloramientos de Cianobacterias .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1 Definición .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2 Factores que influyen en los Afloramientos de Cianobacterias.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.2.1 Temperatura.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.2.2 Radiación Solar.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2.3 pH.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2.4 Condiciones Hidráulicas de los Cuerpos de Agua .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.2.5 Disponibilidad de nutrientes .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3 Efectos de los Afloramientos de Cianobacterias .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.3.1 Aspectos Antiestético y Disminución de la Transparencia .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.3.2 Aumento de la Demanda Bioquímica de Oxígeno.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.3.3. Presencia de Microorganismos Patógenos.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.3.4 Producción de Toxinas.....</b>	<b>30</b>

1.3. Microcistinas .....	33
1.4. Preocupación en Suministros de agua .....	38
1.4.1 Peligros para la salud humana .....	39
1.4.2 Contacto directo recreacional.....	39
1.4.3 Exposición alimentaria .....	40
1.5. Métodos de detección de cianobacterias (microcistinas) en agua.....	41
1.5.1 Microscopía .....	41
1.5.2 Métodos basados en anticuerpos y actividad enzimática.....	42
1.5.3 Métodos Moleculares .....	42
1.6. Cianobacterias en Panamá .....	44

## CAPÍTULO II

METODOLOGÍA.....	46
2.1 Área de estudio .....	47
2.1.1 Embalse Gatún.....	47
2.2 Sitios de muestreos.....	48
2.2.1 Tomas de agua.....	48
2.3 Técnicas de muestreo y procedimientos de análisis .....	50
2.3.1 Procedimiento de análisis fisicoquímicos.....	50
2.3.1.1 Clorofila.....	50
2.3.1.2 Turbiedad .....	51
2.3.1.3 Alcalinidad .....	51
2.3.1.4 Medición del pH .....	51
2.3.1.5 Nitratos y Nitritos .....	52
2.3.1.6 Fosfato.....	52
2.3.1.7 Sulfato.....	52
2.3.2 Procedimiento de análisis Molecular.....	53
2.3.2.1 Extracción y purificación del ADN .....	53
2.3.2.2 Cuantificación de muestras de ADN con Biofotómetro.....	54
2.3.2.3 Amplificación del ADN.....	54
2.3.2.2 Electroforesis .....	55
2.3.3 Procedimiento de Análisis Serológico .....	56
2.3.3.1 Prueba de Microcistina-DM ELISA.....	56

## CAPÍTULO III

<b>RESULTADOS</b> .....	57
<b>3.1 Modelo de regresión logístico binario para el modelo general</b> .....	58
<b>3.2 Estadística descriptiva de la presencia de los genes <i>mcyB</i> y <i>mcyE</i> en el Embalse Gatún</b> .....	60
<b>3.2.1 Genes presentes en el Embalse Gatún</b> .....	60
<b>3.2.2 Distribución mensual de los Genes en el Embalse Gatún</b> .....	60
<b>3.2.3 Análisis descriptivo de las variables asociadas a la presencia de las Cianobacterias</b> .....	61
<b>3.3 Correlaciones de las variables asociadas a la presencia de las cianobacterias</b> ..	62
<b>3.4 Matriz de dispersión de las variables asociadas a la presencia de las cianobacterias.</b> .....	64

## CAPÍTULO IV

<b>DISCUSIÓN</b> .....	65
<b>4.1 Análisis General de la presencia de los genes <i>mcyB</i> y <i>mcyE</i> en el embalse Gatún</b> .....	66
<b>4.2 Análisis de la distribución mensual de los Genes <i>mcyB</i> y <i>mcyE</i> en el Embalse Gatún</b> .....	66
<b>4.3 Análisis de los factores ambientales asociados a la presencia de los genes de cianobacterias</b> .....	68
<b>4.3.1 Nitritos</b> .....	68
<b>4.3.2 Nitratos</b> .....	68
<b>4.3.3 Fosfato</b> .....	69
<b>4.3.4 Sulfatos</b> .....	70
<b>4.3.5 pH</b> .....	70
<b>4.3.6 Temperatura</b> .....	71
<b>4.3.7 Clorofila</b> .....	71
<b>4.3.8 Eficiencia fotosintética (YLD)</b> .....	72
<b>4.3.9 Turbiedad</b> .....	72
<b>4.3.10 Alcalinidad</b> .....	73
<b>4.3.11 Microcistinas</b> .....	73
<b>4.4 Análisis de las correlaciones y matriz de dispersión asociadas a la presencia de los genes</b> .....	74

## **CAPÍTULO V**

<b>CONCLUSIONES</b> .....	78
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	80
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	82
<b>ANEXOS</b> .....	98

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Ocurrencia de MMA en varias especies de cianobacterias.....	19
<b>Cuadro 2.</b> Efectos ecológicos de los afloramientos frecuentes o persistentes de cianobacterias.....	29
<b>Cuadro 3.</b> Relación entre estructura y toxicidad de algunas Microcistinas.....	36
<b>Cuadro 4.</b> Estaciones de Calidad de Agua en el Embalse Gatún.....	48
<b>Cuadro 5.</b> Métodos analíticos empleados según parámetros de calidad del agua.....	53
<b>Cuadro 6.</b> Codificación de la variable dependiente genes <i>mcyB</i> y <i>mcyE</i> en el modelo de regresión logístico binario.....	58
<b>Cuadro 7.</b> Variables en la ecuación del modelo de regresión logístico binario.....	59
<b>Cuadro 8.</b> Variables para incluir en la ecuación del modelo de regresión logístico binario.....	59
<b>Cuadro 9.</b> Análisis descriptivo de las variables fisicoquímicas asociadas a la presencia de cianobacterias.....	62
<b>Cuadro 10.</b> Análisis de correlaciones de las variables asociadas a la presencia de las cianobacterias.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales factores que determinan los afloramientos de cianobacterias y sus efectos sobre los sistemas acuáticos.....	12
<b>Figura 2.</b> Un modelo propuesto de las respuestas de estrés UV-B a largo plazo en cianobacterias.....	15
<b>Figura 3.</b> Modelo conceptual de los factores ambientales que controlan la dinámica de un afloramiento de cianobacterias.....	24
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la Microcistina.....	37
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la ruta biosintética de Microcistina.....	43
<b>Figura 6.</b> Mapa de los sitios de muestreos del Embalse Gatún.....	49
<b>Figura 7.</b> Extracción de ADN utilizando el kit comercial Dneasy Plant Handbook (Qiagen).....	54
<b>Figura 8.</b> Procedimiento del Ensayo de Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (kit Abraxis).....	56
<b>Figura 9.</b> Presencia de los genes <i>mcyB</i> y <i>mcyE</i> en el Embalse Gatún en Panamá.....	60
<b>Figura 10.</b> Distribución mensual de la presencia de los genes <i>mcyB</i> y <i>mcyE</i> en el Embalse Gatún desde mayo 2019-Febrero 2020.....	61
<b>Figura 11.</b> Dispersión Matricial de las variables asociadas a la presencia de las cianobacterias.....	64
<b>Figura 12.</b> Sitios de muestreos en el embalse Gatún. ....	99
<b>Figura 13.</b> Potabilizadoras que son abastecidas por el embalse Gatún.....	100
<b>Figura 14.</b> Resumen del análisis molecular de las muestras del embalse Gatún.....	100
<b>Figura 15.</b> Resumen del análisis fisicoquímico de las muestras del embalse Gatún.....	101
<b>Figura 16.</b> Colecta de la muestra en toma de agua.....	101
<b>Figura 17.</b> Análisis <i>in situ</i> utilizando sonda multiparamétrica.....	102
<b>Figura 18.</b> Muestras colectadas de los sitios de muestreos.....	102
<b>Figura 19.</b> Medición de la clorofila.....	103
<b>Figuras 20.</b> Análisis de Nitratos en muestras de agua.....	103
<b>Figura 21.</b> Análisis de Nitritos en muestras de agua.....	104

<b>Figura 22.</b> Filtración de las muestras de agua.....	104
<b>Figura 23.</b> Extracción de ADN utilizando el kit comercial Dneasy Plant Handbook (Qiagen).....	105
<b>Figura 24.</b> Muestras colocadas en el termociclador para su amplificación.....	105
<b>Figura 25.</b> Muestras siendo cargadas en los pocillos para su electroforesis.....	106
<b>Figura 26.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2%.....	106
<b>Figura 27.</b> Electroforesis de genes de cianobacterias potencialmente tóxicos en gel de agarosa.....	107
<b>Figura 28.</b> Niveles de agua del Embalse Gatún durante el año 2019.....	107

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>ACP</b>	Autoridad del Canal de Panamá
<b>ALC</b>	Alcalinidad
<b>BCI</b>	Barro Colorado
<b>CHL</b>	Clorofila
<b>DC1</b>	GAMBOA
<b>ESC</b>	Escobal
<b>Fic</b>	Ficocianina
<b>LAT</b>	Laguna Alta
<b>Máx</b>	Máximo
<b>MC</b>	Microcistina
<b>mg</b>	Miligramo
<b>Mín</b>	Mínimo
<b>MINSA</b>	Ministerio de Salud
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>FIC:CHL</b>	Relación ficocianina-clorofila
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Fosfato

<b>SM</b>	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater por sus siglas en inglés que significan Métodos Estándar para el Análisis de Agua y Agua residual
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Sulfatos
<b>T</b>	Temperatura
<b>TAC</b>	Toma de agua Cuipo
<b>TAS</b>	Toma de agua Sabanitas
<b>TME</b>	Toma de Agua de Mendoza
<b>TMH</b>	Toma de Agua de Monte Esperanza
<b>TMR</b>	Toma de Agua de Paraíso
<b>Turb</b>	Turbiedad
<b>YLD</b>	Eficiencia fotosintética

## RESUMEN

Las cianobacterias son organismos procariotas, autótrofos. Algunas especies tienen la capacidad de producir toxinas como estrategia de defensa. La exposición a estas toxinas puede provocar irritación, cáncer e inclusive muerte. En Panamá, existe la identificación taxonómica de cianobacterias y la cuantificación de sus toxinas. Sin embargo, mediante estos métodos es imposible conocer su potencial de producción de toxinas. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo identificar la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas, mediante técnicas de biología molecular en muestras de agua provenientes del embalse Gatún. Es importante señalar que este embalse abastece a 5 potabilizadoras de la República de Panamá, representando un 33.5% de la población panameña que utilizan estas aguas para su consumo diario. Se realizó la toma de muestras en nueve puntos dentro del embalse Gatún y las muestras fueron analizadas mediante la amplificación del ADN en un PCR convencional utilizando los cebadores *McyB*, *McyE* y ficocianina. Se realizó un modelo de regresión logístico binario para el modelo general de la investigación. Se analizó un total de 90 muestras de agua cruda provenientes del embalse y se encontró un 59% de genes detectados. Registrándose los niveles más bajos de presencia de genes durante los meses de mayo (22.2%), junio y octubre (0%). Se encontraron correlaciones significativas entre algunas variables analizadas. Determinando que existen múltiples factores que pueden afectar o beneficiar la proliferación de las cianobacterias. Sin embargo, durante el estudio a pesar de encontrar los genes productores de toxinas en el embalse, estos no están expresando las toxinas en el agua.

**Palabras claves:** cianobacteria, embalse, agua cruda, toxinas, cebadores.

## SUMMARY

Cyanobacteria are prokaryotic organisms, autotrophs. Some species have the ability to produce toxins as a defense mechanism. The contact with these toxins can cause skin irritation, cancer or even death. In Panama, we can find the taxonomic identification of cyanobacteria and the quantification of their toxins. However, through these methods it is impossible to know their potential production of toxins. Therefore, the objective of this study is to identify the presence of potentially toxic cyanobacterias through molecular biology techniques used in water samples coming from Gatun reservoir. It is important to point out that this reservoir supplies 5 water purification plants in the Republic of Panama, which represents the 33.5% of the panamanian population that consume this water daily. The samples were taken in nine different areas of the Gatun reservoir, and these samples were analyzed using the DNA amplification in a conventional PCR using the primers McyB, McyE and phycocyanin. The technique used in this study was a logistic regression model for the general model investigation. There were 90 samples of raw water analyzed that came from this reservoir, in which 59 % of genes were detected. The lowest level of gene presences were registered during the months of May (22.2%), June and October (0%). Significant correlations were found among some analyzed variables. This determines that there exist multiple factors that can affect or benefit the spreading of cyanobacterias. Even though there were productives genes found in the reservoir during this study, these are not spreading the toxins in the water.

**Key Words:** cyanobacteria, reservoir, raw water, toxins, primers.

## INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son procariontes que poseen características comunes con otras bacterias y también con algas eucariotas, lo que las hace únicas en cuanto a su fisiología, tolerancia a condiciones extremas y flexibilidad adaptativa. No poseen membrana nuclear, pueden realizar fotosíntesis y producir oxígeno (Madigan *et al.*, 2000).

Las cianobacterias presentan algunas características que las hacen dominar sobre otros grupos de fitoplancton, algunas de estas son: condiciones de poca luz y pueden mantener una tasa de crecimiento relativamente mayor que el resto de los organismos presentes en el agua (Chorus y Bartram, 1999).

Cuando las condiciones ambientales no son favorables para las cianobacterias, algunos organismos sobreviven durante largos periodos de tiempo (incluso años) como colonias de células vegetativas depositadas en el sedimento, y pueden actuar como iniciadores de nuevos afloramientos cuando las condiciones mejoran (Reynolds *et al.*, 1981).

Algunas cianobacterias pueden producir unas toxinas denominadas cianotoxinas, las cuales provocan enfermedades en humanos y afectan las características organolépticas del agua (Meichtry *et al.*, 2009). Las cianotoxinas que con mayor frecuencia se reportan son las hepatotoxinas que incluyen las microcistinas, nodularinas y cilindrospermopsinas (Sivonen y Jones 1999)., seguidas de las neurotoxinas, dentro de las cuales están la anatoxina-a, anatoxina-a(S) y saxitoxinas (O'Neil *et al.*, 2012).

El abastecimiento de agua potable con calidad para el consumo humano es fundamental para prevenir diversos tipos de enfermedades, tanto del tracto digestivo como otras asociadas a la ingesta de aguas contaminadas (Sánchez, 2020). Entre los efectos reportados por la literatura al ingerir agua contaminada con estas toxinas, se tienen síntomas agudos como la gastroenteritis, fiebre e irritación de la garganta y sistema respiratorio; también se reportan efectos crónicos que incluyen la formación de tumores y la cirrosis no alcohólica, incluso la muerte (WHO, 2015).

A través del tiempo, las normas internacionales de calidad de agua para consumo humano se han basado en características físicas, químicas, biológicas y radiológicas. Sin embargo, en Panamá el único requisito, en cuanto a cianobacterias y algas, contenido en el reglamento técnico vigente de calidad de agua potable (*Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 21-2019 Tecnología de los Alimentos. Agua Potable. Definiciones y Requisitos Generales*) es que el valor de la Microcistina LR en agua para consumo humano sea igual o menor a una concentración de 0.001 mg/L. Panamá ha registrado casos de afloramientos de cianobacterias en aguas del embalse Gatún en años anteriores (Jones, 1992), pero no está del todo documentado.

El embalse (Gatún), utilizado para este estudio, es un gran lago artificial localizado en las provincias de Colón, Panamá Oeste y Panamá. Es clave para el tránsito de barcos a través del Canal de Panamá. y abastece a 5 potabilizadoras, lo cual representa un 33.5% de la población panameña que consume estas aguas. Por tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar los factores ambientales asociados con la presencia de los genes *McyB* y *McyE* en muestras de agua cruda proveniente del embalse Gatún en Panamá. Además de identificar la presencia de genes (*McyB* y

*McyE*) involucrados en la biosíntesis de microcistinas, para lo cual se empleó un análisis molecular mediante una PCR convencional y análisis fisicoquímicos.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar los factores ambientales asociados con la presencia de los genes *mcyB* y *mcyE* en muestras de agua cruda proveniente del embalse Gatún en Panamá.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la presencia de genes (*mcyB* y *mcyE*) involucrados en la biosíntesis de microcistinas en el embalse Gatún, mediante técnicas moleculares.
- Describir los parámetros fisicoquímicos (temperatura, clorofila, turbiedad, alcalinidad, pH,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) y la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas.
- Evaluar la asociación entre la clorofila y algunas variables ambientales (temperatura, pH,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ).

### HIPÓTESIS

Las cianobacterias potencialmente tóxicas están presentes en las muestras analizadas en el embalse Gatún en Panamá.

## FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

## **1. Generalidades de las Cianobacterias**

### **1.1. Antecedentes**

Las cianobacterias son uno de los grupos biológicos más antiguos del planeta, su origen se conoce desde la época precámbrica y se les reconoce como los primeros organismos fotosintéticos en colonizar nuestro planeta (Bekker *et al.*, 2004), dando origen a la atmósfera oxidante que hoy conocemos (Komárek, 2008). Por ser procariontes tienen características comunes con las bacterias, es decir, carecen de un verdadero núcleo. También poseen características comunes con las algas, ya que son capaces de realizar fotosíntesis con producción de oxígeno. Las cianobacterias son un grupo único en cuanto a su fisiología y tolerancia a condiciones extremas, flexibilidad adaptativa, plasticidad morfológica y ecológica (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Castenholz y Waterbury, 1989). Sin embargo, a pesar de tener características fotosintéticas similares a las algas eucariotas y plantas superiores, su organización estructural y bioquímica se aproxima más a las bacterias (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Contienen pigmentos, pueden ser unicelulares, formar colonias micro y macroscópicas, al igual que generar filamentos rectos o ramificados (Almanza *et al.*, 2016).

Las variaciones en los pigmentos dependerán de su metabolismo y de factores fisicoquímicos como la luz, temperatura, nutrientes, etc. Entre los principales pigmentos presentes en la cianobacterias se encuentran la clorofila a, b, c y d y carotenoides como los carotenos y xantofila (Castillo, 2015). La clorofila a es un pigmento que tiene la capacidad de capturar parte de la radiación solar para realizar los procesos que ocurren durante la fotosíntesis (Almanza *et al.*, 2016). Como

estrategia ante la limitación de luz solar las cianobacterias poseen ficobiliproteínas o ficobilinas, una serie de pigmentos asociados a la clorofila a, dentro de los que se incluyen la aloficocianina y la ficocianina que son de coloración azul y la ficoeritrina cuyo color es el rojo. Estos pigmentos les permiten absorber luz en las regiones con longitud de onda asociadas a las coloraciones verde, amarilla y naranja del espectro (500 - 650 nm), radiaciones que no pueden ser usadas por otras especies fitoplanctónicas (Daniel *et al.*, 1994; Raps *et al.*, 1985). Las ficobilinas sólo se encuentran en las cianobacterias y en dos grupos de algas eucariotas: las criptófitas y rodófitas (Castillo, 2015). Los carotenoides glicosídicos también son un grupo exclusivo de las cianobacterias, cuya función principal es proteger a las cianobacterias de las altas intensidades lumínicas. Los carotenoides glicosídicos actúan como antioxidantes al desviar el flujo de electrones en exceso, evitando así que los fotosistemas sufran daño (Edge *et al.*, 1997)

Las cianobacterias habitan en casi todos los ambientes acuáticos desde charcas, lagos, embalses, agua dulce, salobre o marina, al igual que en ambientes terrestres (OMS, 1999). Algunas especies son capaces de sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas, como en desiertos, aguas termales y lagos alcalinos (Morvan *et al.*, 1997; Oren, 2000).

Además de los procesos metabólicos citados en los párrafos anteriores, para asegurar su sobrevivencia las cianobacterias han desarrollado gran variedad de mecanismos adaptativos en términos bioquímicos, físicos y bióticos, que les permiten dominar bajo condiciones de elevado estrés ambiental (Comba, 2009). Los mecanismos adaptativos incluyen estrategias cuando hay limitaciones lumínicas; entre estos mecanismos

encontramos: (i) la fijación de nitrógeno, (ii) el almacenamiento de nutrientes y de metabolitos esenciales en su citoplasma, (iii) la producción de mucílagos para prevenir la desecación y promover la movilidad por deslizamiento, (iv) la presencia de vesículas de gas para regular la flotabilidad y (v) la captura de metales del medio como Fe y Cu con estructuras especializadas llamadas sideróforos (Paerl, 1994).

Estos microorganismos, también se caracterizan por presentar un buen balance energético, por lo que requieren de poca energía para el funcionamiento de sus células, lo cual les confiere cierta ventaja, en especial en aquellos cuerpos de agua con alto grado de turbidez, ya sea por crecimiento de otros organismos planctónicos, o por el aporte continuo de sedimentos (Fay, 1992).

Los recientes avances en cultivo celular e ingeniería genética han abierto múltiples posibilidades para el potencial uso biotecnológico de las cianobacterias. Por ejemplo: (i) producción de exopolisacáridos y floculantes para el tratamiento de aguas residuales, (ii) metabolitos secundarios con propiedades para el control y erradicación de virus, bacterias, hongos, malaria y diversos fines terapéuticos, (iii) obtención de suplementos alimenticios y recientemente para la (iv) obtención de biocombustibles y/o generación de energía eléctrica (Sharma *et al.*, 2011; Sarma *et al.*, 2016).

Sin embargo, ciertos grupos de cianobacterias pueden producir metabolitos secundarios nocivos o tóxicos llamados cianotoxinas (Svrcek y Smith, 2004; UNESCO, 2009). En términos ecológicos, algunas cianotoxinas actúan como sustancias alelopáticas que afectan el desarrollo del fitoplancton y de las plantas acuáticas (Evangelista *et al.*, 2008). Por otra parte, en cuanto a la salud pública, las cianotoxinas

pueden causar efectos adversos que van desde reacciones alérgicas cutáneas hasta provocar la muerte en algunos casos.

## **1.2 Afloramientos de Cianobacterias**

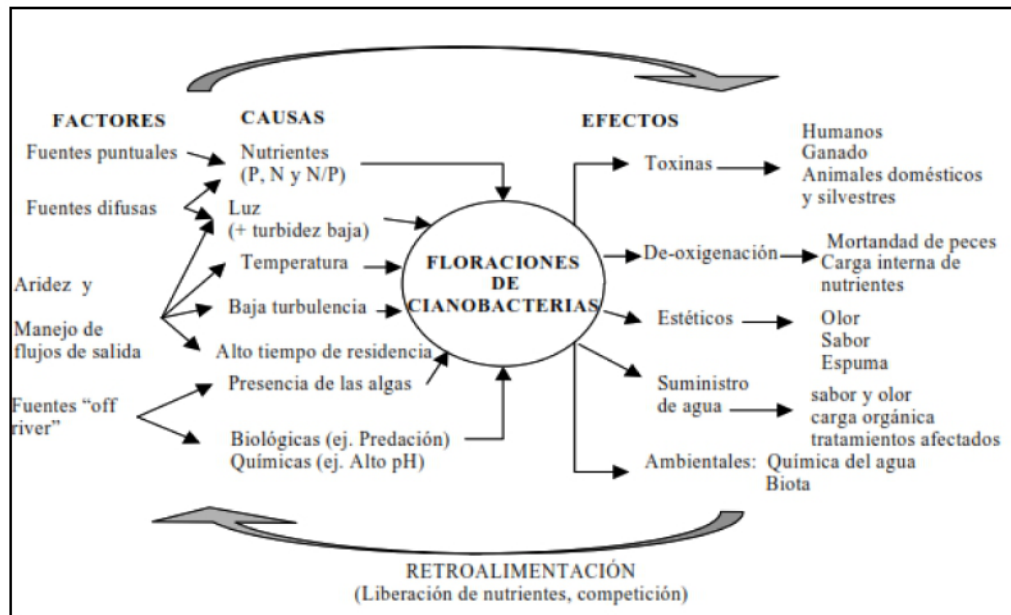
### **1.2.1 Definición**

Un afloramiento ocurre cuando la biomasa de las cianobacterias aumenta significativamente con respecto a su densidad inicial hasta hacerse predominantes en el ecosistema acuático (Salomón *et al.*, 2020). El fenómeno de afloramiento puede producirse de manera natural, generándose en períodos que van desde pocas horas a varios días y desaparecer en un plazo similar (Mora y Ruíz, 2012). Sin embargo, algunos afloramientos de cianobacterias pueden permanecer por períodos más largos como todo el verano, durante el año entero o incluso de forma permanente (Bonilla, 2009). En cualquier año o estación, los cuerpos de agua individuales pueden tener sus propias poblaciones de cianobacterias, y el dominio de una o varias especies dependerá no solo del clima sino también de condiciones geoquímicas específicas del propio cuerpo de agua (Paerl y Huisman, 2009).

Sin embargo, los afloramientos de cianobacterias son más frecuentes en aguas que han sufrido intervenciones humanas a partir de: (i) fuentes puntuales, por ejemplo, las descargas de aguas residuales, (ii) fuentes no puntuales como lo son las escorrentías provenientes de las actividades agrícolas o (iii) por la creación de embalses artificiales (Ramírez *et al.*, 2005). Además, el afloramiento de las cianobacterias está asociado con altas concentraciones de nutrientes y otros factores que se exponen a continuación (Chorus y Bartram, 1999).

### 1.2.2 Factores que influyen en los Afloramientos de Cianobacterias

Aunque los eventos de afloramiento de cianobacterias se reportan desde hace más de 130 años atrás, estos han aumentado en las últimas décadas (O'Neil *et al.*, 2012). Se ha documentado que los afloramientos son influenciados por múltiples factores. Dentro de los principales factores se encuentran: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) radiación solar, (iv) modificaciones en la dinámica hidráulica de los ecosistemas y (v) disponibilidad de nutrientes (Runnegar *et al.*, 1993; Dawson, 1998; Salomón *et al.*, 2020); Figura 1. Todos estos factores son potenciados por los efectos del cambio climático global que influyen directamente en la frecuencia, intensidad y duración de los afloramientos (Paerl y Huisman, 2009).



**Figura 1.** Principales factores que determinan los afloramientos de cianobacterias y sus efectos sobre los sistemas acuáticos. Fuente: modificado de Watanabe *et al.*, 1995.

### 1.2.2.1 Temperatura

La temperatura es un factor crucial que afecta la composición de la comunidad de cianobacterias; generalmente se observa un mayor número de células en las estaciones más cálidas (Izaguirre *et al.*, 2015). Hay evidencias de que el calentamiento global se relaciona con el aumento de casos de afloramientos de cianobacterias (Sukenik *et al.*, 2012).

El aumento de la temperatura del agua por encima de los 20 °C favorece el desarrollo de las cianobacterias, ya que incrementa las tasas de crecimiento y de reproducción celular (Reynolds, 2006). De hecho, Reynolds y Wlasby (1975) afirman que la temperatura óptima para el surgimiento de afloramientos se encuentra en el rango de 25 °C a 35 °C. Sin embargo, excepcionalmente *Microcystis aeruginosa* es citada como una especie que desarrolla afloramientos en ambientes con temperaturas menores a los 20 °C (Parra *et al.*, 1986).

Otro efecto del aumento de la temperatura está relacionado con la estratificación de la columna de agua (De León, 2002). Existe una relación directa entre la temperatura y la estratificación de la columna de agua, es así como al incrementarse la temperatura en las capas superiores se forma un gradiente vertical de densidad que resulta en la estratificación de la columna de agua (Huber *et al.*, 2012). Esta correlación se ha visto también con otros factores ambientales, y se puede afirmar que las altas temperaturas no serían en sí la causa de un afloramiento, sino que estarían asociadas con otros fenómenos como la estratificación térmica y cambios en la profundidad de la zona de mezcla, lo que puede favorecer el desarrollo de cianobacterias con vesículas de gas (Rosso y Giannuzi, 2017).

Estos efectos se podrían ver potenciados en el contexto del cambio climático global, que al presentarse situaciones extremas de luz y temperatura se consigue la supervivencia y permanencia de las microalgas en los cuerpos de agua (Rosso y Giannuzi, 2017).

Por otro lado, las temperaturas más altas disminuyen la viscosidad del agua, lo que a su vez aumenta la difusión de nutrientes hacia la superficie de la célula, favoreciendo el desarrollo de algas (Peperzak, 2003).

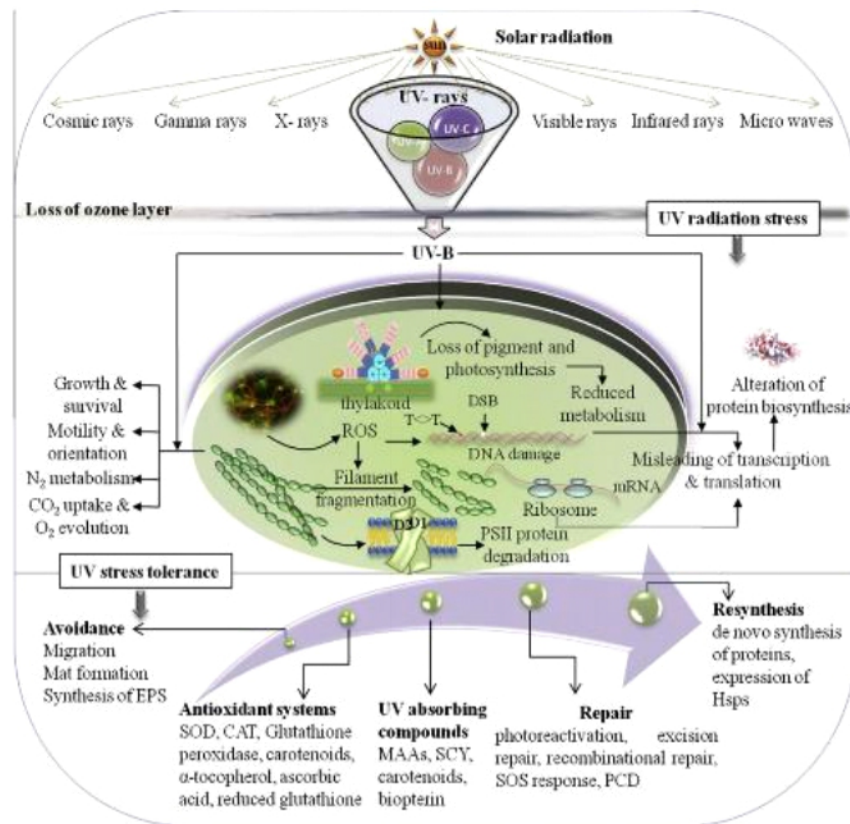
### **1.2.2.2 Radiación Solar**

La radiación ultravioleta solar (RUV) causada por el continuo agotamiento del escudo de ozono estratosférico ha alimentado serias preocupaciones sobre las consecuencias ecológicas para todos los organismos, incluidas las cianobacterias (Gao *et al.*, 2008). La radiación UV-B puede dañar el ADN celular, además de varios factores fisiológicos y procesos bioquímicos en células de cianobacterias. Estos daños pueden darse directamente, a través de su interacción con ciertas biomoléculas que absorben en el rango UV, o indirectamente, mediante estrés oxidativo (Kumar *et al.*, 2003). Sin embargo, las cianobacterias tienen una larga historia de supervivencia en la Tierra y son anteriores a la existencia del actual escudo de ozono (Sinha y Hader, 1998).

La UV-B solar afecta las estructuras de ADN y proteínas de las cianobacterias, su pigmentación y varias actividades metabólicas clave, incluida la fotosíntesis, la fijación de N<sub>2</sub>, la absorción de CO<sub>2</sub>, la actividad de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), la morfología celular, crecimiento, supervivencia y flotabilidad (Sinha *et al.*, 1996). Sin embargo, las cianobacterias no están indefensas,

tienen una variedad de mecanismos para hacer frente a los efectos dañinos de la RUV (Sinha *et al.*, 1995).

Las diferentes especies de cianobacterias varían ampliamente en su tolerancia a la RUV. Han adquirido una variedad de estrategias de defensa que les permitan sobrevivir y crecer en ambientes adversos con altos flujos UV-B (Fig. 2). Han desarrollado una serie de estrategias de defensa, incluida la evitación, producción de antioxidantes, reparación del ADN, resíntesis de proteínas, muerte celular programada y síntesis de compuestos de detección/absorción de UV, como los aminoácidos similares a micosporinas (MAA) y la escitonemina (Wu *et al.*, 2005).



Fuente: Rastogi *et al.*, 2014

**Figura 2.** Modelo propuesto de las respuestas de estrés UV-B a largo plazo en cianobacterias.

- **Evitación**

Como primera línea de defensa contra la RUV solar elevada en sus hábitats naturales con mucha luz, varias cianobacterias han desarrollado mecanismos de evasión, como la migración de niveles altos a bajos de RUV, formación de esteras, transformación morfológica y la síntesis de polisacáridos extracelulares (EPS). Los patrones de migración hacia arriba y hacia abajo de las cianobacterias pueden estar estrechamente relacionados con los cambios diarios en la intensidad de la luz incidente (Rastogi *et al.*, 2014).

Las especies móviles de cianobacterias pueden moverse más profundamente en la columna de agua para escapar de los altos niveles de UV (Vaara, 1982). Existe alguna evidencia de que la radiación UV-A y/o UV-B de baja intensidad actúa como una señal que controla la migración vertical (Bhaya, 2004). La cianobacteria *Microcoleus chthonoplastastes* en las alfombras microbianas del lago Sinaí, Egipto, muestra la mayor incidencia de migración en respuesta a UV-B en comparación con UV-A o radiación fotosintéticamente activa (Bebout y Garcia-Piche, 1995).

- **Sistemas antioxidantes enzimáticos/no enzimáticos**

Según Rastogi *et al.*, 2014, las cianobacterias han desarrollado ciertos mecanismos de protección que permiten el uso óptimo de la energía de la luz capturada mientras evitan el daño oxidativo de la formación de especies reactivas de Oxígeno (ROS) potencialmente dañinas, incluyendo el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el radical hidroperoxilo (HO<sub>2</sub>), y el radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>), inducido por alta irradiación.

Para contrarrestar este estrés oxidativo, las cianobacterias han desarrollado complejos sistemas antioxidantes basados en secuestrantes de bajo peso molecular y enzimas específicamente adaptadas como segunda línea de defensa contra la RUV. Estos mecanismos incluyen: el superóxido dismutasa (SOD), antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, el fotosintético catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y las enzimas involucradas en el ciclo ascorbato-glutatión, como el ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa, deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa (GR), que son los principales antioxidantes enzimáticos; carotenoides,  $\alpha$ -tocoferoles ( $\alpha$ -TOC; vitamina E), ácido ascórbico (ASA; vitamina C) y glutatión reducido que son antioxidantes no enzimáticos.

Ha habido una serie de estudios significativos que investigan el papel de las enzimas antioxidantes en varios organismos, pero aún se carece de información sobre las defensas antioxidantes inducidas por UV-B en las cianobacterias.

- **Síntesis de polisacáridos extracelulares (EPS)**

Los EPS cianobacterianos son generalmente heteropolisacáridos de masa molecular alta con composiciones y funciones erráticas sobre el microorganismo y las condiciones ambientales. La síntesis de EPS es también una estrategia importante utilizada para evitar la alta intensidad RUV. La producción de EPS varía entre diferentes especies/cepas de cianobacterias, e incluso una sola cepa puede producir diferentes tipos de EPS en diferentes etapas de crecimiento (Nicolaus *et al.*, 1999).

Organismos que tienen capas exteriores extremadamente gruesas de EPS pueden soportar mejor altos niveles de radiación solar y condiciones desecantes (Jürgens y Mäntele, 1991).

- **Síntesis de compuestos de detección/absorción de UV**

Una propiedad interesante de varias cianobacterias es su capacidad para superar la toxicidad de los rayos ultravioleta mediante filtros/absorción de rayos ultravioleta compuestos como una tercera línea de defensa (Singh *et al.*, 2010). Micosporinas/MAA (aminoácidos similares a microsporina) y SCY (escitonemina) son fotoprotectores destacados que actúan contra los rayos UV-B y/o radiación UV-A. Se han identificado micosporinas/MAA en organismos taxonómicamente diversos, incluyendo bacterias heterótrofas, líquenes, cianobacterias, hongos, micro/macroalgas y varios animales. La presencia de MAA en animales superiores se puede atribuir ya sea a su ingestión a través de la cadena alimentaria o a la síntesis de MAA por socios de algas simbióticas. A diferencia de los MAA, SCY es producido predominantemente por cianobacterias (Rastogi *et al.*, 2014).

- **Micosporinas y MAA**

Las micosporinas y los MAA son compuestos pequeños (<400 Da), incoloros, solubles en agua compuestos por un cromóforo de ciclohexenona o ciclohexenina conjugado con el sustituyente nitrógeno de un aminoácido o su imino alcohol (Rastogi *et al.*, 2004).

Shibata informó por primera vez la acumulación de grandes cantidades de MAA en cianobacterias (Shibata, 1969). Hasta la fecha, una serie de cianobacterias se ha informado que producen diferentes MAA en diversos hábitats (Cuadro 1). La eficacia

fotoprotectora de los MAA depende de su posición dentro de la celda. Los MAA disipan eficazmente la radiación absorbida en forma de calor, sin producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Conde *et al.*, 2000). Impiden tres de cada 10 fotones de golpear objetivos citoplasmáticos en cianobacterias (Gacia *et al.*, 1993), y hay pruebas claras de que las MAA protegen a varias funciones vitales en el fitoplancton de los efectos de la dañina radiación de longitud de onda corta (Klish *et al.*, 2001). Los MAA también pueden bloquear la formación de Dímeros de timina inducidos por UV (Misonou *et al.*, 2003).

**Cuadro 1. Ocurrencia de MMA en varias especies de cianobacterias**

Organismos	MG como	ES	—	SH	—	E-362	M2G	M-tau	DL	M-343
Anabaena sp.				+						
Aulosira fertilissima			+	+						
Aphanothece halophytica				+	+					
Aphanizomenon.flosaquae			+							
Calothrix sp.	+	+		+						
Clorogloeopsis sp.	+	+		+						
diplocolon sp.	+									
Euhalothece sp.						+	+			
Gloeocapsa sp.	+	+	+	+						
Gloeothece sp.	+									
Lyngbya aestuarii		+		+						
Microcystis aeruginosa			+	+						
Microcoleus chthonoplastes				+						
Nodularia sp.			+	+						
Nostoc commune	+			+						
Nostoc harveyana			+	+						
Phormidium tenue				+						
Nostoc spumigena			+	+						
Scytonema sp.	+			+						
Synechococcus sp.	+									
Synechocystis sp. CCP 6803										+++ [200]

[M: aminoácidos de tipo micosporina; MG: micosporina-glicina; AS: asterina-330; PL: palitino; PR: porphyra-334; SH: shinorina; PE: paliteno; E362: euhalothece-362; M2G: micosporina-2-glicina; M-tau: micosporina-tau; DL: dehidroxilujireno].

Fuente: Rastogi *et al.*, 2014

- **Escitonemina**

SCY es el más extendido y ampliamente caracterizado pigmento protector solar y es producido exclusivamente por cianobacterias. Es un compuesto dimérico de color marrón amarillento, soluble en lípidos, compuesto de subunidades indólicas y

fenólicas, con una masa molecular de 544 Da. SCY fue identificado por primera vez por Nägeli en varias cianobacterias terrestres (Bultel-Poncé *et al.*, 2004). El compuesto se encuentra en las capas de EPS de algunas cianobacterias, donde actúa como filtro solar pasivo para proteger contra la RUV (Rastrogi *et al.*, 2014).

SCY permite que las cianobacterias sobrevivan a radiación la letal UV-A/B en ambientes con intensa luz del sol (Sinha *et al.*, 1999). SCY es muy estable y detecta sin ninguna inversión metabólica adicional, incluso después de una actividad fisiológica prolongada. Por lo tanto, es un compuesto adecuado para defender a las cianobacterias frente a los rayos UV cuando otros mecanismos de protección serían necesarios (Jones *et al.*, 2011).

- **Expresión de proteínas de choque térmico (Hsps)**

Las Hsp son una clase de proteínas de estrés general que desempeñan un papel importante en las funciones celulares normales y en la supervivencia celular en varias condiciones de estrés, incluida la RUV (Vershchooten *et al.*, 2006). Se supone que la expresión de Hsps en respuesta a RUV es parte de la respuesta UV endógena. Las Hsp aumentan la resistencia de la célula al estrés al influir en los mecanismos de reparación del ADN o en la inducción de la apoptosis (Torok *et al.*, 2001).

Las Hsp pequeñas tienen actividad protectora de proteínas y la capacidad de estabilizar las membranas lipídicas (Horváth *et al.*, 1998), y son ubicuas en el mundo biológico. Existe alguna evidencia de que las interacciones físicas entre Hsp pequeñas y proteínas de membrana/membrana de tilacoides en cianobacterias (Hossain *et al.*, 2003) confieren estabilidad ultraestructural a los tilacoides a altas temperaturas, luz intensa y bajo estrés oxidativo.

- **Reparación y resíntesis de ADN y proteínas dañadas en cianobacterias**

La reparación y resíntesis de biomoléculas dañadas por los rayos UV, como el ADN y las proteínas, son cruciales para que varios organismos, incluidas las cianobacterias, mantengan su estado normal. Varios mecanismos de reparación del ADN, incluida la foto reactivación, la reparación por escisión y la reparación por recombinación, funcionan para moderar la radiación inducida por la radiación ultravioleta.

Sin embargo, la incidencia de una vía de reparación particular dentro de la célula depende principalmente del tipo y la ubicación de la lesión en el genoma (Essers *et al.*, 2006).

### **1.2.2.3 pH**

La composición química de las aguas y los nutrientes disponibles determinan el estado de alcalinidad o acidez (Paerl, 1996). Fernandes *et al.*, (2009) afirma que el pH es otro de los factores involucrados en la formación de los afloramientos, considerando los valores alcalinos comprendidos entre un rango de 7,5–10 como aquellos de mayor relevancia.

Factores adicionales como la disminución en la concentración de carbono inorgánico disuelto en el agua con el consiguiente incremento del pH, también favorece el desarrollo de afloramientos (Mora y Ruíz, 2012). El incremento del pH también puede darse por las características naturales del sistema, por ejemplo, en aguas duras con altas concentraciones de carbonatos y/o bicarbonatos de calcio y magnesio, o por los efectos del crecimiento de la comunidad fitoplanctónica (Mora y Ruíz, 2012; Fang *et al.*, 2013). En este sentido, la incorporación del dióxido de carbono disuelto en el agua mediante la fotosíntesis determina un cambio en la concentración de iones debido a la

disminución del carbono disponible, un aumento del pH y una limitación para el crecimiento de muchas especies de algas, excepto las cianobacterias (Mora y Ruíz, 2012).

#### **1.2.2.4 Condiciones Hidráulicas de los Cuerpos de Agua**

La turbulencia de los cuerpos de agua, que generalmente está asociada a la presencia del viento, determina una disminución de la transparencia del agua por aumento de la turbidez, actuando como un factor controlador de los afloramientos, ya que ocasiona una reducción de la tasa de fotosíntesis y de la biomasa de cianobacterias (Rosso y Giannuzzi, 2017). Cuando la intensidad del viento ocasiona la mezcla de la columna de agua o cuando hay un bajo tiempo de residencia (< menor a 10 días), se impide la acumulación de las cianobacterias en la superficie y se favorece la resuspensión de los nutrientes (Malcuori, 2011). En embalses, la razón más importante de las variaciones de la turbiedad que afectan el crecimiento de las cianobacterias se debe al cambio de una estación a otra en el año (estación seca y lluviosa) (Castillo, 2015) y las tasas de renovación altas y movimiento de las aguas dentro del embalse que son utilizadas para generar agua de consumo (Rosso y Giannuzzi, 2017). Por otra parte, la distribución y ubicación de un afloramiento en un cuerpo de agua tiene relación con la dirección del viento antes y/o durante el acontecimiento (De León, 2002).

En los sistemas acuáticos con altos tiempos de residencia por ausencia de viento o baja turbulencia (velocidad del viento menor a 3 m/s), se acelera el proceso de sedimentación de las partículas, que pueden incluir a otras especies de algas, el agotamiento de los nutrientes, el aumento de la transparencia y la acumulación superficial de las cianobacterias (Rosso y Giannuzzi, 2017). En algunas situaciones

extremas de tiempos muy largos de residencia se produce la anoxia (ausencia de oxígeno) en los niveles más profundos y con ello la liberación de compuestos químicos reducidos desde el sedimento, constituyendo un incremento de la carga interna de nutrientes al sistema (Malcuori, 2011).

#### **1.2.2.5 Disponibilidad de nutrientes**

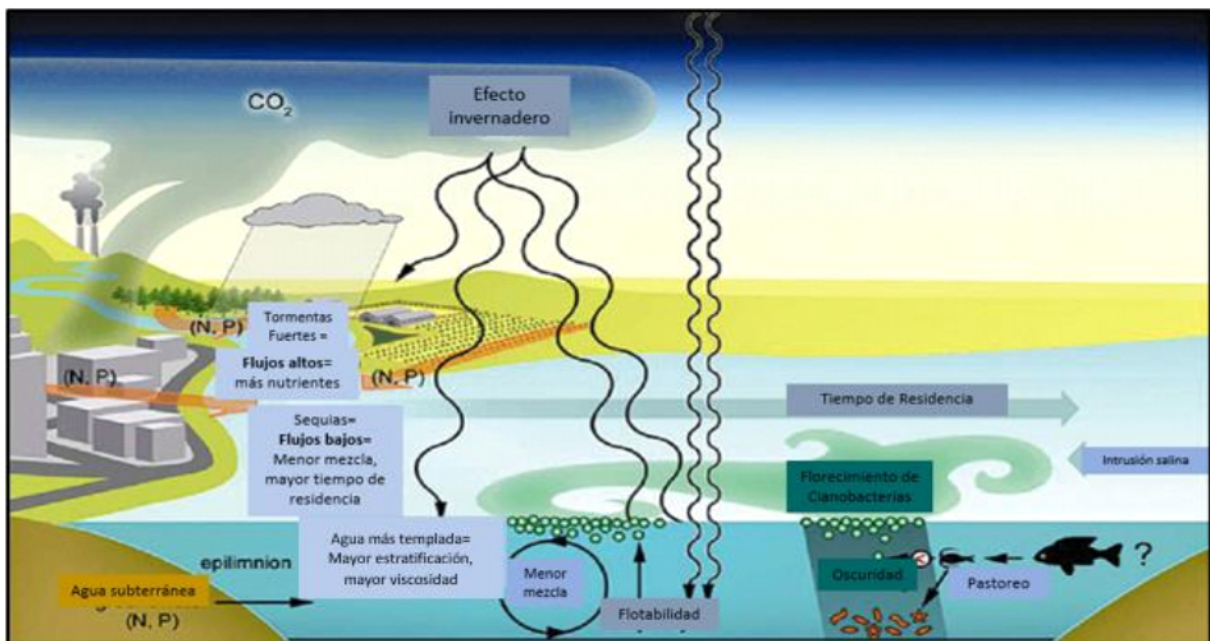
Distintos factores ambientales intervienen continuamente en el desarrollo de un ecosistema. Entre estos, la disponibilidad de nutrientes influye en el tipo de las poblaciones que se encuentran presentes y el número de individuos. En el caso de las cianobacterias, la disponibilidad de nutrientes marca una dependencia cualitativa y/o cuantitativa de la ultraestructura de estos organismos (Giannuzzi, 2018).

Según Rosso y Giannuzzi (2017) el protoplasma celular de las algas eucariotas y las cianobacterias requiere de aproximadamente 20 elementos químicos para la formación de la nueva biomasa, algunos de ellos necesarios en grandes cantidades (H, C, O y N) y otros en cantidades pequeñas (P, S, K, Na, Ca, Mg y Cl). Además, de acuerdo con la Unesco (2009), son requeridos en concentraciones traza un conjunto de nutrientes que intervienen en el metabolismo celular, como por ejemplo en la estructura de las enzimas (Si, Fe, Mn, Mo, Cu, Co, Zn, etc.). Por otra parte, de acuerdo con Li *et al.*, (2018), las cianobacterias también mantienen una correlación entre la tasa fotosintética y la concentración del ion sodio e influyen sobre la disponibilidad de carbonato en la limitación del tamaño de las poblaciones.

El enriquecimiento excesivo de nutrientes en las aguas superficiales, principalmente en fósforo (P) y nitrógeno (N), puede ocasionar el cambio de la estructura y

funcionamiento de los ecosistemas acuáticos y el deterioro de la calidad del agua (Quirós, 2004). En este sentido, la eutrofización es el proceso natural y/o antropogénico que consiste en el enriquecimiento de las aguas con nutrientes, a un ritmo tal que no puede ser compensado por la mineralización total, de manera que la descomposición del exceso de materia orgánica produce una disminución del oxígeno en las aguas profundas (Riolobos y Martínez, 1994). En un gran número de estudios se ha demostrado la relación entre los procesos de eutrofización y la frecuencia y magnitud de los eventos de afloramientos de cianobacterias (Jöhnk *et al.*, 2008).

El principal causante de eutrofización es el vertimiento directo de aguas enriquecidas provenientes de zonas urbanas o de actividades industriales y agropecuarias (Salomón *et al.*, 2020). El exceso de nutrientes en la cuenca y el clima pueden interactuar para potenciar los afloramientos (Salomón *et al.*, 2020); ver Figura 3.



**Figura 3.** Modelo conceptual de los factores ambientales que controlan la dinámica de un afloramiento de cianobacterias (Modificada de Paerl y Huisman, 2009).

Así, los eventos climáticos con precipitaciones intensas movilizan nutrientes desde la cuenca, los cuales enriquecen los cuerpos de agua y favorecen el desarrollo de afloramientos (Huisman *et al.*, 2018). Las sequías prolongadas disminuyen la carga de nutrientes por arrastre desde la cuenca, pero pueden promover condiciones para que estos sean reciclados desde el fondo del ecosistema (Salomón *et al.*, 2020). Los periodos prolongados con hipoxia en las capas de agua profundas favorecen la liberación de fósforo desde el sedimento, razón por la que, en lagos con historias de eutrofización, la reserva de nutrientes en los sedimentos puede mantener el afloramiento de algas y cianobacterias, aunque los vertimientos estén controlados (Zapata *et al.*, 2009). En lagos profundos, el crecimiento de las cianobacterias generalmente lleva a un agotamiento de las formas solubles de los nutrientes, por lo que estas acumulan en su biomasa los nutrientes y reducen la posibilidad de ser desplazadas por otros grupos de algas (Salomón *et al.*, 2020).

Entre los nutrientes, destacan principalmente los siguientes.

#### **a. Nitratos**

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico es generalmente considerada como una ventaja de las cianobacterias que utilizan esta fuente por sobre las algas eucariotas para crecer en ambientes pobres en nitrógeno (Rosso y Giannuzzi, 2017). Los nitratos suponen una fuente de nutrientes importante para estos organismos autótrofos (ACP, 2006). El nitrógeno puede ser obtenido del agua a través de la incorporación activa como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  (o nitrógeno inorgánico disuelto, NID). Dependiendo de la fuente de N, la fijación o asimilación puede requerir de varias etapas para reducirlo y

es por ello por lo que el  $\text{NH}_4^+$  es la fuente de nitrógeno energéticamente menos costosa de metabolizar (Arrigo, 2005).

Los nitratos pueden ser derivados del uso excesivo de fertilizantes y ocasionar una contaminación significativa en aguas superficiales y subterráneas. Una alta concentración de nitratos puede originar eutrofización, con un aumento en la población de estos organismos autótrofos que compiten por el oxígeno con otros organismos aerobios de mayor tamaño (ACP, 2006).

Basándose en el desarrollo de experimentos (Rosso y Giannuzzi, 2017), han propuesto la hipótesis de que la fuente de nitrógeno puede explicar la dominancia de las cianobacterias. De este modo las cianobacterias no fijadoras son favorecidas por el  $\text{NH}_4^+$ , en cambio cuando la fuente de nitrógeno es  $\text{NO}_3^-$  ocurre el desarrollo de fitoplancton eucariótico y la disponibilidad de nitrato determina las especies de cianobacterias que se vuelven dominantes (Chorus y Bartram, 1999). Finalmente, cuando hay escasez de nitrógeno predomina el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. La producción de Microcistina (MC) es también afectado por la velocidad de crecimiento celular (Scheurs, 1992).

#### **b. Fosfatos**

El fósforo generalmente está presente en las aguas naturales en forma de fosfatos (ACP, 2006). Los fosfatos pueden ser incorporados en los cuerpos de agua a partir de los fertilizantes y los detergentes que llegan estos con las escorrentías agrícolas, los desechos industriales y las descargas de aguas residuales (ACP, 2011). Su exceso en el agua provoca eutrofización, lo cual da como resultado el crecimiento de algas y

cianobacterias. Estas se reconocen con facilidad por formar capas de diversa coloración que pueden, eventualmente, cubrir la superficie del agua. Sin embargo, el fósforo es un componente esencial del metabolismo celular ya que forma enlaces de alta energía, se libera en reacciones enzimáticas y es un elemento en la estructura de las moléculas de los ácidos nucleicos y las membranas celulares (Rosso y Giannuzzi, 2017). El fósforo usualmente es el nutriente clave que controla la proliferación de algas y cianobacterias, aunque la disponibilidad de nitrógeno puede ser una variable importante por evaluar debido a que algunas cianobacterias pueden escapar de la limitación de nitrógeno al fijar el nitrógeno atmosférico (Chorus y Bartram, 1999). También, Paerl y Otten (2013) consideran que, aunque el fósforo es el principal nutriente limitante de la productividad primaria, tanto este como el nitrógeno pueden inducir afloramientos de algas. Las concentraciones elevadas de fósforo favorecen floraciones de géneros fijadores de nitrógeno, en tanto que los medios ricos en nitrógeno y fósforo favorecen a los géneros sin heterocistos (células especializadas fijadoras de nitrógeno formadas por la necesidad de nitrógeno por algunas cianobacterias filamentosas), por ejemplo, *Microcystis* y *Planktothrix*.

De acuerdo con De León (2012) el nitrógeno (N) y fósforo (P) son incorporados en una proporción molecular de 7N:1P. El exceso de alguno de ellos transforma al otro en un nutriente limitante para el crecimiento, de modo que sólo aquellas especies capaces de desarrollar determinadas estrategias podrán superar esa carencia y alcanzar densidades muy altas. Las cianobacterias poseen una gran capacidad de almacenamiento de fósforo, en algunos casos el fósforo almacenado les permite llevar

a cabo de 2 a 4 divisiones celulares, por lo que resultan ser enormemente competitivos en estos ambientes (Aubriot, 2008).

### **1.2.3 Efectos de los Afloramientos de Cianobacterias**

Durante los últimos años, algunos estudios han evidenciado el aumento progresivo de los problemas asociados con los afloramientos de cianobacterias (Ndlela, 2016).

#### **1.2.3.1 Aspectos Antiestético y Disminución de la Transparencia**

Los afloramientos de cianobacterias pueden ser evidentes a simple vista al observar la turbiedad que producen en el agua estos microorganismos, lo cual evita la penetración de la luz en los cuerpos hídricos (Pérez *et al.*, 2008). También por la presencia de coloraciones en el agua, como el verde, rojo, etc., también por acumulación de materia orgánica o franjas superficiales y densas de cianobacterias (Prosperi *et al.*, 2005). Entre otras consecuencias, esta apariencia antiestética provoca una disminución del valor recreativo de los cuerpos de agua (Dodds *et al.*, 2009). Además, cuando se desarrolla un afloramiento de cianobacterias la irradiación disminuye en la columna de agua, reduciendo el desarrollo de otros organismos productores que no pueden mantener su posición cercana a la superficie del agua; esto incluye a los organismos epífitos, algas bénticas y plantas vasculares con raíz (Aguilera *et al.*, 2011). Por lo tanto, en aquellos cuerpos de agua con afloramientos muy densos, especialmente los que son frecuentes o de larga duración, no presentan grandes poblaciones de otros organismos capaces de utilizar energía solar (Havens, 2008).

### 1.2.3.2 Aumento de la Demanda Bioquímica de Oxígeno

Los afloramientos de cianobacterias pueden ocasionar una gran demanda bioquímica de oxígeno y por consiguiente alterarán de forma adversa los ecosistemas hídricos (Beverdorsdorf *et al.*, 2015). En general los afloramientos, por su alta productividad primaria, consumen grandes cantidades de oxígeno durante la respiración lo que sumado a procesos de descomposición, sedimentación y degradación de la biomasa celular en el fondo agotan el oxígeno disponible creando condiciones que causan la muerte de algunos organismos acuáticos, en especial de peces que casi siempre son los más sensibles (Vanegas *et al.*, 2014).

En resumen, la disminución del oxígeno disuelto del agua causa cambios químicos y biológicos significativos, siendo los más importantes: (i) hipoxia, condición que ocurre a concentraciones de oxígeno disuelto menores a 2 mg/L donde la mayor parte de la fauna acuática se ve afectada, (ii) anoxia, que consiste en ausencia de oxígeno disuelto, lo cual es mortal para la mayoría peces y crustáceos, (iii) generación de sulfuro de hidrógeno tóxico y (iv) liberación acelerada de los nutrientes desde los sedimentos que agrava la eutrofización y el desarrollo de floraciones (Havens, 2008); ver Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Efectos ecológicos de los afloramientos frecuentes o persistentes de cianobacterias

Evento	Respuesta	Efecto
Desarrollo de los florecimientos	Disminución de la transparencia	Limitación de luz para las plantas acuáticas, los organismos epífitos, algas bénticas y fitoplancton
	Aumento del pH	Efectos letales y sub-letales en poblaciones de peces
	Disminución del CO <sub>2</sub>	Interacciones competitivas alteradas entre el fitoplancton
	Aumento del tamaño de las algas	Efectos sobre el pastoreo del zooplancton y la eficiencia de la cadena trófica
Colapso de los florecimientos	Producción de toxinas	Alelopatía, efectos letales y sub-letales sobre peces, zooplancton, macroinvertebrados, aves y otros vertebrados acuáticos
	Hipoxia/Anoxia	Impacto letal o sub-letal en la biota (ej. muerte de peces)
	Amonio	

### **1.2.3.3. Presencia de Microorganismos Patógenos**

Cuando un afloramiento cuenta con densidades celulares altas (Tabla 1) puede disminuir rápidamente los nutrientes, aumentar la turbidez, agotar las reservas de carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>) en el agua y otros recursos esenciales causando una reducción abrupta en la biomasa de cianobacterias. La consecuencia es en general la formación de espumas con material en descomposición, mal olor y desagradable a la vista (Paerl y Huisman, 2009). Las espumas pueden albergar microorganismos patógenos. Este fenómeno se ve favorecido por interacciones entre cianobacterias, microalgas y microorganismos como bacterias, hongos y ciliados a través de los agregados de las vainas de los filamentos de las especies de las cianobacterias que conforman el afloramiento (Comba, 2009). Si bien tales asociaciones son mutuamente beneficiosas entre los microorganismos planctónicos, son nocivas cuando algunos de los asociados son patógenos por ejemplo para los peces; se ha encontrado también que por efectos mecánicos ocurre la colmatación de las branquias en animales de diferentes tallas, lo que impide el intercambio gaseoso y mortalidad por asfixia (De León, 2002).

### **1.2.3.4 Producción de Toxinas**

Para evaluar los peligros específicos de las toxinas cianobacterianas es necesario comprender sus propiedades químicas y físicas, su aparición en los cuerpos de agua que son utilizados por las personas, los mecanismos que regulan su producción y su destino en el ambiente (Andrinolo y Sedan, 2017).

Las poblaciones de cianobacterias que producen o no producen toxinas, pueden coexistir en un solo ecosistema dominado por una única especie o estar compuestas por una variedad de especies (Chorus y Bartram, 1999).

En los últimos años, se ha incrementado el número de investigaciones dedicadas a la identificación de cianotoxinas y sus efectos sobre los ecosistemas y la salud humana (Carmichael y Boyer, 2016). La razón de este incremento radica en el hecho de que algunas cianobacterias producen toxinas como estrategia de defensa y las secretan en su entorno. Además, ya que las cianotoxinas son metabolitos secundarios que se generan durante la producción de fotopigmentos y se acumulan en el citoplasma (Paerl y Millie, 1996), ante condiciones ambientales desfavorables las cianobacterias mueren y liberan sus contenidos al agua mediante procesos de autólisis celular (Pérez *et al.*, 2008). Por lo tanto, la presencia de estos microorganismos representa un riesgo de toxicidad, que atenta, no sólo contra el equilibrio de los ecosistemas sino también contra la salud pública (Dawson, 1998; Wiegand y Pflugmacher, 2005); ver Tabla 1. Además, hay que resaltar que la persistencia de las cianotoxinas en el agua puede variar desde pocos días hasta varios años, y sus efectos sanitarios negativos y los daños causados a la salud de la biota acuática, en muchos casos se acumulan en la cadena trófica (Cazenave *et al.*, 2005; Hudnell, 2008).

De no haber grandes cambios en el clima y en las condiciones geoquímicas específicas del propio cuerpo de agua, los afloramientos, que pueden ser de carácter tóxico, probablemente se repetirán anualmente en aquellos cuerpos de agua que tienen historia de afloramientos tóxicos (Chorus y Bartram, 1999). El primer registro mundial de los efectos tóxicos de las cianobacterias fue reportado en Australia en el

año 1878. Este evento consistió en una gran cantidad de muertes de animales que habían ingerido agua del lago Alexandria, en donde hubo un afloramiento de *Nodularia spumigena* (McGregor *et al.*, 2012). También se han reportado casos de muertes de personas por ingestión directa de aguas con toxinas provenientes de las cianobacterias (Azevedo *et al.*, 2003). En la actualidad las cianobacterias son frecuentemente utilizadas como bioindicadores de calidad del agua (Comba, 2009). Es relevante que más del 50 % de los afloramientos en aguas continentales pueden estar formados por especies que sintetizan metabolitos de elevada toxicidad, muchos de los cuales son fuertemente olorosos (De León, 2002). También, algunos géneros de cianobacterias producen toxinas que hasta este momento se consideran como los compuestos más tóxicos y preocupantes en las masas de agua, tanto por su elevada distribución como por su alta toxicidad (Forjan *et al.*, 2008).

Las cianotoxinas se dividen en tres amplios grupos de estructura química: alcaloides, lipopolisacáridos (LPS) y péptidos cíclicos (Chorus y Bartram, 1999). De acuerdo con su grado de letalidad, es decir, según los daños que pueden causar las cianotoxinas sobre los seres vivos con los que han tenido contacto o que las han ingerido, las cianotoxinas pueden ser clasificadas también en tres grupos: (i) las dermatoxinas: producen irritación sobre la piel, sin embargo, no son letales (Lucena, 2008); destacan las aplisiatoxinas y lingbiatoxinas presentes en ecosistemas marinos (Sivonen y Jones, 1999); (ii) las citotoxinas: tienen una gran bioactividad selectiva, causan daños pero no son muy letales, por ejemplo, deterioro sobre los sistemas cardiovascular y linfático y en algunos órganos como las glándulas suprarrenales, el hígado, estómago, corazón y riñones (Carmichael, 1992), (iii) las hepatoxinas y neurotoxinas: producen

intoxicación letal aguda, por diversos mecanismos, sobre el hígado y el sistema nervioso, respectivamente (Tillet *et al.*, 2000; Ylinen *et al.*, 2003; Wiegand y Pflugmacher 2005).

De las hepatoxinas, las más estudiadas son las microcistinas. El hígado es el principal órgano afectado, provocándole lisis o alterando su actividad metabólica e induciendo la formación de tumores hepáticos (Chorus y Bartram, 1999). No obstante, las microcistinas pueden también tener efectos sobre otros órganos como el riñón y el pulmón (Palikova *et al.*, 2004).

A nivel mundial, las toxinas cianobacterianas que se encuentran con mayor frecuencia en las aguas dulces y salobres son las toxinas peptídicas cíclicas de la familia de las microcistinas y las nodularinas (Chorus y Bartram, 1999; Rosales *et al.*, 2012).

Las microcistinas son hepatoxinas que inhiben la actividad de la fosfatasa, con una toxicidad que se estima que es cien veces mayor que la del cianuro (De León, 2002).

### **1.3. Microcistinas**

Las microcistinas son heptapéptidos cíclicos, hidrosolubles, y hepatotóxicos de gran diversidad química (Boualcha, *et al.*, 2019). Según Chorus y Bartram (1999), los péptidos cíclicos son productos naturales comparativamente grandes, de peso molecular (PM)  $\approx$  800-1,100 D (dalton), aunque son pequeños en comparación con muchos otros oligopéptidos y polipéptidos celulares como por ejemplo las proteínas que tienen un  $PM > 10.000$  D. Estos péptidos cíclicos están formados por cinco aminoácidos (las nodularinas) o siete aminoácidos (las microcistinas), y los dos

aminoácidos terminales del péptido lineal se unen para formar un compuesto cíclico (Malcuori, 2011).

Actualmente existen registradas 279 microcistinas (Wiegand y Pflugmacher, 2005) y se distinguen por ser una de las principales causas de los eventos de intoxicación por cianobacterias (Andrinolo y Sedan, 2017).

Las variaciones más frecuentes son las que se producen por sustituciones de L-aminoácidos distintos en las posiciones 2(X) y 4(Y) y por desmetilaciones de los aminoácidos de la posición 3 y/o 7 aunque se han observado variaciones en cada aminoácido (Sivonen, 1999; Codd et. al, 1999). No estando claro el origen de la existencia de tantas variantes de microcistinas, la similitud estructural de algunas de estas toxinas traza con las principales toxinas puede sugerir que sean posibles subproductos o artefactos producidos durante los procesos de purificación (Lawton y Edwards, 2001).

Los aminoácidos en las posiciones X e Y se indican con un sufijo de dos letras; por ejemplo, MC-LR La variante más común y letal es la isoforma microcistina-LR (MC-LR) que se diferencia de las demás por tener Leucina (L) en la posición 2 (X) y Arginina (R) en la posición 4 (Y), siendo X e Y las posiciones variables de la molécula (Figura 4) (Vela *et al.*, 2007). En la posición X los L-aminoácidos más comunes son, leucina (L), arginina (R) y tirosina (Y), aunque también se han encontrado MCs con homotirosina (Hty), fenilalanina (F), alanina (A), homofenilalanina (Hph), metionina S-óxido [M(O)], homoisoleucina (Hil), triptófano (W) y 1, 2, 3, 4,-tetrahidrotirosina [(H4)Y], en esta posición (Sivonen y Jones, 1999). En la posición y el aminoácido más común

es arginina (R) y otros posibles son alanina (A), leucina (L), ácido aminoisobutírico (Aba), homoarginina (Har), tirosina (Y), fenilalanina (F) o metionina S-óxido [M(O)].

Son moléculas relativamente polares, debido a los ácidos carboxílicos en posiciones 3 y 6 y la presencia frecuente de Arginina en posiciones 2 y 4, y contienen algunas partes más hidrofóbicas como el residuo Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6- dienoico) o los sustituyentes hidrofóbicos de los aminoácidos sustituyentes (Spoof *et al.*, 2001).

Las MCs son en general muy tóxicas por exposición aguda. La DL50 (dosis letal) por vía i.p. de MC-LR oscila entre 25 y 150 µg/Kg en ratón (aceptándose un valor medio de 50 o 60 µg/Kg (Kuiper-Goodman *et. al.*, 1999). La DL50 por vía oral (sonda) de MC-LR en la cepa de ratón Cr1:CD-1 (IGR)BR es mucho más elevada, aproximadamente de 5000 µg/Kg, siendo más sensible que la rata (DL50 por vía oral superior a 5000 µg/Kg) (Fawell *et. al.*, 1999). La diferencia de toxicidad aguda por las vías anteriormente mencionadas, vía oral e inyección i.p., se estima en un factor que oscila entre 30 a 167 (Yoshida *et. al.*, 1997).

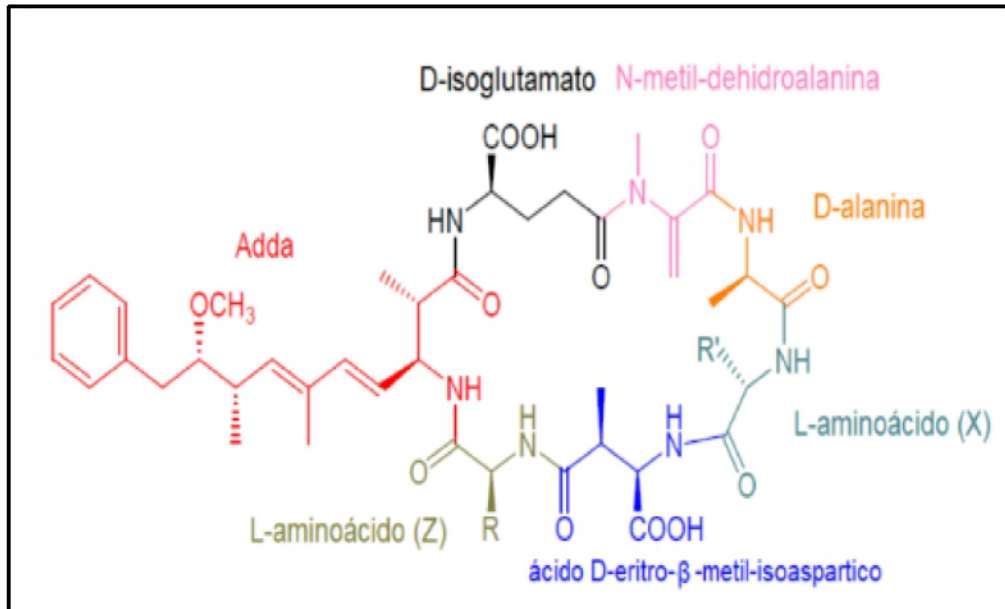
Según su toxicidad se pueden clasificar en tres grupos, dependiendo de los aminoácidos existentes en las posiciones 2 y 4 (Harada, 1996): Toxicidad elevada: MC-LR, -LA,-YR; Toxicidad moderada: MC-WR, las MCs desmetiladas en Mdha y β-Me-Asp; Toxicidad baja: MC-LY, -RR, -M(O)R. Los estudios acerca de la influencia de los sustituyentes sobre la acción tóxica de las toxinas han revelado que tanto los L-aminoácidos, Adda y el D-glu libre juegan un papel muy importante en la hepatotoxicidad de estas (Quinn *et al.*, 1996) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Relación entre estructura y toxicidad de algunas Microcistinas

<b>L-aminoácidos (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>)</b>	<b>DL<sub>50</sub> (µg/kg, ratón i.p.)</b>
MC-LR, MC-YR, MC-LA	<100
MC-WR	100-400
MC-RR, MC-M(O)R	400-800
<b>Desmetilación en Mdha y/o β-Me-Asp</b>	
3-desmetil MC-LR (-RR)	100-400
7-desmetil MC-LR (RR)	100-400
3, 7-didesmetil MC-LR	100-400
<b>Adda</b>	
<i>O</i> -desmetil-Adda-MC-LR	<100
<i>O</i> -acetil- <i>O</i> -desmetil-Adda-MC-LR	<100
6(Z)-Adda MC-LR (RR)	>800
<b>Ester</b>	
D-Glu(C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O)ester MC-LR	>800
D-Glu(CH <sub>3</sub> O)ester MC-LR	>800
<b>Mdha</b>	
Dihidro MC-LR	100-400
MC-LR-GSH aducto	400-800

Fuente: Moreno et. Al., 2003

En los seres humanos esta toxina puede causar síntomas como vómito, diarrea, debilidad, dificultad para respirar y temblores musculares que dependiendo del grado de intoxicación pueden conducir a la muerte (Svrcek y Smith, 2004). Una cepa de una especie de *Microcystis* puede producir más de una variante de microcistina a la vez. Las principales cepas productoras de estas toxinas (microcistina-LR) son los géneros *Microcystis* presentes en los cuerpos de agua dulce, géneros de amplia distribución y causantes de la mayoría de las floraciones tóxicas alrededor del mundo (Cantoral *et al.*, 2017). Sin embargo, otros géneros de algas planctónicas y bentónicas pueden producir estas toxinas, aunque en niveles más bajos (Almanza *et al.*, 2016).



Fuente: Martínez, 2019

**Figura 4.** Estructura química de la Microcistina

Las microcistinas son solubles en agua y, excepto quizás por algunas microcistinas algo más hidrófobas, son incapaces de penetrar directamente en las membranas lipídicas de células animales, vegetales y bacterianas (Chorus y Bartram, 1999). Por lo tanto, para provocar su efecto tóxico, la absorción en las células se produce a través de transportadores de membrana que, de otro modo, transportan nutrientes o bioquímicos esenciales (Malcuori, 2011). En ambientes acuáticos, estas toxinas generalmente permanecen contenidas dentro de las células cianobacterianas y solamente se liberan en cantidades sustanciales durante la lisis celular (Chorus y Bartram, 1999). Junto con su alta estabilidad química y su solubilidad en agua, esta contención tiene implicaciones importantes para su persistencia ambiental y exposición a los seres humanos en cuerpos de agua superficiales (Chorus y Bartram, 1999).

#### **1.4. Preocupación en Suministros de agua**

*Microcystis* forma densas masas macroscópicas en la superficie del agua gracias a sus aerótopos (vesículas de gas o "pseudovacúolas") en sus células, mediante las cuales pueden controlar su flotabilidad y también su posición en la columna de agua de acuerdo con sus requerimientos fisiológicos (Vela *et al.*, 2007).

Representan un gran desafío para la producción de agua potable a partir de aguas superficiales que contienen cianobacterias con estas toxinas.

Los afloramientos son de preocupación mundial ya que son una amenaza para el suministro de agua de todo el mundo (Carmichael, 2001). En varios países como Australia, Brasil, China, Inglaterra, Sudáfrica y Estados Unidos se han reportado problemas de salud atribuidos a la presencia de cianobacterias en el agua potable (OMS, 1999). Los géneros más frecuentemente detectados pertenecen a *Anabaena* y *Microcystis*. Estos géneros producen varias toxinas que pueden causar enfermedades cuando son ingeridas o al tener contacto con el agua a partir de la exposición recreacional, siendo la microcistina la toxina cianobacteriana más comúnmente detectada y medida (Beverdorf *et al.*, 2015).

La ecología de las cianobacterias está bien descrita, sin embargo, la relación entre la población, la dinámica y los desencadenantes ambientales de la producción de microcistina son poco conocidos (Beverdorf *et al.*, 2015). La exposición aguda a la microcistina ha resultado en muertes de personas (Carmichael, 2001), y estudios epidemiológicos recientes sugieren que la exposición crónica a bajas concentraciones

de microcistina puede provocar cáncer de hígado y colorrectal (Li *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2002).

#### **1.4.1 Peligros para la salud humana**

Según Chorus y Bartram (1999), las principales vías de exposición a cianotoxinas incluyen la oral a través del agua de bebida y la dérmica a través del agua de uso recreacional. Sin embargo, la muy limitada información disponible sugiere que la inhalación de aerosoles (potencialmente posible durante una ducha o ciertas actividades laborales) puede ser una vía de exposición.

Las primeras muertes humanas documentadas de hepatotoxinas cianobacterianas ocurrieron en un incidente desastroso después exposición intravenosa en una clínica de diálisis en Ciudad de Caruaru, Brasil durante 1996 donde 117 pacientes desarrollaron enfermedad hepática colestática y al menos 47 muertes fueron atribuidas a la diálisis con agua conteniendo toxinas cianobacterianas (Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001).

#### **1.4.2 Contacto directo recreacional**

Las reacciones alérgicas e irritativas de diversa gravedad de cianobacterias son conocidas a partir de la exposición a cianobacterias y otras algas de agua dulce, pero no han sido ampliamente documentadas (Malcuori, 2011; Chorus y Falconer, 1998).

En una sistemática revisión de la literatura sobre exposición recreacional a cianobacterias de agua dulce, los casos reportados y las referencias anecdóticas datan de 1949 y describen una variedad de enfermedades asociadas con la exposición recreacional a cianobacterias: síntomas símil fiebre del heno, eritemas, prurito,

síntomas gastrointestinales como los más frecuentemente reportados (Chorus y Bartram, 1999). Reportes de Estados Unidos de América han registrado reacciones alérgicas de la exposición por actividades recreativas, y se ha mostrado que la ficocianina de pigmentos de las cianobacterias ha sido responsable en mínimo un caso (Cohen y Reif, 1953).

El uso recreacional de las aguas probablemente sea la ruta de exposición más importante a cianotoxinas en algunas partes del mundo, siendo los nadadores los más expuestos (Malcuori, 2011, Stewart *et. al.*, 2006). El desarrollo de cianobacterias en lagos y ríos que son usados con propósitos recreacionales ha sido reconocido como una preocupación pública (Chorus y Bartram, 1999). Las floraciones de cianobacterias en las aguas se pueden asociar con problemas estéticos como la aparición de espumas y olores desagradables, una apariencia repugnante de las orillas de los lagos y ríos, que al empezar el proceso de putrefacción causa desoxigenación modificando la química del agua especialmente cuando las películas de los organismos se acumulan (Cobo, 2015).

#### **1.4.3 Exposición alimentaria**

En muchas áreas del mundo, la población humana local consume peces, bivalvos y otros animales que crecen dentro o cerca de cuerpos de agua contaminados con cianobacterias tóxicas. Por lo tanto, puede haber varias fuentes de exposición oral a neurotoxinas que se agregan al agua de bebida y al agua recreacional (Chorus y Bartram, 1999; Anónimo, 2020).

Las toxinas cianobacterianas provenientes de fuentes de suministro de agua pueden tener relación con los casos registrados de enfermedades gastrointestinales y hepáticas, en casi todos los casos han sido coincidentes con la decadencia natural de una floración de cianobacterias o con la lisis artificial de una floración por aplicación de sulfato de cobre. Ambos mecanismos llevan a la liberación de cianotoxinas a partir de la descomposición de las células. Mientras que los procedimientos de tratamiento pueden remover las cianotoxinas ligadas a las células intactas, no son efectivos para remover las cianotoxinas disueltas en estos casos (Chorus y Bartram, 1999).

### **1.5. Métodos de detección de cianobacterias (microcistinas) en agua**

La detección de cianobacterias se puede realizar mediante diversas pruebas y métodos de laboratorio, los cuales varían en complejidad e información que proporcionan (Sánchez, 2020). Entre estos métodos de identificación se pueden mencionar los siguientes:

#### **1.5.1 Microscopía**

Las técnicas de microscopía pueden ser útiles para la identificación de géneros de cianobacterias (Rantala *et al.*, 2006). Es de bajo costo, no obstante, se requiere un importante entrenamiento en la identificación y disponer de bibliografía amplia y actualizada (Sánchez, 2020).

En el embalse Gatún se realizan conteos e identificación de algas en las aguas crudas mediante el uso de microscopía permitiendo identificar géneros, sin embargo, esta técnica no es útil para identificar toxinas y genes involucrados en su síntesis (Hotto *et al.*, 2007).

### **1.5.2 Métodos basados en anticuerpos y actividad enzimática**

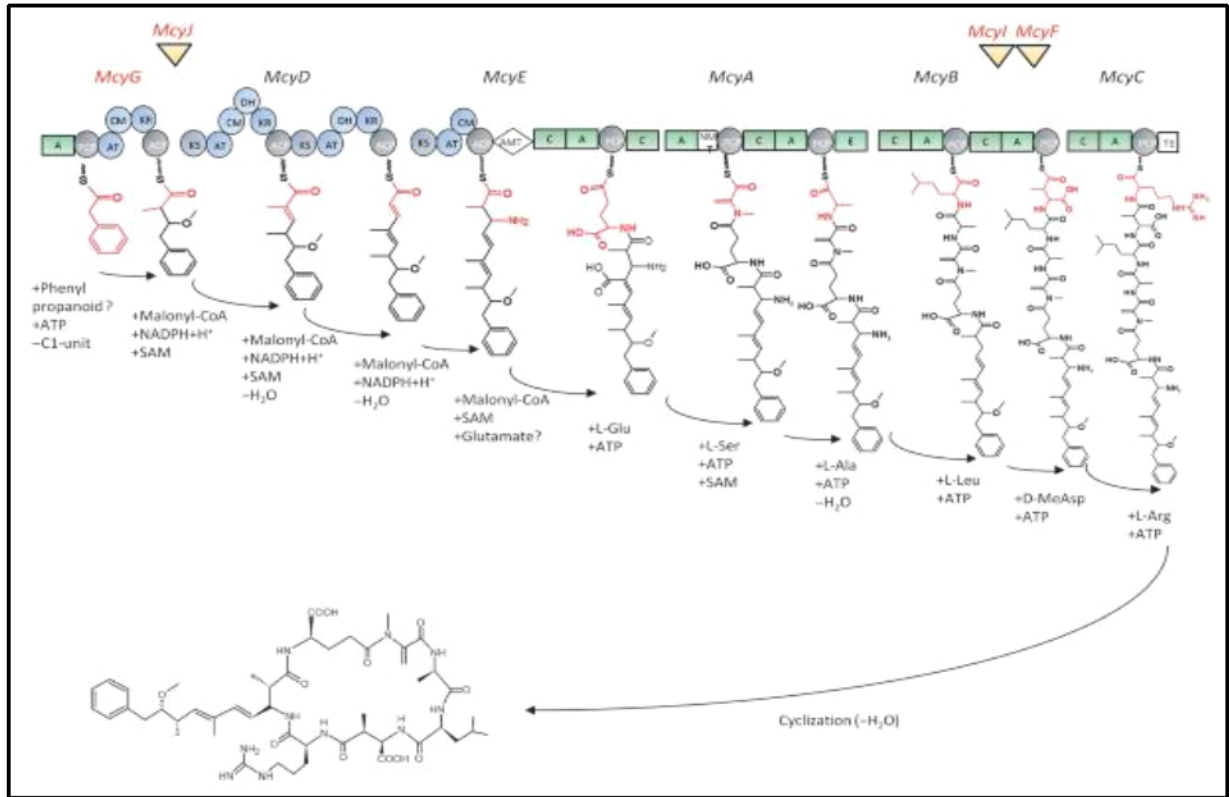
Los métodos bioquímicos representan una forma fácil y un enfoque efectivo para el rápido monitoreo de la concentración de cianotoxinas. Entre estas técnicas se pueden mencionar el ensayo ELISA (Sánchez, 2020). Su aplicación en la detección de cianotoxinas es complementaria con otros enfoques, como por ejemplo los moleculares que proveen la confirmación de la presencia de estas en los cuerpos de agua (Sanseverino *et al.*, 2017). Sin embargo, esta técnica es capaz de identificar las toxinas siempre y cuando estas se encuentren intactas, es decir, no son capaces de detectar la toxina bajo condiciones de degradación (Crowter, 2009).

### **1.5.3 Métodos Moleculares**

Las técnicas de biología molecular han demostrado ser específicas en la identificación de los genes involucrados en la biosíntesis de cualquier toxina (Hurtado y Polanía, 2014). Las cepas tóxicas de los géneros cianobacterianos se diferencian de las no tóxicas porque presentan genes que codifican para la síntesis de péptidos potencialmente tóxicos, los cuales pueden detectarse por métodos moleculares (Hotto *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que en la biosíntesis de microcistina (fig. 5) se encuentra involucrado un clúster de 10 genes distribuidos en dos operones (*mcyA-C* y *mcyD-J*) que se transcriben bidireccionalmente (Ceballos, 2012). Dentro de esta agrupación, la detección de las regiones *mcyB* y *mcyE* ha sido de particular importancia en la

identificación de géneros de cianobacterias potencialmente tóxicas (Neilan *et al.*, 2008).



Fuente: Dittman *et al.*, (2013).

**Figura 5.** Representación esquemática de la ruta biosintética de microcistina. Los nombres de las enzimas que se caracterizaron bioquímicamente se resaltan en rojo. Otras reacciones propuestas se basan en predicciones bioinformáticas. Los aminoácidos y ácido carboxílico incorporadas o modificadas por proteínas individuales están resaltadas en rojo. Dominios de PKS: KS: cetoacil sintasa, AT: aciltransferasa, DH: deshidratasa, KR: quetoreductasa, ACP: proteína portadora de acilo, CM: C-metiltransferasa, AMT: glutamato-semialdehído aminotransferasa; Dominios de NRPS: A: dominio de adenílacion, C: dominio de condensación, E: dominio de epimerización, NMT: N-metiltransferasa, PCP: proteína portadora de peptidilo, TE: dominio tioesterasa.

Los métodos moleculares que más se usan en la actualidad para detectar cianobacterias hepatotóxicas (mayoritariamente del género *Microcystis*) emplean tecnología basada en la PCR convencional (Neilan *et al.*, 1999). Múltiples estudios se han centrado en la detección de los genes *mcy* utilizando un enfoque de PCR con cebadores específicos de especie basados en diferencias dentro de los grupos de

genes *mcy* (Kaebernick *et al.*, 2000), así como cebadores universales dirigidos a secuencias conservadas de la Operón MC (Hisbergues *et al.*, 2003, Jungblut y Neilan, 2003). Los genes *mcy* comunes a los que se dirige son *mcyA*, -B, -C, -D y -E, con muchos estudios que utilizan una combinación de genes (Hotto *et al.*, 2005)

El examen de los genes *Mcy* puede proporcionar información sobre el potencial de microcistinas, la diversidad de productores de toxinas dentro de una población y la distribución geográfica de los genotipos productores de microcistinas (Rinta-Kanto y Wilhelm, 2006).

### **1.6. Cianobacterias en Panamá**

En Panamá, las condiciones tropicales y el cambio climático inciden en los caudales de los ríos y en la proliferación de las cianobacterias (Weidner *et al.*, 2007), registrándose afloramientos de cianobacterias tóxicas que han afectado la calidad del agua, provocando mal sabor (Quintero, 2007). El primer caso registrado data de diciembre de 1992 y fue reportado en la revista *The Panama Canal Spillway*. Este evento hizo referencia a una especie de microalga que podía causar irritación cutánea, además de envenenar y asfixiar organismos acuáticos (Jones, 1992). Se consideró que las lesiones en la piel de las personas que fueron afectadas se debieron a cianobacterias, por lo tanto, se recomendó a los empleados de la antigua Zona del Canal de Panamá que realizaban labores que implicaran el contacto con el agua, utilizar ropa adecuada.

Durante los años 1998-2000 se presentaron manchas de color verde en el agua del embalse Gatún, sin embargo, se asumió que eran productos químicos agregados en

ella para el control de la vegetación acuática (Castillo, 2015). Posteriormente, en el año 2015, se realizó un estudio sobre los factores ambientales que influyen en la presencia de cianobacterias en las aguas de la Cuenca del Canal de Panamá y se confirmó la presencia de estos microorganismos y toxinas mediante la técnica de ELISA (Castillo, 2015).

La presencia de microcistina en el agua de consumo humano representa un problema de salud pública (Avendaño y Arguedas, 2006). En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció como valor provisional de referencia, 0.001 mg/L como nivel máximo aceptable para el consumo diario de microcistina en aguas de abastecimiento público, por lo tanto, es de vital importancia detectar las cianobacterias con potencial de toxicidad en cuerpos de agua dedicados a la obtención de agua potable para millones de personas. Esto coloca a las microcistinas entre las sustancias que con más frecuencia se encuentran en las aguas en concentraciones relevantes para la salud pública y con probabilidades de producir un impacto sobre la salud pública si dichas aguas se consumen sin haberse removido previamente las células cianobacterianas (Chorus y Bartram, 1999).

Actualmente no existen estudios en cuanto a la identificación de genes productores de toxinas de cianobacterias en Panamá, por ende, a través de este estudio se pretende identificar la presencia de cianobacterias tóxicas en las tomas de agua cruda del embalse Gatún mediante técnicas moleculares y ELISA. Por tanto, este estudio representa un gran aporte para el conocimiento, implementación y dar seguimiento a estos tipos de análisis a nivel nacional.

## **METODOLOGÍA**

## **2.1 Área de estudio**

### **2.1.1 Embalse Gatún**

Los embalses son cuerpos de aguas lénticos, que se constituyen en ecosistemas únicos por sus características de formación, puesto que en la mayoría de los casos son creados artificialmente para satisfacer las diferentes necesidades humanas como son riego, generación eléctrica, pesca, etc., y por ello poseen características muy particulares lo que hace que el estudio de estos sea muy complejo pero necesario para mantener su utilidad en el tiempo (Coello y Cajas, 2005).

Además, los embalses no son sistemas ecológicos aislados, sino que están sujetos a la tensión que ejerce sobre ellos la cuenca de drenaje y a su vez afectan la calidad del agua debajo de su ubicación; por esto es necesario comprender los procesos hidrográficos que se producen, para establecer su manejo adecuado (Coello y Cajas, 2005).

El embalse Gatún representa el lago artificial más grande de Panamá con una superficie de 436 km<sup>2</sup>, el cual es utilizado con diferentes propósitos (ACP, 2006). Es utilizado en el tránsito de buques, hidrogenación eléctrica, ecoturismo acuático, actividades agropecuarias, industriales y forestales (ACP, 2017). Además, representa la principal fuente para la producción de agua potable de las ciudades de Panamá, Colón, Arraiján y La Chorrera (ACP, 2020). En el mismo se han instalado diversas tomas de Agua, algunas administradas por el Canal de Panamá y otras por el Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacionales (IDAAN). Entre ellas se encuentran: Toma de agua de Paraíso, Gamboa, Monte Esperanza, Laguna Alta, Mendoza, Sabanitas. También encontramos tomas de acueductos rurales como Barro Colorado, Escobal,

Cuipo. La Autoridad del Canal de Panamá a través del Programa de Vigilancia y Seguimiento de la Calidad del Agua (PVSCA) asegurar la disponibilidad en volumen y calidad del agua para consumo y para la operación del Canal, información que ha permitido caracterizar y conocer el estado y la evolución de las características del agua a lo largo de los años.

## 2.2 Sitios de muestreos

### 2.2.1 Tomas de agua

Para el estudio analizaremos las 9 tomas de agua del embalse Gatún.

**Cuadro 4.** Estaciones de Calidad de Agua en el Embalse Gatún.

No.	Nombre de la Estación	Código de la Estación	Coordenadas UTM	
			X	Y
1	Barro Colorado	BCI	628595	1013929
2	Gamboa	DC1	643343	1007468
3	Escobal	ESC	613957	1010765
4	Laguna Alta	LAT	629016	999569
5	Toma de agua Cuipo	TAC	604811	1003283
6	Toma de agua Sabanitas	TAS	629298	1032673
7	Toma de agua Mendoza	TME	627847	999982
8	Toma de agua Monte Esperanza	TMH	623442	1028418
9	Toma de agua Paraíso	TMR	651144	997879

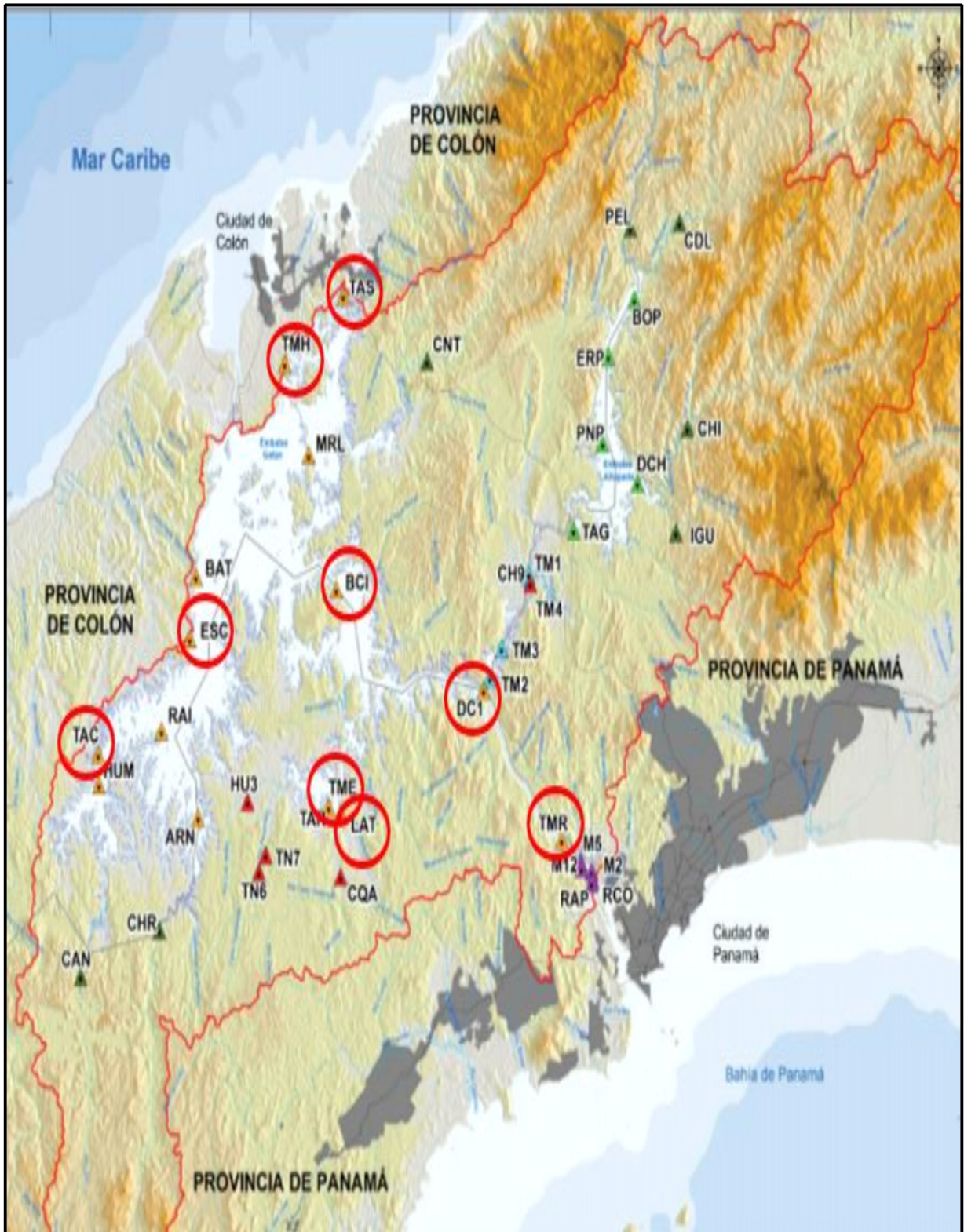


Figura 6. Mapa de los sitios de muestreos del Embalse Gatún.

## **2.3 Técnicas de muestreo y procedimientos de análisis**

El muestreo se realizó con una frecuencia mensual colectando (dos) 2 muestras (una para ADN y otra para los factores fisicoquímicos y serológico) en cada punto a (un) 1 m de la superficie. Comprendiendo un periodo de 10 meses (mayo 2019 a febrero 2020), y estableciéndose el horario entre las 9:00 a.m. a 3:00 p.m. dependiendo de la lejanía del sitio.

En cada sitio se realizaron mediciones *in situ* (temperatura, pH y ficocianina) para cada muestra con una celda multiparamétrica (Marca Hydrolab modelo DS5) y se colectaron muestras para realizar sus análisis en el laboratorio de la Unidad de Calidad de Agua de la Autoridad del Canal de Panamá.

Todos los instrumentos de medición utilizados fueron previamente calibrados en el laboratorio. Se utilizaron envases de polipropileno para su colecta y fueron colocadas en neveras con hielo hasta llegar al laboratorio.

### **2.3.1 Procedimiento de análisis fisicoquímicos**

Para obtener más información sobre las características del agua se midieron varios parámetros fisicoquímicos.

#### **2.3.1.1 Clorofila**

El análisis de clorofila se realizó mediante el AquaFlash handheld fluorometer (marca Turner desing, modelo 8600, Estados Unidos). Este equipo es capaz de proporcionar estimaciones rápidas y precisas para el análisis de clorofila total (CHL) y para la eficacia fotosintética (YLD) de las algas, utilizando el principio de detección de fluorescencia *in vivo*. Con la finalidad de evaluar el porcentaje de cianobacterias dentro de la muestra, se usó el CyanoFluor handheld HAB indicator (marca Turner desing5,

modelo 8700, Estados Unidos) pues este instrumento puede estimar rápidamente la abundancia de cianobacterias en una población de algas mixtas utilizando las proporciones de PC (ficocianina) a CHL (clorofila) en una relación FIC:CHL.

Para realizar la medición se agrega aproximadamente 3.5 mL de la muestra en una celda transparente de cuarzo, estéril y luego se coloca dentro del AquaFlash handheld fluorometer y del mismo modo, se colocará dentro del CyanoFluor handheld HAB indicator.

#### **2.3.1.2 Turbiedad**

Para medir las partículas suspendidas en el líquido, se utilizó un turbidímetro láser de sobremesa (marca Hach, modelo TU5200, Alemania). La muestra se agitó previamente durante un minuto y se procede a agregar aproximadamente 30 mL de la muestra en un tubo transparente de borosilicato estéril con tapa rosca y se realizar la medida en el equipo (SM 2130B, 2017).

#### **2.3.1.3 Alcalinidad**

Se coloca 100 mL de la muestra de agua en un Erlenmeyer, luego se agrega 5 gotas de solución indicadora de alcalinidad. Después se le añade un agitador magnético a esta solución y se colocada en un plato agitador a 300 rpm. Posteriormente se procede a titular esta solución con ácido sulfúrico a 0.2N, mediante una bureta digital, hasta que se produzca el cambio de coloración de azul a amarillo (SM 2320B, 2017).

#### **2.3.1.4 Medición del pH**

Se coloca la muestra en un vaso químico de 50 mL y utilizando un medidor de pH (marca Denver instrument, modelo 250, Estados Unidos) se procede a hacer las

mediciones colocando el electrodo de pH en la solución y enjuagando las veces que sea necesario con agua estéril entre cada muestra (SM 4500 -H+B, 2017).

#### **2.3.1.5 Nitratos y Nitritos**

Para reducir los nitratos a nitritos se coloca 25 mL de la muestra y se le adiciona 75 mL de la solución de cloruro de amonio-EDTA. Se coloca la muestra en una columna haciéndola pasar por el flujo durante 7-10 minutos, se descarta los primeros 25 mL y el resto se colecta. Luego de reducido los nitratos a nitritos se adiciona a la muestra 2 mL del reactivo de color y luego de 10 minutos se mide la absorbancia a 543 nm (SM 4500-NO2-B, 2017).

#### **2.3.1.6 Fosfato**

Se coloca 50 mL de la muestra en un vaso químico, luego se agrega 1 gota de indicador de fenolftaleína. A continuación, se agrega 8 mL del reactivo mixto (ácido sulfúrico, tartrato antimónico de potasio, molibdato de amonio y ácido ascórbico). Después de 10 minutos medimos la absorbancia de cada muestra a 880nm (SM 4500-P E, 2017).

#### **2.3.1.7 Sulfato**

Se coloca 50 mL de la muestra en un Erlenmeyer, se adiciona 10 mL de la solución amortiguadora, se mezcla y se agrega una cucharadita de cloruro de bario deshidratado, se agita durante 1 minuto a una velocidad constante y por último se mide en el espectrofotómetro pasado 5 minutos a una lectura de absorbancia de 420 nm (SM4500-E-SO4, 2017).

**Cuadro 5.** Métodos analíticos empleados según parámetros de calidad del agua.

Parámetro	Método	Unidades de Medida	Límite de detección
<sup>1</sup> Temperatura	SM 2550-A	°C	0,1 °C
Clorofila	No incluido en el SM	µg/L	0.3
YLD	No incluido en el SM	µg/L	0.3
PC:CHL	No incluido en el SM	µg/L	0.3
Turbiedad	SM 2130-B	NTU	0,05
Alcalinidad	SM 2320B	mg/L	1
pH	SM 4500 -H+B	Unidades de pH	0,1
N-Nitritos	SM 4500-NO2-B	mg/L	0,002
N-Nitratos	SM 4500-NO3-E	mg/L	0,01
p-Fosfatos	SM 4500-P E	mg/L	0,020
Sulfato	SM4500-E-SO4	mg/L	1
Microcistinas	ELISA Kit ET039	µg/l	0,18

<sup>1</sup> Medición *in situ*

## 2.3.2 Procedimiento de análisis Molecular

### 2.3.2.1 Extracción y purificación del ADN

El proceso de extracción y purificación de ADN se inició con la filtración de 500 mL de agua cruda, a través de un filtro de celulosa (tamaño de poro 0,45µm) que está colocado en un sistema de filtración al vacío con matraz Kitasato. A continuación, se pesa 80 mg del concentrado de la filtración de las muestras de agua cruda. Este concentrado será colocado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml que ha sido rotulado previamente. Utilizando el kit de extracción comercial Dneasy Plant Handbook (Qiagen) se agrega a cada uno de los tubos de microcentrífuga, anteriormente mencionados, la solución de lisis. Luego se le añadirá el reactivo RNasa A para digerir el ARN en la muestra. Terminado el proceso de lisis, las proteínas y los polisacáridos se precipitan. Los residuos celulares y los precipitados se eliminan por centrifugación

a 13200 rpm durante 6 minutos (marca Eppendorf, modelo 5415R, Alemania). Luego, el tampón de unión y el etanol son agregados al lisado aclarado para promover la unión del ADN a la membrana DNeasy. La solución se aplica a través de una columna de centrifugación DNeasy y el ADN se une a la membrana mientras los contaminantes, como las proteínas y los polisacáridos, se eliminan de manera eficiente mediante dos pasos de lavado. El ADN puro se eluye en un pequeño volumen de tampón bajo en sal o agua, dando como resultado la extracción del ADN.



**Figura 7.** Extracción de ADN utilizando el kit comercial Dneasy Plant Handbook (Qiagen)

### 2.3.2.2 Cuantificación de muestras de ADN con Biofotómetro

Después de la extracción y purificación, se procede a cuantificar el ADN en un Biofotómetro plus eppendorf. Esto permitirá conocer la concentración y pureza del ADN. El ADN se almacenó a una temperatura a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.2.3 Amplificación del ADN

El PCR Master Mix, cebadores y el ADN se descongelaron en hielo con el propósito de evitar su degradación a causa de cambios bruscos de temperatura. Luego, se

colocan los reactivos en un vortex a 12000 rpm durante 30 segundos para homogenizar. Por cada set o par de cebadores se procede a rotular tubos de 0.2mL para la reacción de PCR. En cada tubo de 0.2 mL se agregan los siguientes componentes: 1  $\mu$ l del cebador Forward a una concentración de 1  $\mu$ molar, 1  $\mu$ l del cebador Reverse a una concentración de 1  $\mu$ molar, 12  $\mu$ l de PCR Master Mix; la cantidad que es agregada de agua estéril grado biología molecular y el ADN depende de la concentración de la extracción del ADN, el volumen final de la reacción de PCR es de 25  $\mu$ l. Luego de añadir todos los componentes, se mezcla pipeteando. Posteriormente se colocan los tubos de reacción de PCR en el termociclador, utilizando el programa de amplificación: a) 92°C durante 2 minutos, b) 40 ciclos a 92°C por 2 minutos, c) 55°C por 50 segundos, d) 72°C por 2 minutos, e) 72°C durante 8 minutos y f) 4°C hasta retirar los tubos.

### **2.3.2.2 Electroforesis**

Se prepara un gel de agarosa al 2%, utilizando un matraz de Erlenmeyer con 35 ml de buffer TBE 1X y 0.7 gramos de agarosa, la mezcla se calentará hasta la ebullición (aproximadamente durante 80 segundos). Se agregará inmediatamente 3  $\mu$ l de SYBR Green al 1% y se mezcla hasta quedar homogéneo. Esta mezcla se añade al sistema de electroforesis y se coloca el peine sobre la mezcla, se deja reposar hasta que se forme un gel (aproximadamente 15 minutos). El peine del gel es removido para formar los pocillos en donde serán cargados los amplicones del PCR. Una vez finalizado el proceso de amplificación, se retiran los tubos del termociclador y se mezcla 5  $\mu$ l de Marcador de peso molecular con 2  $\mu$ l de buffer de carga 6X y 12  $\mu$ l de los amplicones de PCR con 3  $\mu$ l de buffer de carga 6X. Se cargan las mezclas en los

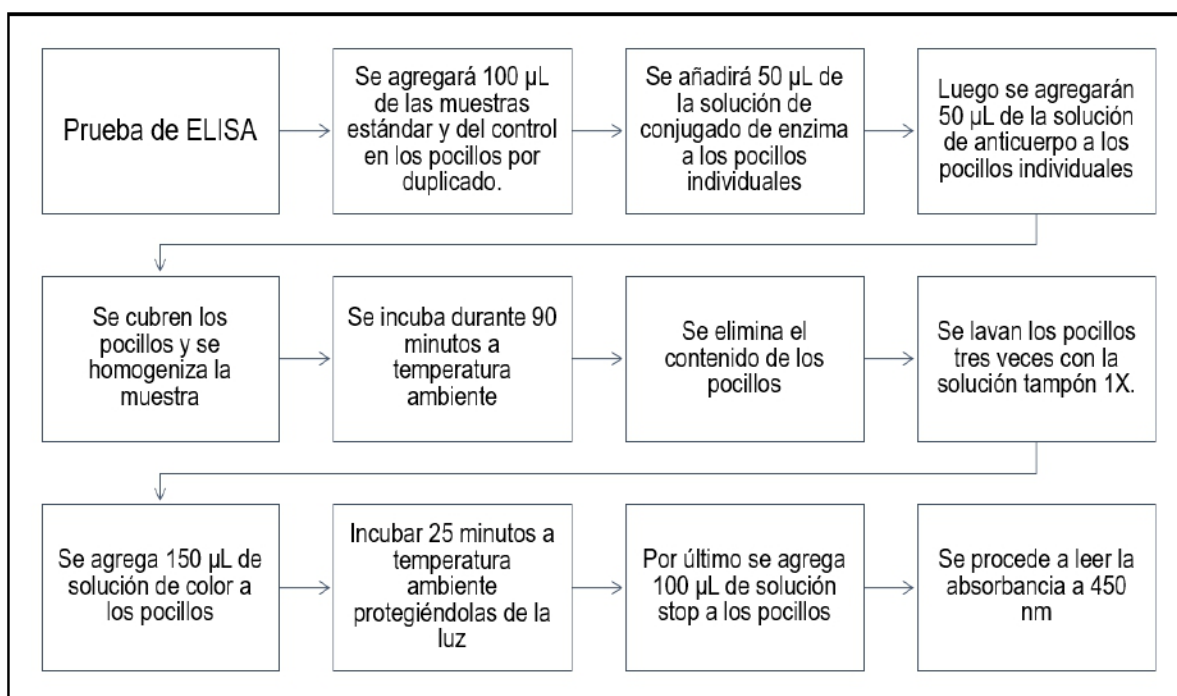
pocillos del gel y se programa la fuente de poder a 100 volts durante 60 minutos. Terminado el proceso se coloca el gel en el transiluminador de luz UV.

## 2.3.3 Procedimiento de Análisis Serológico

### 2.3.3.1 Prueba de Microcistina-DM ELISA

La prueba es un método ELISA competitivo directo y se basa en el reconocimiento de microcistinas, nodularinas y sus variantes por un anticuerpo monoclonal.

#### Procedimiento



**Figura 8.** Procedimiento del Ensayo de Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (kit Abraxis).

## **RESULTADOS**

### 3.1 Modelo de regresión logístico binario para el modelo general

El modelo de regresión logístico binario permite conocer la influencia de las variables independientes, en este caso, las dos variables: fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y temperatura (Temp), sobre la variable de respuesta que será la presencia de los genes (*mcyB* y *mcyE*) de la toxina microcistinas.

La variable dependiente fue codificada como cero (0), para la condición genes *mcyB* y *mcyE* no detectado y uno (1), para la condición presencia de los genes *mcyB* y *mcyE* (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Codificación de la variable dependiente genes *mcyB* y *mcyE* en el modelo de regresión logístico binario.

<b>Codificación de la variable dependiente</b>	
<b>Valor original</b>	<b>Valor interno</b>
<i>mcyB/mcyE</i> no detectados	0
<i>mcyB/mcyE</i> detectados	1

Al ejecutar el modelo de regresión logístico binario con todas las variables vemos que los coeficientes asociados a las variables son significativos solamente para  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y Temp ( $p = 0,009$ ,  $p = 0,030$  y  $p = 0,007$ ) (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Variables en la ecuación del modelo de regresión logístico binario

	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1 <sup>a</sup>								
NO2	165.623	148.093	1.251	1	.263	8.496E+71	.000	9.691E+197
NO3	-4.684	4.550	1.060	1	.303	.009	.000	69.038
PO4	-250.984	96.190	6.808	1	.009	.000	.000	.000
SO4	.126	.058	4.715	1	.030	1.135	1.012	1.272
TURBIEDAD	-.058	.053	1.172	1	.279	.944	.851	1.048
ALCALINIDAD	.036	.031	1.345	1	.246	1.037	.975	1.102
MC	40.277	21.548	3.494	1	.062	310468420064209790.000	.141	68144885022967260000000000000000000.000
pH	-.586	.871	.452	1	.501	.557	.101	3.071
Temp	-1.639	.611	7.182	1	.007	.194	.059	.644
CHL	.105	.107	.962	1	.327	1.111	.901	1.370
YLD	-5.893	3.866	2.323	1	.127	.003	.000	5.389
PCCHL	1.001	.884	1.282	1	.258	2.722	.481	15.405
Constante	51.444	19.912	6.675	1	.010	21973795716380330000000.000		

a. Variables especificadas en el paso 1: NO2, NO3, PO4, SO4, TURBIEDAD, ALCALINIDAD, MC, pH, Temp, CHL, YLD, PCCHL.

Al ejecutar el modelo de regresión logístico binario con las tres variables vemos que los coeficientes asociados a las variables PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y Temp son significativos ( $p = 0,004$  y  $p = 0,006$ ) (Cuadro 8). Mientras que el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> reveló no ser significativo. Por tanto, la OR = Exp (B) estimada, no es factor de riesgo en este modelo sino un factor protector.

**Cuadro 8.** Variables para incluir en la ecuación del modelo de regresión logístico binario

Variables en la ecuación								
	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1 <sup>a</sup>								
PO4	-217.500	76.224	8.142	1	.004	.000	.000	.000
Temp	-.873	.316	7.649	1	.006	.418	.225	.775
Constante	28.673	9.410	9.284	1	.002	2833520168316.170		

a. Variables especificadas en el paso 1: PO4, Temp.

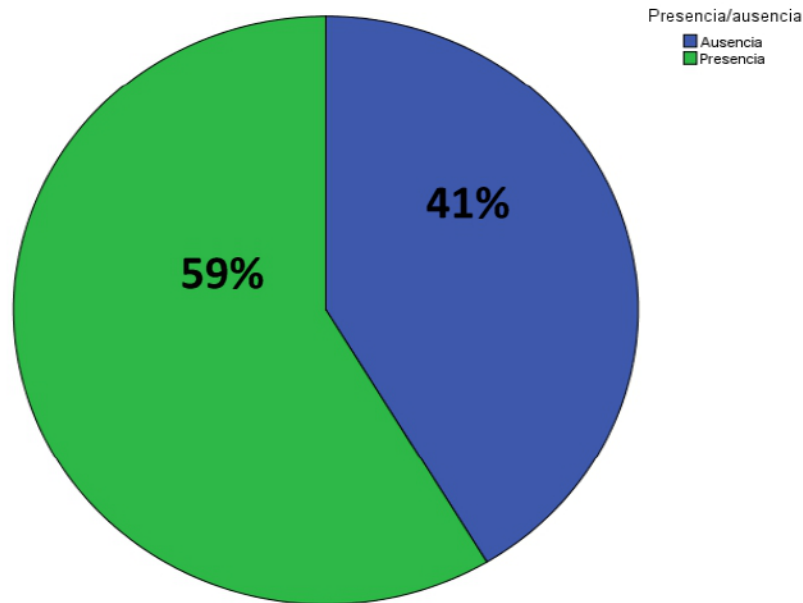
Con estos datos podemos construir la ecuación de regresión logística, que sería:

$P$  (Estado = presencia de los genes (*mcyB* y *mcyE*) =  $1 / 1 + \exp(28,673 - 217,500 \times PO_4^{3-} - 0,873 \times \text{Temp})$

### 3.2 Estadística descriptiva de la presencia de los genes *mcyB* y *mcyE* en el Embalse Gatún

#### 3.2.1 Genes presentes en el Embalse Gatún

Al evaluar la presencia de los genes colectamos un total de 90 muestras. El 59% (53) corresponde a la condición genes *mcyB* y *mcyE* detectado y el 41% (37) corresponde a la condición genes *mcyB* y *mcyE* no detectado (figura 9).



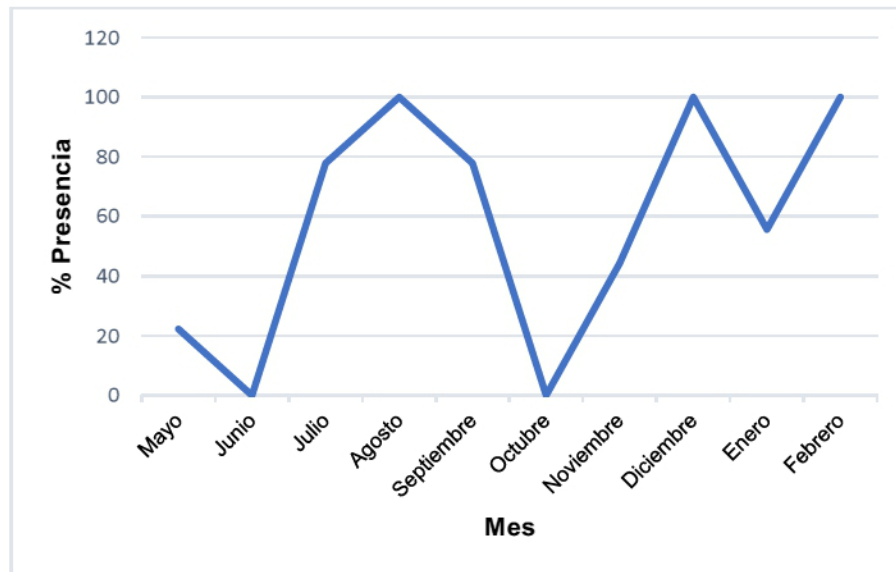
i

**Figura 9.** Presencia de los genes *mcyB* y *mcyE* en el Embalse Gatún en Panamá.

#### 3.2.2 Distribución mensual de los Genes en el Embalse Gatún

La figura 10, corresponde a la distribución mensual de la presencia de los genes *mcyB* y *mcyE* encontrados en los meses, donde podemos observar que los porcentajes más

bajos se registran en mayo (22.2%), junio y octubre (0%). Mientras que los meses donde más prevalecieron los genes fueron en agosto y diciembre (100%).



**Figura 10.** Distribución mensual de la presencia de los genes *mcyB* y *mcyE* en el Embalse Gatún desde mayo 2019-Febrero 2020.

### 3.2.3 Análisis descriptivo de las variables asociadas a la presencia de las Cianobacterias

Al estudiar las distintas variables, observamos que las que presentan mayor variación en los registros para el modelo general corresponden a los sulfatos, turbiedad y alcalinidad (desviación de 8.09 mg/L, 10.90 NTU y 15.59 mg/L respectivamente).

La clorofila presentó un valor mínimo de 0.64 µg/L mientras que el máximo fue de 25.68 µg/L, de igual modo la temperatura presentó un valor mínimo de 25.46 °C y un valor máximo de 31.64 °C.

La eficiencia fotosintética presentó resultados bajos (0.01-0.57 Fv/Fm). El pH se mantuvo en un rango de 6-9. Las microcistinas y fosfatos presentes en el agua se mantuvieron debajo del límite de detección (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Análisis descriptivo de las variables fisicoquímicas asociadas a la presencia de cianobacterias.

	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	90	0.000	0.016	0.0016	0.003
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	90	0.011	0.501	0.086	0.130
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	90	0.000	0.024	0.012	0.005
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	90	0.110	36.920	13.974	8.093
pH	89	6.00	9.00	7.36	0.441
Temp (°C)	90	24.46	31.64	29.27	1.045
CHL (µg/L)	90	0.64	25.68	5.79	3.834
FIC: CHL (µg/L)	90	0.059	0.970	0.506	0.462
YLD (Fv/Fm)	90	0.01	0.57	0.198	0.139
Turbiedad (NTU)	90	0.42	82.10	6.90	10.896
Alcalinidad (mg/L)	90	12.20	63.30	35.24	15.586
MC (µg/L)	90	0.000	0.100	0.042	0.023

### 3.3 Correlaciones de las variables asociadas a la presencia de las cianobacterias

Se calculó la matriz de correlación de Spearman con el objetivo de evaluar las asociaciones que hay entre las variables. Se encontró que la variable clorofila (CHL) con el pH tiene un coeficiente de correlación de  $r=-0.318$  ( $p < 0.05$ ) y el pH con el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presenta un coeficiente de correlación de  $r = -0.347$  ( $p < 0.05$ ) ambos casos son

significativos y se observa una correlación inversa (-), a medida que un valor aumenta el otro disminuye.

Otras correlaciones significativas encontradas fue la CHL con el  $\text{NO}_3^-$  ( $r= 0.257^*$ ,  $p=0.014$ ), la temperatura y el  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $r= -0.037$ ,  $p=0.020$ ), CHL y  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $r= -0.241^*$ ,  $p=0.022$ ) y el  $\text{NO}_3^-$  con el  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $r=.257^*$ ,  $p= 0.014$ ) (Cuadro10 y figura 11).

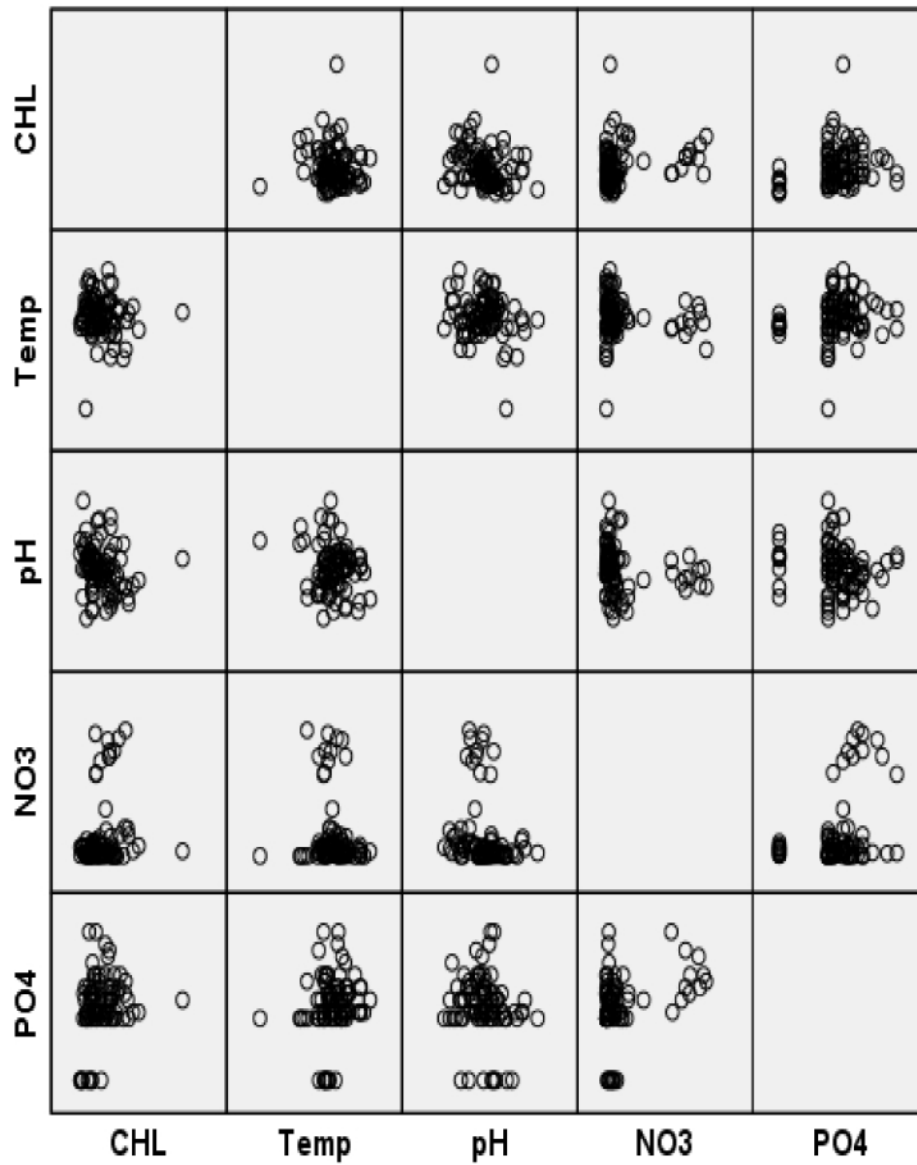
**Cuadro 10.** Análisis de correlaciones de las variables asociadas a la presencia de las cianobacterias.

			CHL	Temp	pH	NO3	PO4
Rho de Spearman	CHL	Coeficiente de correlación	1.000	-.162	-.318**	.257*	.241*
		Sig. (bilateral)	.	.127	.002	.014	.022
		N	90	90	89	90	90
	Temp	Coeficiente de correlación	-.162	1.000	-.037	-.100	.244*
		Sig. (bilateral)	.127	.	.733	.349	.020
		N	90	90	89	90	90
pH	Coeficiente de correlación	-.318**	-.037	1.000	-.347**	-.208	
	Sig. (bilateral)	.002	.733	.	.001	.051	
	N	89	89	89	89	89	
NO3	Coeficiente de correlación	.257*	-.100	-.347**	1.000	.257*	
	Sig. (bilateral)	.014	.349	.001	.	.014	
	N	90	90	89	90	90	
PO4	Coeficiente de correlación	.241*	.244*	-.208	.257*	1.000	
	Sig. (bilateral)	.022	.020	.051	.014	.	
	N	90	90	89	90	90	

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

\* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

**3.4 Matriz de dispersión de las variables asociadas a la presencia de las cianobacterias.**



**Figura 11.** Dispersión Matricial de las variables asociadas a la presencia de las cianobacterias.

## DISCUSIÓN

#### **4.1 Análisis General de la presencia de los genes *mcyB* y *mcyE* en el embalse Gatún**

En este proyecto, los cebadores evaluados para amplificar regiones de ADN de interés permitieron obtener resultados positivos (59%) en las muestras de agua del embalse Gatún, genes que codifican para ficocianina de cianobacterias y algunas enzimas que forman parte de un complejo multienzimático involucrado en la biosíntesis de la toxina llamada microcistina (*mcyB* y *mcyE*). Estos resultados son importantes debido a que son indicadores de la presencia de cepas de cianobacterias con potencial toxicidad en el embalse, destinados para la potabilización de agua en centros urbanos de la ciudad de Panamá.

La amplificación de fragmentos de la región *cpc*-IGS específica de cianobacterias en muestras de agua de embalses, puede dar una idea inicial de la presencia de cianobacterias. No obstante, su identificación en muestras de agua no permite determinar cuáles cepas o géneros de cianobacterias están presentes en las muestras evaluadas. Sin embargo, los cebadores evaluados para los genes relacionados con toxicidad *mcyB* y *mcyE*, ayudaron a detectar regiones relacionadas con cepas y géneros cianobacterianos como *Microcystis* con potencial toxicidad.

#### **4.2 Análisis de la distribución mensual de los Genes *mcyB* y *mcyE* en el Embalse Gatún**

Al observar el gráfico (figura 10) podemos señalar que durante algunos meses se encuentra la presencia de las cianobacterias en todos los sitios, mientras que en otros están completamente ausentes.

El reporte anual de la Autoridad del Canal de Panamá brinda información en cuanto a los niveles de agua dentro del Embalse Gatún. En el año 2019, el nivel del agua en el Embalse se encuentra debajo del nivel promedio normal durante todo el año, este es un factor para considerar en cuanto a la presencia de colonias de cianobacterias (fig. 28).

En los meses de junio y octubre, disminuyó en los sitios la presencia de los genes productores de toxinas. Podemos señalar que la intensidad de luz puede ser un factor adicional a las variaciones, según Vela (2007), muchas cianobacterias son sensitivas a periodos prolongados de intensidad alta de luz afectando su crecimiento y desarrollo. Además, lluvias torrenciales y más frecuentes pueden modificar la estratificación del agua, nutriendo estas aguas o llevando a otros sitios los nutrientes (Chorus *et. al.*, 2021), de igual modo, la velocidad del viento es otro factor que debe tomarse en consideración, ya que puede arrastrar estos crecimientos a otros sitios.

Datos del centro de meteorología ETESA denotan que en el mes de agosto días antes de la toma de muestras hubo variaciones en las precipitaciones, es decir, se presentaron días de precipitaciones altas intercalado de periodos secos. El patrón de la lluvia afecta o beneficia la dinámica de las cianobacterias. Los hallazgos muestran que lluvias intensas y de alta frecuencia seguidas de largos períodos secos (4 a 10 días) son ideales para el crecimiento de cianobacterias (Bartosiewicz *et. al.*, 2019). Sin embargo, las fuertes lluvias frecuentes también tienen el potencial de eliminar las cianobacterias y provocar la desaparición de la estratificación. Por el contrario, un alto número de pequeños eventos de lluvia podrían promover el crecimiento al proporcionar continuamente nutrientes (Paerl y Paul, 2012; Coffey *et al.*, 2018).

En diciembre 2019, enero y febrero 2020, las precipitaciones disminuyeron, empezando la temporada seca y beneficiando el estancamiento de las aguas. Una tasa de intercambio de agua baja suele ser una condición que favorece la formación de cianobacterias. Dado que las cianobacterias crecen bastante lentamente, necesitan suficiente tiempo de residencia en el cuerpo de agua para establecer grandes poblaciones, a menudo en el rango de semanas. Los altos caudales de los ríos diluirán y eliminarán las cianobacterias más rápido de lo que pueden crecer, y las floraciones son poco probables en lagos y embalses con tiempos de retención de agua inferiores a un mes (Chorus *et. al.*, 2021).

### **4.3 Análisis de los factores ambientales asociados a la presencia de los genes de cianobacterias**

#### **4.3.1 Nitritos**

Los nutrientes son factores limitantes en el ecosistema. Al analizar los valores de nitrito en las muestras podemos ver que las mediciones son muy pequeñas en un rango de 0.00-0.016. Esto concuerda con diferentes estudios los cuales mencionan que en aguas naturales los nitritos rápidamente se oxidan convirtiéndose en nitratos por acción de las bacterias y su presencia es indicativa de procesos biológicos activos (ACP, 2011).

#### **4.3.2 Nitratos**

Al analizar los valores de  $\text{NO}_3$  en el agua podemos denotar que algunos valores superaron el valor aceptado en el límite de detección (0.1 mg/L), y se dieron en las estaciones de Gamboa (DC1) y Paraíso (TMR):

- DC1: 0.470 mg/L (mayo), 0.400 mg/L (junio), 0.501 mg/L (julio), 0.381 mg/L (agosto), 0.400 mg/L (septiembre), 0.336 mg/L (noviembre).
- TMR: 0.464 mg/L (junio), 0.488 mg/L (julio), 0.419 mg/L (agosto), 0.422 mg/L (septiembre), 0.330 mg/L (noviembre).

La presencia de estas concentraciones de nitrato es indicativa de una posible mayor actividad de los organismos autotróficos oxidantes de amonio y nitrito que estuvieron presentes en el agua durante la toma de muestras. Siendo que estos valores fueron encontrados durante la estación lluviosa, existe la posibilidad de que las escorrentías en los sitios de Gamboa y Paraíso, junto con las características hidráulicas de estos sitios (movilidad del agua, tiempos de residencia) hayan propiciado dicha producción de nitrato.

#### **4.3.3 Fosfato**

De los 90 resultados obtenidos al analizar los fosfatos, todos los valores se encuentran en el rango límite de detección del método (0.02 mg/L). Las concentraciones promedios más altas se dieron en las estaciones Gamboa (DC1), Toma de agua de Cuipo (TAC), Escobal (ESC), Paraíso (TMR) con valores de 0.022 mg/l (septiembre), 0.022 mg/l (octubre), 0.024 mg/l (octubre) y 0.024 mg/l (noviembre) respectivamente.

El fósforo es un elemento frecuentemente limitante para el crecimiento del fitoplancton en lagos y embalses. Por lo tanto, los sistemas celulares de incorporación del nutriente se activan y el ion fosfato, disponible es rápidamente utilizado por los organismos (Rigler, 1956). Como consecuencia de la concentración de fosfato ambiental decrece hasta el nivel estacionario, llamado valor umbral (Falconer, 1989). La incorporación y

el crecimiento posterior es posible sólo si la concentración ambiental de fosfato excede el valor umbral, el cual usualmente se encuentra por debajo del límite de detección de los métodos analíticos convencionales (Rigler, 1956; Falconer, 1989). Por lo tanto, la no detección de fosfato no implica que el nutriente no esté disponible, ya que puede ser incorporado por el fitoplancton hasta dos órdenes de magnitud por debajo del límite analítico (Aubriot, 2008). Sin embargo, no se puede afirmar que esta variable tenga una relación con la presencia de cianobacterias en el momento del estudio.

Un incremento en los niveles de fosfatos puede provocar en un crecimiento de las cianobacterias (ACP, 2011).

#### **4.3.4 Sulfatos**

El sulfato es uno de los principales constituyentes disueltos de la lluvia (ACP, 2006). Al observar la tabla vemos que los valores encontrados en los diferentes meses presentan una gran variación. El incremento en las concentraciones propias de sulfato puede deberse a la contaminación de las aguas naturales por contaminantes residuales afectando de manera importante la calidad del cuerpo de agua (López-Álvarez *et al.*, 2013).

#### **4.3.5 pH**

En cuanto a los valores de pH, se encontraron dentro del rango de 6-9, según Agrawal (2012), los entornos alcalinos suelen favorecer el crecimiento de cianobacterias, mientras que valores inferiores a 6.0 provocan una disminución o muerte de estos.

#### **4.3.6 Temperatura**

La temperatura en el agua presentó una gran variación (24°C-31°C). Según Reynolds y Wlasby (1975), la temperatura óptima para las afloraciones se encuentra en un rango de 25 °C-35 °C. El aumento de la temperatura del agua por encima de los 20 °C favorece el desarrollo de las cianobacterias, ya que incrementa las tasas de crecimiento y de reproducción celular.

Las temperaturas más altas se dieron durante el mes de junio, esto concuerda con las informaciones generadas en los medios de comunicación (La estrella de Panamá, 2019), que mencionaba que a pesar de que Panamá vivía una estación seca que es propia de la temporada, la transición hacia la estación lluviosa sería más tarde de lo usual. Para los meses de abril y mayo se dieron lluvias ligeras, mientras que junio fue más crítico, pues se registró una baja precipitación producto del fenómeno del niño.

#### **4.3.7 Clorofila**

El valor más alto reportado en nuestro estudio corresponde al sitio de Laguna alta durante el mes de junio (25.68 µg/L). La determinación de este pigmento permite conocer la biomasa fitoplanctónica de un cuerpo de agua que constituye un indicador de la productividad primaria y del estado de salud del recurso hídrico (ACP, 2011). Esta variable al considerarse una variable biológica es muy cambiante dependiendo de los niveles de producción dentro del embalse.

#### **4.3.8 Eficiencia fotosintética (YLD)**

Una eficiencia fotosintética alta (mayor a 0.8 Fv/Fm) significa un flujo de electrones mayor y por tanto una mejor utilización de la luz y posiblemente de los nutrientes por parte de las plantas (Magnusson, 1997).

Los promedios de eficiencia fotosintética del fitoplancton medidos en los distintos sitios fueron moderados a bajos (0.01-0.57 Fv/Fm). Para el fitoplancton se ha establecido que valores promedios por debajo de 0.65 Fv/Fm indican algún tipo de estrés fisiológico sufrido por las algas (Cullen y Davis, 2003).

Un 67.8% de las muestras se encuentran en una condición de estrés fisiológico y los sitios con mayor frecuencia registrada son TME, TMR, DC1 y LAT. Sin embargo, cuando las condiciones físicas y químicas mejoran las algas pueden incrementar su eficiencia fotosintética, tal vez como respuesta a una mayor disponibilidad de nutrientes (Pinilla, 2006).

#### **4.3.9 Turbiedad**

En cuanto a los valores de turbiedad en el agua son muy variados, el rango máximo encontrado fue de 82.1 NTU en DC1 durante el mes de julio, este valor puntual, puede indicar que hubo arrastre de materiales durante este mes. Estos cambios en la transparencia del agua pueden ser causados por arcilla, barro, materia orgánica, plancton y otros organismos microscópicos que interfieren con el paso de la luz a través del agua y aceleran la eutrofización (ACP, 2011).

La turbulencia del agua generalmente está asociada a la presencia del viento, y esta determina una disminución de la transparencia del agua por aumento de la turbidez,

actuando como un factor controlador de las floraciones, ya que ocasiona una disminución de la tasa de fotosíntesis y de la biomasa algal (Rosso y Giannuzzi, 2017).

#### **4.3.10 Alcalinidad**

La alcalinidad de aguas superficiales está determinada generalmente por el contenido de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos. El bicarbonato constituye la forma química de mayor contribución a la alcalinidad. Esta forma iónica y el hidróxido son particularmente importantes cuando hay gran actividad fotosintética de algas y respiración celular o cuando hay descargas industriales en un cuerpo de agua (ACP, 2011). En nuestros análisis los valores obtenidos de alcalinidad se encontraron en un rango de 12.2-63.3. Registrándose los niveles más altos en el sitio TMR. Es importante señalar, que la alcalinidad ha sido utilizada como un indicador de la productividad en los lagos, donde niveles de alcalinidad altos indican una productividad alta en el agua (Espinosa y Rodríguez, 2016)

#### **4.3.11 Microcistinas**

Los análisis realizados para la presencia de microcistinas (MC) en los diferentes sitios muestran que todos los valores se encuentran por debajo del límite de detección del método (Elisa), lo cual indica que los genes se encuentran presentes, pero no han expresado su toxicidad en el agua.

En los análisis moleculares se encuentran la presencia de los genes productores de toxinas, sin embargo, en los análisis de la toxina (método ELISA) no se encuentran presentes. Unas posibles razones que explican esto puede ser que el número de células que se encuentran en la columna de agua estén vivos, ya que generalmente cuando las células mueren liberan las toxinas o que la cantidad de cianobacterias

presentes en el agua no determina una población significativa para la producción de microcistinas (Castillo, 2015).

Las microcistinas se han considerado como metabolitos secundarios, aunque dada la complejidad de su estructura y el sistema de biosíntesis tan complicado que presentan, parece extraño que las cianobacterias productoras sintetizen este compuesto en cantidades tan elevadas si no les aporta ningún beneficio (Young *et al.*, 2005). Por eso se lleva especulando muchos años sobre el posible papel que pueden ejercer estas moléculas en las células productoras, así como en el exterior celular (Marisela, 2015). Se ha propuesto varias funciones para ella sin haber llegado a una conclusión clara.

#### **4.4 Análisis de las correlaciones y matriz de dispersión asociadas a la presencia de los genes**

En cuanto a la relación del pH y la clorofila. El pH en el agua juega un papel muy importante en las actividades fisiológicas y metabólicas de las cianobacterias. Influye fuertemente en la fisiología celular, la morfología de las colonias y la actividad fotosintética (Shruthi y Rajashekhar, 2014). Por lo tanto, un microambiente alcalino creado dentro de las colonias puede beneficiar la absorción de nutrientes y la fotosíntesis de las colonias, lo cual es un factor clave para que las cianobacterias superen a otras algas y sean las especies dominantes en la floración. pH ligeramente alcalinos favorecen el proceso de fotosíntesis de las colonias de cianobacterias ayudando a su proliferación (Fang *et. al.*, 2015), mientras que, pH ácidos no permite su desarrollo y tasas de crecimiento.

La concentración de carbono inorgánico disuelto en el agua puede afectar la estabilidad del pH cuando algunas especies no pueden mantener un equilibrio con el

pH externo del medio. Nuestros resultados indican que a medida que una variable aumenta, ya sea el pH o la clorofila, la otra variable va a disminuir.

Si vemos el efecto que tiene el pH con el Nitrato podemos señalar que concentraciones altas de nitrato pueden bajar el pH, haciendo que el agua sea más ácida. La mayoría de la vida acuática solo puede tolerar un pH de 6 a 9, pero si el pH fluctúa fuera de este rango, podría indicar un cambio en la concentración de nitrato o un cambio en la concentración de dióxido de carbono disuelto (Willis, 2020). Es decir, su relación es inversa a medida que el Nitrato aumenta el pH disminuye.

Los resultados de las correlaciones también ilustraron que hubo una relación proporcional, entre la clorofila y el fosfato ( $r= 0.241^*$ ) y la clorofila y el nitrato ( $r= 0.257^*$ ). Ha habido un pequeño número de análisis exhaustivos de la forma de las relaciones fósforo-clorofila. La relación fósforo-clorofila probablemente resulte de la dependencia de las tasas de crecimiento de algas en la disponibilidad de fósforo (McCauley *et al.*, 1989). Esto sugiere que P puede ser el elemento para controlar el crecimiento de algas (Dillon & Rigler, 1974). De igual modo, existe una relación clorofila-nitrógeno que puede limitar las poblaciones de algas en agua dulce.

El nitrógeno es el principal nutriente limitante para la producción de fitoplancton (Downing, 1997), sin embargo, cuando hay una limitante en el nitrógeno disponible el fósforo se convierte en el principal nutriente, es decir, cuando la proporción de nitrógeno total a fósforo total se mueve por debajo de 10, el nitrógeno puede volverse limitante.

Además, el P controla la biomasa de fitoplancton en numerosos sistemas de agua dulce y similitudes en la fisiología del fitoplancton y los requerimientos de nutrientes en los sistemas de agua dulce (Bbalali *et al.*, 2013).

Respecto a la correlación entre la temperatura y el fosfato podemos mencionar que el fósforo se encuentra en los sedimentos de los lagos tanto en forma orgánica como inorgánica. El fósforo inorgánico generalmente se asocia con formas amorfas y cristalinas de Fe, Al, Ca y otros elementos. El fósforo orgánico varía en la facilidad de descomposición, por lo tanto, en la biodisponibilidad del fosfato (Reddy *et al.*, 1999).

La transformación de los compuestos de fosfato en los sedimentos depende en gran medida de los parámetros ambientales, siendo los más importantes la temperatura y el potencial redox (Chen *et al.*, 2014). Por lo general, un aumento de la temperatura agota el fósforo orgánico lábil (Spears *et al.*, 2007). Además, el ciclo interno del fósforo en los sedimentos puede mejorar con el aumento de las temperaturas, lo que lleva a una eutrofización más significativa (Genkai-Kato *et al.*, 2005). Aunque el aumento de las temperaturas da como resultado niveles más altos de liberación de P (Jiang *et al.*, 2008), especialmente en conjunto con condiciones anóxicas extendidas (Wilhelm & Adrian, 2008), una fracción sustancial de P aún permanece enterrada en los sedimentos. Los mecanismos detrás de estos cambios en los depósitos de P, así como el impacto de los cambios de temperatura estacionales y la biomasa de floración de la cianobacterias sedimentada en el movimiento de P entre depósitos en condiciones anaeróbicas, no han sido bien estudiados. El ciclo del fósforo también está entrelazado con el ciclo del hierro y el azufre. En condiciones anaeróbicas, tanto la reducción de

hierro como la de sulfato aumentan la liberación de fósforo de los sedimentos (Rozan *et al.*, 2002).

En cuanto a la relación entre el nitrato y el fosfato, vemos que puede existir un efecto dual de nitrato sobre la liberación de P en los sedimentos de los lagos en zonas poco profundas. Los niveles de nitrato presentes pueden a bien reducir la liberación de P al mejorar la oxidación de los sedimentos, o puede promover la liberación de P al estimular el crecimiento del fitoplancton, sin embargo, altos niveles de nitrato no tienen ningún efecto sobre el fósforo (Ma *et al.*, 2021). En nuestro estudio podemos ver que nuestra correlación es directa, a medida que el nitrato aumenta se promueve el incremento del fosfato, pudiendo promover su liberación estimulando el crecimiento en el fitoplancton.

## **CONCLUSIONES**

- ❖ Mediante el modelo de regresión logístico binario se pudo encontrar una asociación significativa entre las variables fosfato y temperatura con la presencia/ausencia de los genes *mcyB* y *mcyE*.
- ❖ El 59% de las muestras analizadas corresponde a la condición genes *mcyB* y *mcyE* detectado.
- ❖ Se identificó la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas en el embalse Gatún.
- ❖ La metodología empleada para identificar la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas es confiable ya que en los meses de agosto, diciembre y febrero se obtuvo el mayor porcentaje de cianobacterias potencialmente tóxicas, mientras que en los meses de mayo, junio y octubre se obtuvieron los menores porcentajes de su presencia.
- ❖ La clorofila presentó un valor mínimo de 0.64 µg/L mientras que, el valor máximo fue de 25.68 µg/L, el cual fue encontrado en el mes de junio en el sitio Laguna Alta.
- ❖ Un 67.8% de las muestras se encuentran en una condición de estrés fisiológico de las cianobacterias (valores promedios debajo de 0.65 Fv/Fm) y los sitios con mayor frecuencia registrados fueron TME, TMR, DC1 y LAT.
- ❖ No se detectó la presencia de las toxinas de cianobacterias en el Embalse Gatún, aunque los genes *mcyB* y *mcyE* se encuentran presentes.
- ❖ Existen correlaciones significativas entre la CHL y el pH, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con la vigilancia y seguimiento en la calidad del agua del embalse Gatún, tomando en consideración las cianobacterias y la medición de los parámetros de calidad del agua que puedan estar relacionados con las cianobacterias.
- De igual modo, que el plan de vigilancia pudiera evaluar otros grupos de cianobacterias que puedan estar presentes en el agua.
- Para la aplicación de otros modelos se podría analizar los niveles de radiación, temperatura del ambiente y precipitaciones que puedan estar asociados a las cianobacterias.
- A pesar de que el método de PCR convencional es una tecnología que permite determinar si se encuentran los genes presentes, se podría complementar utilizando un PCR en tiempo real.
- Se podría desarrollar una metodología para realizar secuenciaciones, de modo, que se puedan conocer que especies de cianobacteria se encuentran presentes y realizar arboles filogenéticos.
- Planificar medidas de prevención o mitigación en caso de haber afloramientos o señales de este.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Aguilera, A., Valeria, M., Andrinolo, D., Bauzá, L., Benítez, R., De Titto, E., Echenique, R., Giannuzzi, L., Hansen, M., Kolman, M., Petcheneshsky, T., Rosso, L., Ruiz, M., Salerno, G., Sedan, D., Wunderlin, D. (2011). *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud*. 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación.

Agrawal, SC. (2012). Factors controlling induction of reproduction in algae-review: the text. *Folia Microbiol* 57(5):387–407. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0147-0>

Almanza, V., Parra, O., Bicudo, C., Sant'Anna, C., Figueroa, R., Urrutia, R., Lara, F., Beltrán, J., Baeza, C., González, P. (2016). *Guía Para El Estudio de Cianobacterias en el sistema lacustre del Gran Concepción: aspectos taxonómicos, ecológicos, toxicológicos y de control-vigilancia*. Centro de Ciencias Ambientales, EULA-Chile, Universidad de Concepción. Trama Impresores, 96 pp.

Andrinolo, D., Sedan, D. (2017). *Cianotoxinas. Farmacología y efectos de las principales toxinas presentes en Argentina. Microcystinas, Saxitoxinas, Anatoxinas, Cylindrospermopsinas, Lipopolisacáridos*. Universidad de la Plata. Capítulo 3. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/72648/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/72648/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Anónimo. (2020). *Floraciones de Cianobacterias: causas, riesgos y tratamiento*. Disponible en: <https://www.lgsonic.com/es/cianobacterias/>

Anónimo. (2002). *Parámetros físico-químicos: Luz*. En anónimo, *Parámetros físico-químicos* (págs. 1-16). Mayagües: Universidad de Puerto Rico.

Arrigo, K. (2005). *Marine microorganisms and global nutrient cycles*. *Nature* Vol 437: 349-355 doi:10.1038/nature04158

Aubriot, L. (2008). *Flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones en el suministro del nutriente*. Tesis de doctorado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias – PEDECIBA.

Autoridad del Canal de Panamá (ACP). (2011). *Informe de Calidad de agua en la cuenca del Canal 2010*. [Archivo PDF]. Disponible en: <https://wpeus2sat01.blob.core.windows.net/micanaldev/2018/cuencahidrografica/2010.pdf>

Autoridad del Canal de Panamá (ACP). (2006). *Informe de Calidad de agua en la cuenca hidrográfica del Canal de Panamá 2003-2005. Volumen II*. [Archivo PDF]. Disponible en: <https://micanaldepanama.com/wp-content/uploads/2020/02/2003-2005-vol-ii.pdf>

Avendaño, A., Arguedas, C. (2006). *Microcistina en plantas de tratamiento de agua para consumo humano en un ambiente tropical: el Área Metropolitana de Costa Rica*. *Rev. Biol. Trop* Vol. 54 (3): 711-716

Azevedo, S., Carmichael, W., M Jochimsen, E., L Rinehart, K., Lau, S., Shaw, G., Eaglesham, G. (2003). Human Intoxication by Microcystins during Renal Dialysis Treatment in CaruaruBrazil. *Toxicology*. 181-182: 441-446. Doi:10.1016/S0300-483X(02)00491-2

Balali, S.; Hoseini, S.; Ghorbani, R.; Kordi, H. (2013). Relationships between Nutrients and Chlorophyll a Concentration in the International Alma Gol Wetland, Iran. *J Aquac Res Development* 4: 173 doi:10.4172/2155-9546.1000173

Bartosiewicz, M.; Przytulska, A.; Deshpande, B.N.; Antoniadis, D.; Cortes, A.; MacIntyre, S.; Lehmann, M.F.; Laurion, I. (2019). Effects of climate change and episodic heat events on cyanobacteria in a eutrophic polymictic lake. *Sci. Total Environ* 693, 133414.

Bebout B., Garcia-Pichel F. (1995). UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4215–4222.

Beversdorf, L., Chaston, S., Miller, T., McMahon, K. (2015). Microcystin mcyA and mcyE gene abundances are not appropriate indicators of Microcystin concentrations in lakes. *PLoS ONE* 10(5): e0125353. doi:10.1371/journal.pone.0125353

Bekker, A, Holland, H., Wang, P., Rumble, D., Lii, H., Stein, J., Hannah, L., Coetzee, L., Beukers. H. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*. 427: 117–120.

Bhaya, D. (2004). Light matters: phototaxis and signal transduction in unicellular cyanobacteria, *Mol. Microbiol.* 53 (3): 745–754.

Bonilla, S. (2009). Cianobacterias Planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión (Documento técnico N° 16). Uruguay: Programa Hidrológico Internacional (PHI) de la Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República.

Bouaicha, N., Miles, C.O., Beach, D.G., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N.Y. Nguyen-Qang, T. (2019). Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins*. 11 (12): 714. Doi:10.3390/toxins11120714

Bultel-Poncé V., Felix-Theodore F., Sarthon C., Ponge J., Bodo B. (2004). New pigments from the terrestrial cyanobacterium *Scytonema* sp. collected on the Mitaraka Inselberg, French Guyana, *J. Nat. Prod.* 67: 678–681.

Cantoral, U., Arturo, E., Martínez, A., Dolores, A., Sanjurjo, M. (2017). Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiológica*, 27(2), 241-251. Recuperado en 15 de julio de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-88972017000200241&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972017000200241&lng=es&tlng=es).

Carmichael, W. (2001). Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Human and Ecological Risk Assessment*. 7: 1393–1407.

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

Carmichael, W., Boyer, G. (2016). Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful Algae.* 54: 194-212. Doi:10.1016/j.hal.2016.02.002

Carmichael, W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites, the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 445-459. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.

Castenholz, R., Waterbury, J. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3, pp. 1710–1799.

Castillo, M. (2015). Factores Ambientales que influyen en la presencia de Microcistinas en Aguas de la Cuenca del Canal de Panamá. Tesis de Maestría Universidad de Panamá.

Cazenave, J., Wunderlin, M., Bistoni, M., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C. (2005). Uptake, tissue distribution and accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.*, 75.278-190.

Ceballos, L. (2012). Análisis transcripcional de la expresión de genes implicados en la síntesis de la cianotoxina microcistina como respuesta a lindano. Zaragoza, España. Tesis. 13pp.

Chacon, N.; Silver, WL.; Dubinsky, EA.; Cusack, DF. (2006). Reducción de hierro y solubilización del fósforo del suelo en suelos de bosques tropicales húmedos: las funciones de las reservas de carbono lábil y un compuesto transportador de electrones. *Biogeoquímica* 78: 67–84.

Chen, M.; Ye, T-R.; Krumholz, LR.; Jiang, H-L. (2014). Temperature and Cyanobacterial Bloom Biomass Influence Phosphorous Cycling in Eutrophic Lake Sediments. *PLoS ONE* 9(3): e93130. doi:10.1371/journal.pone.0093130

Chorus, I., Welker, M. (2021). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>

Chorus, I., Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO. E and FN Spon, London, 416 p.

Chorus, I., Falconer, J. (1998). Riesgos a la salud causados por cianobacterias y algas de agua dulce en aguas recreacionales. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/237789699>

Cobo, F. (2015). Métodos de control de las floraciones de cianobacterias en aguas continentales. Volumen 34: (1): 247-268. DOI: 10.23818/limn.34.20

Codd, GA., Ward, Cl., Beattie, KA., Bell, SG. (1999). Widening Perceptions of the Occurrence and significance of Cyanobacterial Toxins. En: Peschek GA, Löffelhardt W, Schmetterer G. *The Phototrophic Prokaryotes*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp. 623-632.

Coello, D., Cajas, J. (2005). Distribución y abundancia del plancton en el embalse Chongón (marzo 2003-marzo 2004). Instituto Nacional de Pesca

Coffey, R., Paul, M., Stamp, J., Hamilton, A., Johnson, T. (2018). A Review of Water Quality Responses to Air Temperature and Precipitation Changes 2: Nutrients, Algal Blooms, Sediment, Pathogens. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 55, 844–868.

Cohen, S, Reif, C. (1953). Cutaneous sensitization to blue-green algae. *J. Allergy* 24, 452-457.

Comba, N. (2009). Las Cianobacterias como indicadores de la calidad del agua en el Embalse de Betania (Cuenca alta del Río Magdalena). Colombia, Universidad de Bogotá.

Conde F., Churio M., Previtali C. (2000). The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 56: 139–144.

Crowter, J. (2009). *The ELISA guidebook*. Second Edition. Inglaterra. Editorial Humana Press. 8-89 pp.

Cullen, J., Ciotti, A., Davis, R., Lewis, M. (1997). Optical detection and assessment of algal blooms. *Limnology and Oceanography*, 42(5): 1223-1239.

Daniel, E., Aniel, E., Shireman, J. (1994). Factors influencing the abundance of blue-green algae in southern waters. *Journal of the World Aquaculture Society*. 14: 65-68.

Dawson, R. M. (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36(7), 953-962.

De León, L. (2002). Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. *Nordan-Comunidad*, Montevideo, p.28-37.

Dillon, P.: Rigler, F. (1974). The phosphorus-chlorophyll relationships in lakes. *Limnol Oceanogr* 19: 767-773.

Dittmann, E., Fewer, D., Neilan, B.A. (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 23–43.

Dodds, W., Bouska, W., Eitzmann, J., Pilger, T., Pitts, K. (2009). Eutrophication of US freshwaters: analysis of potential economic damages. *Environ Sci Technol.* 43: 12–19.

Downing, J. (1997) Marine nitrogen: Phosphorus stoichiometry and the global N:P cycle. *Biogeochemistry* 37: 237-252.

Edge, R., McGarvey, D., Truscott, T. (1997) The carotenoids as anti-oxidants a review. *Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 189-200.

Essers J., Vermeulen, W. (2006). Houtsmuller, DNA damage repair: anytime, anywhere?, *Curr Opin. Cell Biol.* 18 (2006) 240–246.

Espinosa, M., Rodriguez, C. (2016). Determinación del índice de calidad del agua (ICA), de los ríos Morón y Patanemo del Estado Carabobo, en Venezuela. *Revista INGENIERÍA UC*, vol. 23 (2): 204-215 Universidad de Carabobo Carabobo, Venezuela.

Estrella de Panamá. (2019). Fenómeno de El Niño se extenderá hasta octubre. Disponible en <https://www.laestrella.com.pa/nacional/190326/nino-octubre-fenomeno-extendera>

Evangelista, V., Barsanti, L., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Gualtieri, P. (2008). *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*: Springer. p. 398.

Falconer, I. (1989). Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes and rivers. *Toxicity assessment*, 175-184.

Fang, F., Yang, L., Gan, L., Guo, L., Hu, Z., Yuan, S., Jiang, L. (2014). DO, pH, and Eh microprofiles in cyanobacterial granules from Lake Taihu under different environmental conditions. *Journal of Applied Phycology*, 26(4), 1689–1699. doi:10.1007/s10811-013-0211-4

Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. (1999). The Toxicity of Cyanobacterial Toxins in the Mouse: I Microcystin-LR. *Human & Exp. Toxicol.* 18: 162-167.

FAY P. (1992). Oxygen relation of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews.* 56 (2): 45-58.

Fernandes, V., Cavati, B., de Oliveira, L., de Souza, B. (2009). Ecología De Cianobacterias: Factores Promotores E Consequências Das Florações. *Oecologia Australis*, 13(2), 247–258. Disponible en: <https://doi.org/10.4257/oeco.2009.1302.03>

Forján, E., Domínguez, M., Vílchez, C., Miguel, R., Costa, C., Reis, M. (2008). “Cianoalerta: estrategia para predecir el desarrollo de cianobacterias tóxicas en embalses”. *Ecosistemas*. Vol. 17, n. 1. ISSN 1697-2473, pp. 37-45

Gao, K., Li P., Watanabe, T., Helbling, E. (2008). Combined effects of ultraviolet radiation and temperature on morphology, photosynthesis, and DNA of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyta), *J. Phycol.* 44: 777–786.

Garcia-Pichel, F., Wingard C., Castenholz, R. (1993). Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp., *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 170–176.

Genkai-Kato, M., Carpenter, SR. (2005). Eutrofización debida al reciclaje de fósforo en relación con la morfometría, la temperatura y las macrófitas del lago. *Ecología* 86: 210–219.

Giannuzzi, L. (2018). Cianobacterias y cianotoxinas como determinantes de la salud. Ministerio de Salud de la Nación Argentina.

Harada, K. (1996). Chemistry and Detection of Microcystin. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H. Toxic Microcystis. CRC Press, Boca Raton, pp. 103-148.

Havens, K. (2008). Cyanobacterial blooms: effects on aquatic ecosystems. En Hudnell (ed.) Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of Science and Research Needs. New York: Springer. p. 733-747.

Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Borner, T. (2003). PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. Arch. Microbiol. 180:402–410.

Horváth I., Glatz A., Varvasovszki V., Török Z., Páli T., Balogh G., Kovács E., Nádasdi L., Benkő S., Joó F., Vígh L. (1998). Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a “fluidity gene”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3513–3518.

Hossain M., Nakamoto H. (2003). Role for the cyanobacterial htpg in protection from oxidative stress, Curr. Microbiol. 46 (2003) 70–76.

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

Hotto, A., Satchwell, M., Boyer, G. (2005). Seasonal production and molecular characterization of microcystins in Oneida Lake, New York, USA. Environ. Toxicol. 20:243–248.

Huber, V., Wagner, C., Gerten, D., Adrian, R. (2012). To bloom or not to bloom: Contrasting responses of cyanobacteria to recent heat waves explained by critical thresholds of abiotic drivers. Oecologia. 169 (1): 245-256. Doi:10.1007/s00442-011-2186-7

Hudnell, H. (2008). Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 619. Springer 500 p.

Huisman, J., Codd, G., Paerl, H., Ibelings, B., Verspagen, J., Visser, P. (2018). Cyanobacterial blooms. Nature Reviews Microbiology. 16 (8): 471-483. Doi:10.1038/s41579-018-0040-1

Hurtado, J., Polanía, J. (2014). Técnicas moleculares para la detección de cianobacterias en los embalses Riogrande II y La Fe, Colombia. Rev. biol. trop vol.62 n.1

Izaguirre, I., Sanchez, M., Schiaffina, M., O’Farrell, I., Huber, P., Ferrer, N., Zunino, J., Lagomarsino, L., Mancini, M. (2015). Which environmental factors trigger the dominance of phytoplankton species across a moisture gradient of shallow lake?. Hydrobiologia 752:47–64

Jiang, X., Jin, X., Yao, Y., Li, L., Wu, F. (2008). Efectos de la actividad biológica, la luz, la temperatura y el oxígeno en los procesos de liberación de fósforo en la interfaz de sedimentos y agua del lago Taihu, China. *Agua Res* 42: 2251–2259.

Jochimsen, E., Carmichael, W., An, J., Denise, M., Cookson, S., Holmes, C., Antunes, M., Melo, F., Lyra, T., Barreto, V., Azevedo, S., Jarvis, W., (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med*. 1998 Mar 26;338(13):873-8. doi: 10.1056/NEJM199803263381304.

Jöhnk, K., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P., Stroom, J. (2008). Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology*. 14 (3): 495-512. Doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01510.x

Jones, J. (1992). Lake algae can be dangerous. Panamá: The Panama Canal Spilway.

Jones C., Esquenazi E., Dorrestein P., Gerwick W. (2011). Probing the in vivo biosynthesis of scytonemin, a cyanobacterial ultraviolet radiation sunscreen, through small scale stable isotope incubation studies and MALDI-TOF mass spectrometry, *Bioorg. Med. Chem.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.005>.

Jungblut, A., Neilan, B. (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 185:107–114.

Jürgens, U., Mäntele, W. (1991). Orientation of carotenoids in the outer membrane of *Synechocystis* PCC 6714 (Cyanobacteria), *Biochem. Biophys. Acta* 1067: 208–212.

Kaebernick, M., Neilan, B., Borner, T., Dittmann, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3387–3392.

Klisch M., Sinha R., Richter P., Häder D (2001). Mycosporine-like amino acids (MAAs) protect against UV-B-induced damage in *Gyrodinium dorsum* Kofoid, *J. Plant Physiol.* 158: 1449–1454.

Kumar, A., Tyagi M., Jha, P., Srinivas, G., Singh, A. (2003). Inactivation of cyanobacterial nitrogenase after exposure to ultraviolet-B radiation, *Curr. Microbiol.* 46: 380–384.

Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J. (1999). Human Health Aspects. En: *Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, Chorus I, Bartram JE, Spon FN, New York, pp. 113-153.

Lawton, LA., Edwards, C. (2001). Purification of microcystins. *J. of Chromat. A* 912: 191-209.

Li, D., Wu, N., Tang, S., Su, G., Li, X., Zhang, Y., Wang, G., Zhang, J., Hecker, M., Giesy, J., Yu, H. (2018). Factors associated with blooms of cyanobacteria in a large shallow lake, China. *Li et al. Environ Sci Eur* 30:27

Li, Y., Chen, J., Zhao, Q., Pu, C., Qiu, Z. (2011). A cross-sectional investigation of chronic exposure to microcystin in relationship to childhood liver damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. *Environ Health Perspect.* 119: 1483–1488.

López-Álvarez, B., Ramos-Leal, J., Moran-Ramírez, J., Cardona Benavides, A., Hernández García, G. (2013). Origen de la calidad del agua del acuífero colgado y su relación con los cambios de uso de suelo en el Valle de San Luis Potosí. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 65(1), 9-26. Recuperado en 14 de julio de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-33222013000100003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-33222013000100003&lng=es&tlng=es).

Lucena, E. (2008). Aspectos sanitarios de las cianotoxinas. *Higiene y Sanidad Ambiental* 8: 291-302.

Ma, SN., Wang, HJ., Wang, HZ., Zhang, M., Li, Y., Bian, SJ., Liang, XM., Søndergaard, M., Jeppesen, E. (2021). Effects of nitrate on phosphorus release from lake sediments. doi: 10.1016/j.watres.2021.116894.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2000). *Biología de los microorganismos*. Trad por Mariano Gacto Fernández. 8 Ed. Iberia. España, Editorial Prentice Hall, 985 p.

Malcuori, M. (2011). "Cianotoxinas y cianobacterias en peces de agua dulce". Universidad de la República. Tesis de grado. Montevideo, Uruguay. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19956/1/FV-29293.pdf>

Martínez, G. (2019). Dinámica y condiciones ambientales de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el río Uruguay y Río de la Plata. Tesis de doctorado. Universidad de la República.

McCauley, E., Downing, J., Watson, S. (1989). Sigmoid relationships between nutrients and chlorophyll among lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 46:1171-1175.

McGregor, G., Stewart, I., Sendall, B., Sadler, R., Reardon, K., Carter, S., Wickramasinghe, W. (2012). First report of a toxic *Nodularia spumigena* (Nostocales/Cyanobacteria) bloom in sub-tropical Australia. I. Phycological and public health investigations. *International Journal of Environmental Research And Public Health*. 9 (7): 2396-2411. Doi:10.3390/ijerph9072396

Meichtry, N., Martens, I., Llano, V. (2009). Cianobacterias planctónicas: su impacto en ambientes acuáticos continentales. Descripción de los géneros más frecuentes. En *Cianobacterias y cianotoxinas. Identificación, toxicología, Monitoreo y evaluación de riesgo*. p.17-23

Misonou, T., Saitoh, J., Oshiba, S., Tokitomo, Y., Maegawa, M., Inoue, Y., Hori, H., Sakurai, T. (2003). UV-absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production, *Mar. Biotechnol.* 5: 194–200.

Mora, P., Ruíz, S. (2012). Actividad biocida y estudios de toxicidad de extractos de Cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el lago de Atitlán. Universidad de

San Carlos de Guatemala. Disponible en:  
[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3370.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3370.pdf)

Moreno, I., Repetto, G., Cameán, A. (2003). Interés toxicológico de las microcistinas. *Revista de Toxicología*, vol. 20 (3):159-165. Asociación Española de Toxicología Pamplona, España

Morvan, H., Gloaguen, V., Verbret, L., Joset, F., Hoffmann, L. (1997). Structure-function investigations on capsular polymers as a necessary step for new biotechnological applications: The case of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Plant Physiol. Biochem.*, 35(9): 671–683.

Ndlela, L. (2016). An overview of cyanobacterial bloom occurrences and research in Africa over the last decade. *Harmful Algae*. 60: 11-26. Doi: 10.1016/j.hal.2016.10.001

Neilan, B., Pearson, L., Moffitt, M., Mihali, K., Kaebernick, M., Kellmann, R., Pomati, F. (2008). The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: Australia. State of the Science and Research Needs*, 417–452pp.

Neilan, B., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R., Schaub, V., Sivonen, K., Borner, T. (1999). Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol* 181(13):4089-4097.

Nicolaus, B., Panico A., Lama L., Romano L., Manca, M., De Giulio A., Gambacorta, A. (1999). Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria, *Phytochemistry* 52: 639–647.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Routledge London and New York.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (1998). Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR. *In: Guidelines drinking water quality*. Geneva, Switzerland: WHO. 2nd ed. pp. 95-110.

O'Neil, J., Davis, T., Burford, M., Golber, C. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14:313-334.

Oren, A. (2000). Salts and brines. In: A. Whitton and M. Potts (eds.). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 281–306.

Paerl, H.W., Paul, V. (2012). Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46, 1349–1363.

Paerl, H. (1994). Ecology of freshwater bloom-forming blue-green algae. *Journal of the World Aquaculture Society*. 14: 18- 64.

Paerl, H. (1996). A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* 35:25–35.

Paerl, H., Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1: 27-37.

Paerl, H., Millie, D. (1996). Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia* 35: 160-167. DOI: 10.2216/i0031-8884-35-6S-160.

Paerl, H., Otten, T. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb Ecol.* May; 65(4):995-1010. doi: 10.1007/s00248-012-0159-y. PMID: 23314096.

Palikova, M., Navratil, F., Sterba, F., Tichy, B., Marsalek, L. (2004). Histopathology of Carp (*Cyprinus carpio*) larvae exposed to cyanobacteria extract. *Acta Veterinaria Brunensis*. 73: 253- 257.

Parra, O., Avilés, D., Becerra, J., Dellarossa, V., Montoya, R. (1986). First toxic blue-green algal bloom recorder for Chile: A preliminary report. *Gayana Bot.* 43(1-4): 15-17.

Pérez, D., Soraci, A., Tapia, M. (2008). Cianobacterias y cianotoxinas: Rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. *Revista Analecta Veterinaria*, 28(1), 48-56.

Peperzak, L. (2003). Climate change and harmful algal blooms in the North Sea. *Acta Oecologia*. 24: S139-S144. Doi: 10.1016/S1146-609X(03)00009-2

Pinilla, G. (2006). Evaluación de la eficiencia fotosintética del fitoplancton en un lago amazónico (Lago Boa) y en un lago andino (Lago Guatavita). Universidad Nacional de Colombia. *Acta Amazónica VOL.* 36(2): 221 - 228

Prosperi, C., Rodríguez, C., Pierotto, M., Mancini, M., Daga, C., Gonella, M. (2005). Evaluación de la contaminación y eutrofización de aguas superficiales de la provincia de Córdoba. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 2 (7): 4.

Quinn, R.J., Taylor, C., Embrey, K.J., Poulsen, S. (1996). Molecular Modeling of Microcystins. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H. *Toxic Microcystis*, CRC Press, Boca Raton, pp. 233-253.

Quirós, R. (2004). Cianobacterias en lagos y embalses de Argentina: década del 80. Documento de Trabajo del Área de Sistemas de Producción Acuática No 2, FAUBA.

Quintero, S. (2007). Algas ocasionan mal sabor en el agua. *El Siglo*, 1.

Ramírez, J., Gutiérrez, F., Vargas, A. (2005). Respuesta de la comunidad fitoplanctónica a experimentos de eutrofización artificial realizados en la represa La Fe, El Retiro, Antioquia, Colombia. *Caldasia*, 27(1), 103-115.

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(9), 6101-6110.

Raps S., Kycia H., Ledbetter M. y Siegelman H. (1985). Light intensity adaptation and phycobilisome composition of *Microcystis aeruginosa*. *Plant Physiol.*, 79: 983-987.

Rastogi, R., Sinha, R., Moh, S., Lee, T., Kottuparambil, S., Kim, Y., Rhee, J., Choi, E., Brown, M., Häder, D., Han, T. (2014). Ultraviolet radiation and cyanobacteria, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 141: 154-169, ISSN 1011-1344, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.020>.

Reddy, K., Kadlec, R., Flaig, E., Gale, P. (1999). Retención de fósforo en arroyos y humedales: una revisión. *Environ Sci Technol* 29: 83–146.

Reynolds, C, Jaworski, G., Cmiech, H., Leedale, G. (1981). On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Phil. Trans. R. Soc. London* 293: 419-477.

Reynolds, C., Walsby, A. (1975). Water-Blooms. *Biological Reviews*, 50(4), 437–481. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1975.tb01060.x>

Reynolds, C. (2006). *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University. p. 550.

Rigler, F. (1956). A tracer study of the phosphorus cycle in lakewater. *Ecology*, 550-562.

Rinta-Kanto, J., Wilhelm, S. (2006). Diversity of microcystin producing cyanobacteria in spatially isolated regions of Lake Erie. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5083–5085.

Riolobos, R., Martínez, J. (1994). Estudio de los procesos de eutrofización de las aguas embalsadas, Riesgos para la salud, Modelo de vigilancia. En *Boletín de la Sociedad Española de Sanidad Ambiental: N° 2 (27-33)*. Valencia: Universidad Internacional Menéndez Pelayo.

Rosales, R., Cayetano, M., Cives, H. (2012). Acción del cloro y carbón activado en polvo sobre la remoción de microcistinas en tratamientos de agua potable. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/262649482\\_Accion\\_del\\_cloro\\_y\\_carbon\\_activado\\_en\\_polvo\\_sobre\\_la\\_remocion\\_de\\_microcistinas\\_en\\_tratamientos\\_de\\_agua\\_potable](https://www.researchgate.net/publication/262649482_Accion_del_cloro_y_carbon_activado_en_polvo_sobre_la_remocion_de_microcistinas_en_tratamientos_de_agua_potable)

Rosales, R., Cayetano Arteaga, M., Cives, H., Rosso, L., Giannuzzi, L. (2017). Factores ambientales y antropogénicos que afectan la formación de floraciones de cianobacterias y cianotoxinas. Universidad de la Plata. Argentina. P106.

Rozan, TF., Taillefert, M., Trouwborst, RE., Glazer, BT., Ma, S. (2002) Ciclo de hierro-azufre-fósforo en los sedimentos de una bahía costera poco profunda: Implicaciones para la liberación de nutrientes de sedimentos y floraciones de macroalgas bentónicas. *Limnol Oceanogr* 47: 1346–1354.

Runnegar, M. T., Kong, S., & Berndt, N. (1993). Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *The American Journal of Physiology*, 265(2), G224-30.

Salomón, S., Rivera-Rondón, C., Zapata, A. (2020). Floraciones de cianobacterias en Colombia: estado del conocimiento y necesidades de investigación ante el cambio global. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 44(171):376-391. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1050>

Sánchez, A. (2020). Determinación de la presencia de microcistinas en el agua de planta potabilizadora de Cartago. Tesis de grado. Universidad de Costa Rica. Disponible en: [https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/11447/TFG\\_Andrea\\_Sánchez\\_Parajeles.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/11447/TFG_Andrea_Sánchez_Parajeles.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Sanseverino, I., Conduto, D., Loos, R., Lettieri, T. (2017). JRC Technical reports. Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection. JRC Science Hub Unión Europea. 70 p

Sarma, M., Kaushik, Sh., Goswami, P. (2016). Cyanobacteria: A metabolic power house for harvesting solar energy to produce bio-electricity and biofuels, *Biomass and Bioenergy*, Volume 90: 187-201. ISSN 0961-9534, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.03.043>

Scheurs, H. (1992). Cyanobacterial dominance, relation to eutrophication and lake morphology. Tesis Universidad de Amsterdam.

Selman, M., Greenhalgh, S., Diaz, R., Sugg, Z. (2008). Eutrophication and Hypoxia in Coastal Areas: A Global Assessment of the State of Knowledge. *Water Quality: Eutrophication and Hypoxia No. 1. Policy Note.* World Resources Institute. Washington, D.C., pp. 2. <http://www.wri.org/publication/eutrophication-and-hypoxia-in-coastal-areas>

Shibata, K. (1969). Pigments and a UV-absorbing substance in coral and a blue-green alga living on the Great Barrier Reef, *Plant Cell Physiol.* 10: 325–335.

Shruthi, M., Rajashekhar, M. (2014). Effect of salinity and pH on the growth and biomass production in the four species of estuarine cyanobacteria. *J. Algal Biomass Utln* 5 (4): 29-36.

Singh S., Häder, D., Sinha R. (2010). Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies, *Age. Res. Rev.* 9: 79–90.

Sinha, R., Häder, D. (1998). Effects of ultraviolet-B radiation in three rice field cyanobacteria, *J. Plant Physiol.* 153 763–769.

Sinha, R., Klisch, M., Häder, D. (1999). Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. by UV irradiation, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 52: 59–64.

Sinha, R., Singh, N., Kumar, A., Kumar, H., Häder, M., Häder, D. (1996). Effects of UV irradiation on certain physiological and biochemical processes in cyanobacteria, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 32: 107–113.

Sinha, R., Kumar, H., Kumar, A., Häder, D. (1995). Effects of UV-B irradiation on growth, survival, pigmentation and nitrogen metabolism enzymes in cyanobacteria, *Acta Protozool.* 34: 187–192.

Sivonen K, Jones G. (1999). Cyanobacterial Toxins. En: Chorus I, Bartram JE, Spon FN. *Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, New York pp. 41-111.

Sivonen, K. (1998). Toxins Produced by Cyanobacteria. En: Miraglia M, Van Egmond H, Brera C, Gilbert J. *Mycotoxins and Phycotoxins-Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, USA pp. 547-567.

Sharma, N.K., Tiwari, S.P., Tripathi, K. (2011). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *J Appl Phycol* **23**, 1059–1081. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9626-3>

Spears, BM., Carvalho, L., Perkins, R., Kirika, A., Paterson, DM. (2007). Ciclo de fósforo de sedimentos en un gran lago poco profundo: variación espacio-temporal en las piscinas de fósforo y liberación. *Hidrobiología* 584: 37–48.

Spoof L, Karlsson K, Meriluoto J. (2001). High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C18 and amide C16 sorbents. *J. of Chromat. A* 909: 225-236.

Stanier, R. y Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacterial. Francia. *Rev. Microbiol.* 31:225-74

Stewart, I., Webb, P., Schluter, P., Shaw, G. (2006). Recreational y occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal y case reports, epidemiological studies y the challenges for epidemiologic assessment. *Environ Health* 5: 6.

Stewart, I., Webb, P., Schluter, P., Shaw, G. (2006). Recreational y occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal y case reports, epidemiological studies y the challenges for epidemiologic assessment. *Environ Health* 5: 6.

Sukenik, A., Hadas, O., Kaplan, A., Quesada, A. (2012). Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to Subtropical and Temperate Freshwater Lakes - Physiological, Regional, and Global Driving Forces. *Frontiers in Microbiology.* 3: 86-86. Doi: 10.3389/fmicb.2012.00086

Svrcek, C., Smith, D. (2004). Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: A review. *Journal of Environmental Engineering and Science.* 3: 155-185. Doi: 10.1139/s04-010

Tillet, D., Dittmann, E., Erhard, M., Von Dohren, H., Borner, T., Neilan, B. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa*

PCC7806: an integrated peptide polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, 7: 753-764

Torok Z., Goloubinoff P., Horvath I., Tsvetkova N., Glatz A., Balogh G., Varvasovszki V., Los D., Vierling E., Crowe J., Vigh L. (2001). Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3098–3103.

UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura). (2009). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Sylvia Bonilla (editora). Documento Técnico PHI-LAC, N° 16.

Vaara, T. (1982). The outermost surface structures in chroococcacean cyanobacteria, *Can. J. Microbiol.* 28: 929–941.

Vanegas, J., Comba, N., Pérez, X. (2014). *Manual de Microbiología General: Principios Básicos de Laboratorio*. UTADEO. p 252.

Vela, L., Sevilla, E., Martín, B., Pellicer, S., Bes, M., Fillat, M., Peleato, M. (2007). Las microcistinas. *Revista de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza*. 62: 135-146.

Verschooten L., Claerhout S., Laethemii A., Agostinis P., Garmyn M. (2006). New strategies of photoprotection, *Photochem. Photobiol.* 82: 1016–1023.

Watanabe, M., Harada, K., Carmichael, W., Fujiki, H. (1995). *Toxic Microcystis*. CRC Press. p258.

Weidner, C., Rücker, J., Brüggemann, R., Nixdorf, B. (2007). Climate change affects timing and size of population an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Population ecology*. Alemania. *Oecología* 152, 473-484pp.

Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 203: 201-218.

Wikipedia. (2021). Lago Gatún. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Lago\\_Gatún](https://es.wikipedia.org/wiki/Lago_Gatún)

Wilhelm, S., Adrian, R. (2008). Impacto del calentamiento del verano en las características térmicas de un lago polimíctico y consecuencias para el oxígeno, los nutrientes y el fitoplancton. *Freshwater Biol* 53: 226–237.

Willis, W. (2020). Nitrates and pH in Water Quality. Disponible en: <https://kingsbayrestorationproject.com/nitrates-and-ph-in-water-quality/>

Wu H., Gao K., Villafañe V., Watanabe T., Helbling E. (2005). Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Appl. Environ. Microb.* 71: 5004–5013.

Ylinen, A., Tallberg, P., Rouhiainen, L., Møkelke, L. (2003). Quantitative Real-Time PCR for determination of Microcystin synthetase e copy numbers for Microcystis and Anabaena in lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12):7289-7297.

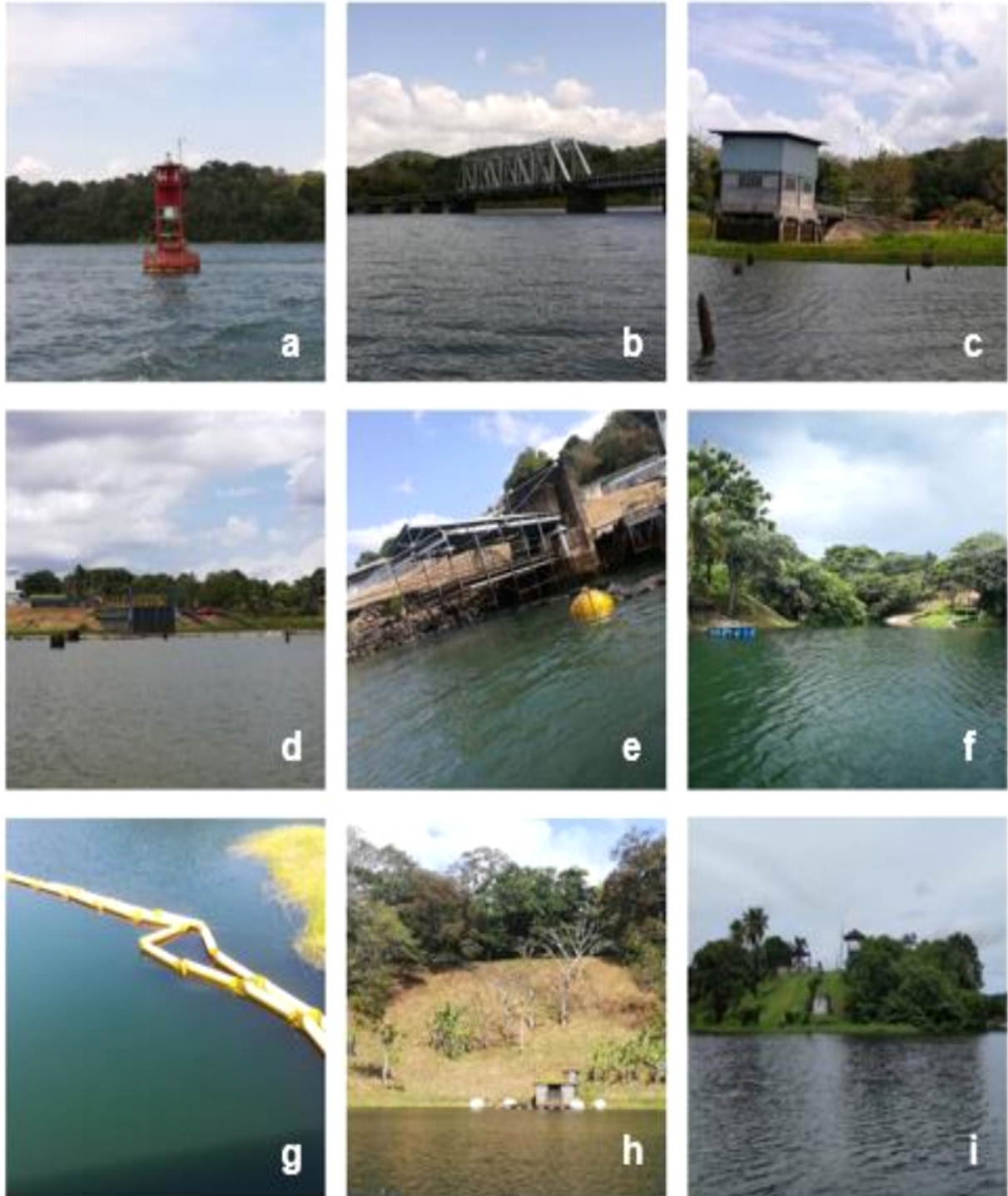
Young, J., Geisen, M., Probert, I. (2005). A review of selected aspects of coccolithophore biology with implications for paleobiodiversity estimation. *Micropaleontology*, 267-288

Yoshida, T., Makita, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Yoshida, F., Sekijima, M., Tamura, S., Ueno, Y. (1997). Acute Oral toxicity of Microcystin-LR, a Cyanobacterial Hepatotoxin, in Mice. *Natural Toxins* 5: 91-95.

Zapata, A., Rivera Rondón, C. A., Páez, V., Pedraza Garzón, E., García, R. (2009). Factors controlling continual cyanobacterial bloom in a tropical urban wetland. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*. 30: 813-816. Doi:10.1080/03680770.2009.11902244

Zhou, L., Yu, H., Chen, K. (2002). Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed Environ Sci* 15: 166–171.

## **ANEXOS**



**Figura 12.** Sitios de muestreos en el embalse Gatún: a. Toma de agua Barro Colorado (BCI). b. Toma de agua Gamboa (DC1). c. Toma de agua Laguna Alta (LAT). d. Toma de agua Mendoza (TME). e. Toma de agua Paraíso (TMR). f. Toma de agua Escobal (ESC). g. Toma de agua Sabanitas (TAS). h. Toma de agua Monte Esperanza (TMH). i. Toma de agua Cuipo (TAC)



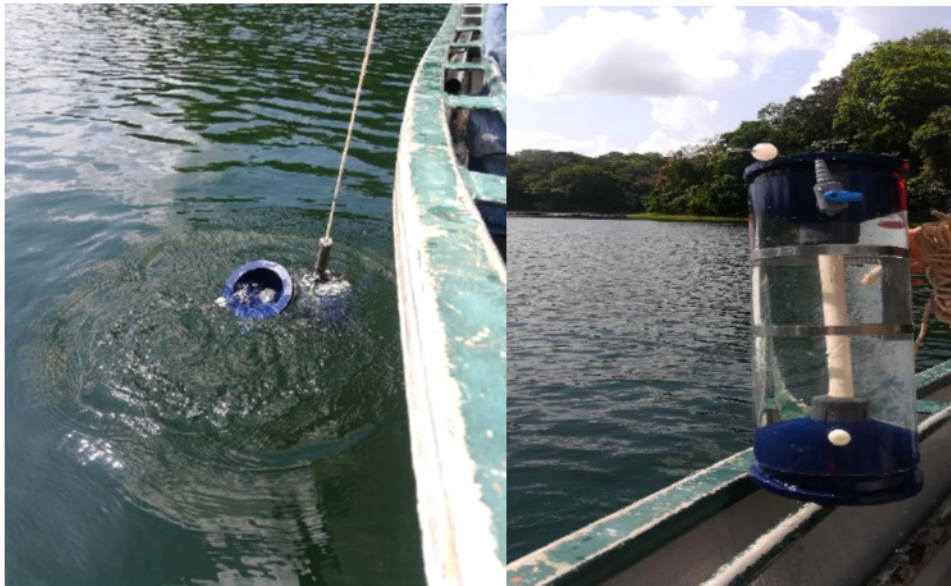
Figura 13. Potabilizadoras que son abastecidas por el embalse Gatún.



Figura 14. Resumen del análisis molecular de las muestras del embalse Gatún.



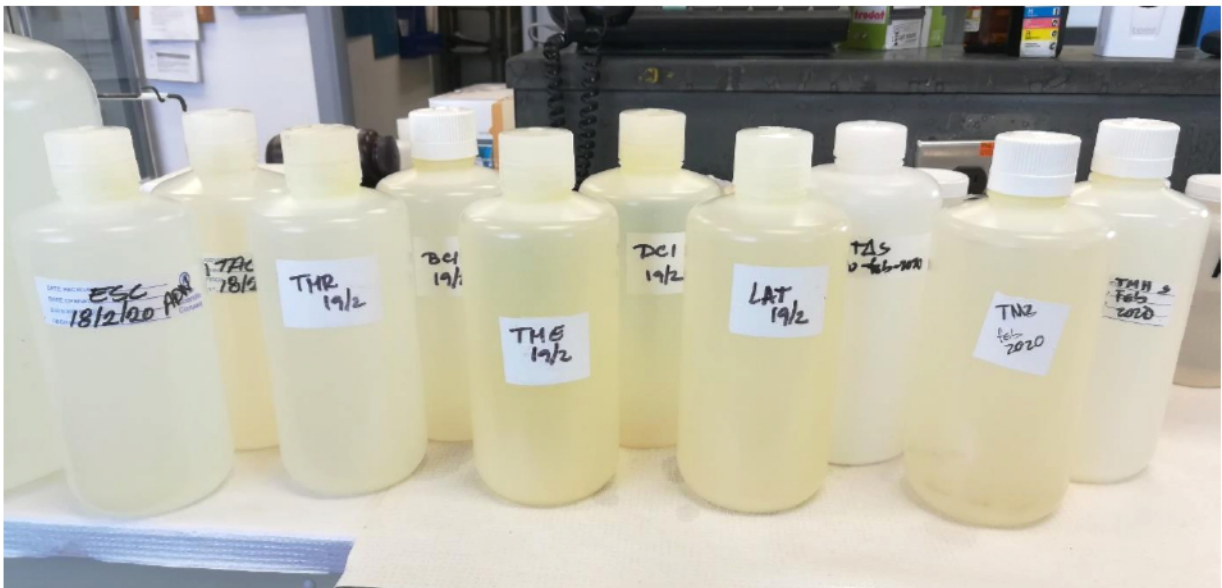
**Figura 15.** Resumen del análisis fisicoquímico de las muestras del embalse Gatún.



**Figura 16.** Colecta de la muestra en toma de agua



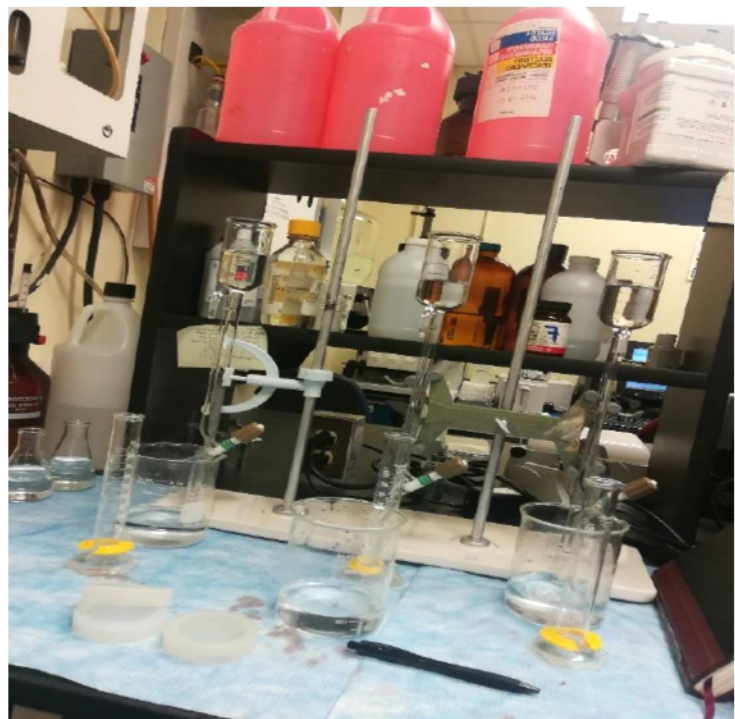
**Figura 17.** Análisis *in situ* utilizando sonda multiparamétrica



**Figura 18.** Muestras colectadas de los sitios de muestreos



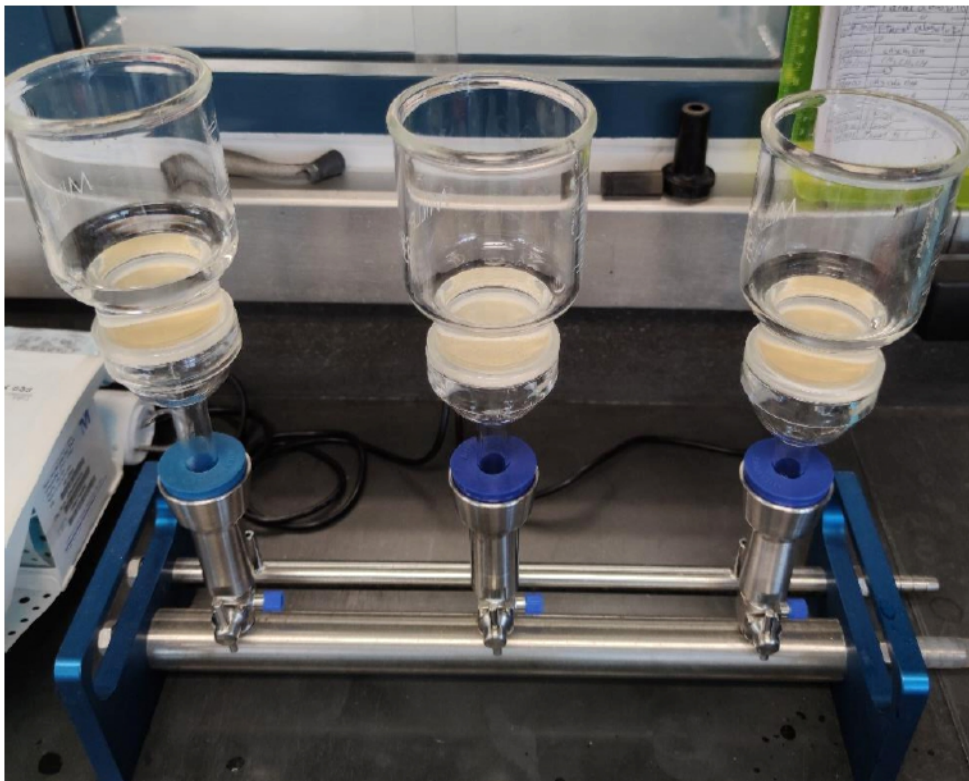
Figura 19. Medición de la clorofila



Figuras 20. Análisis de Nitratos en muestras de agua



**Figura 21.** Análisis de Nitritos en muestras de agua



**Figura 22.** Filtración de las muestras de agua....

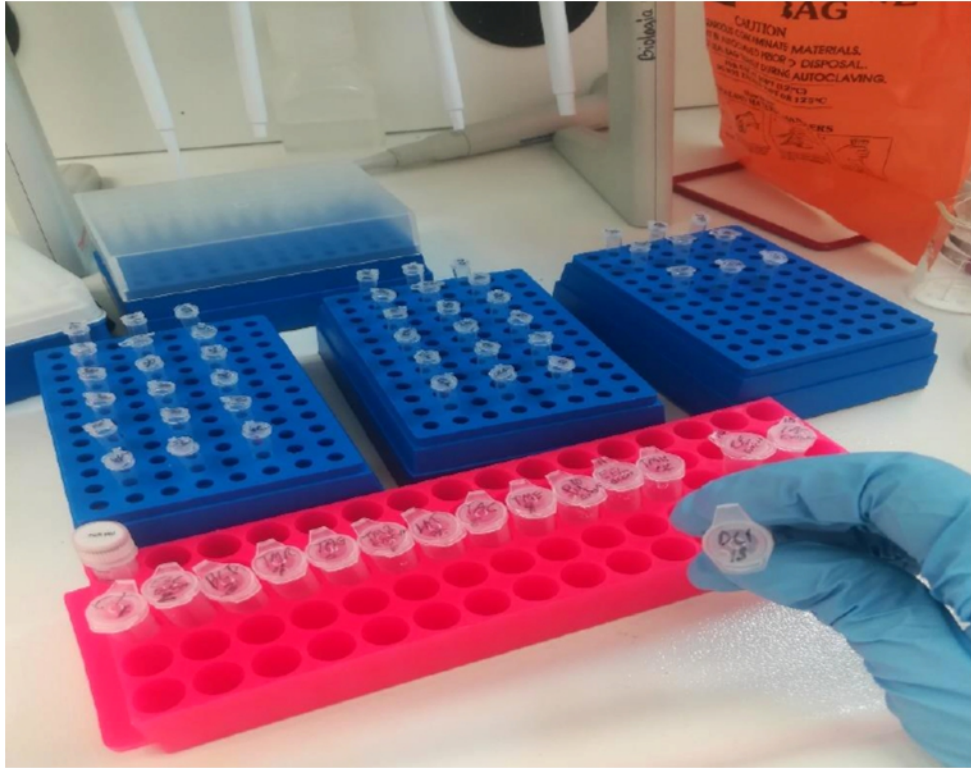


Figura 23. Extracción de ADN utilizando el kit comercial Dneasy Plant Handbook (Qiagen)

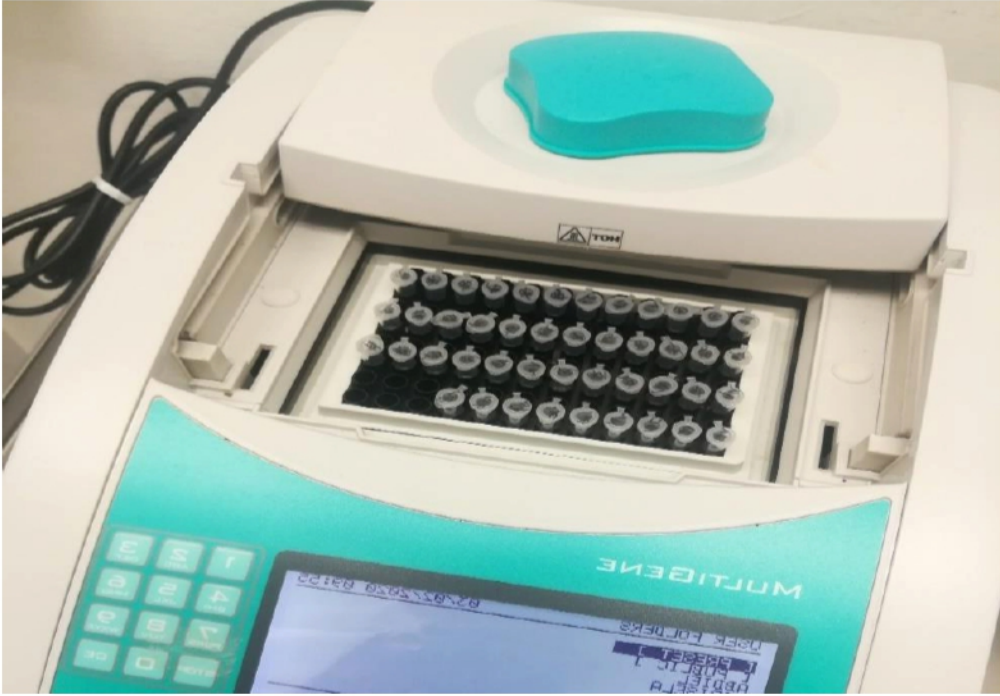
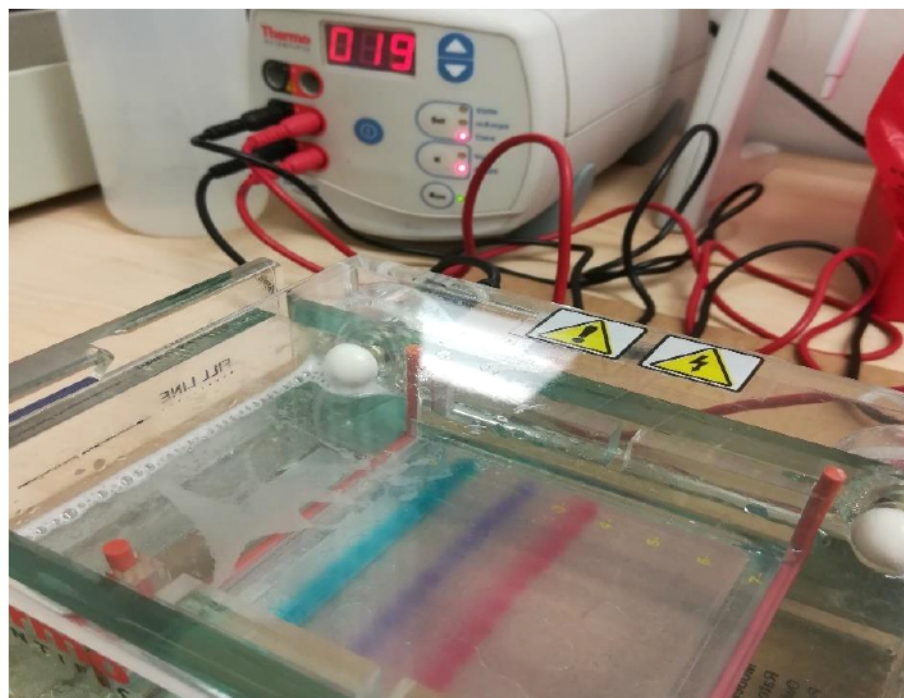


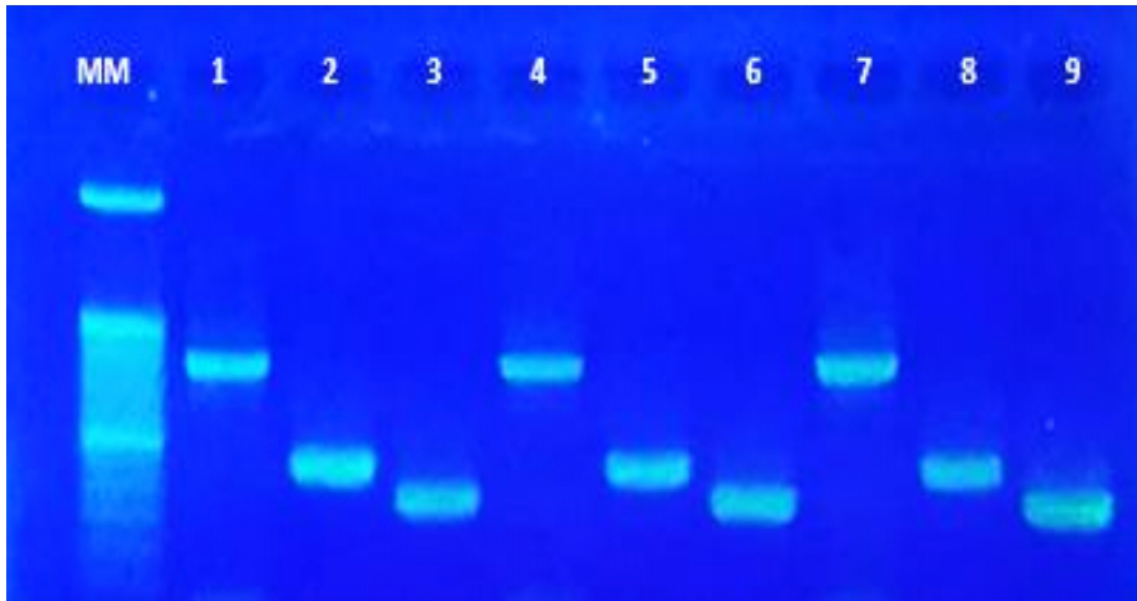
Figura 24. Muestras colocadas en el termociclador para su amplificación.



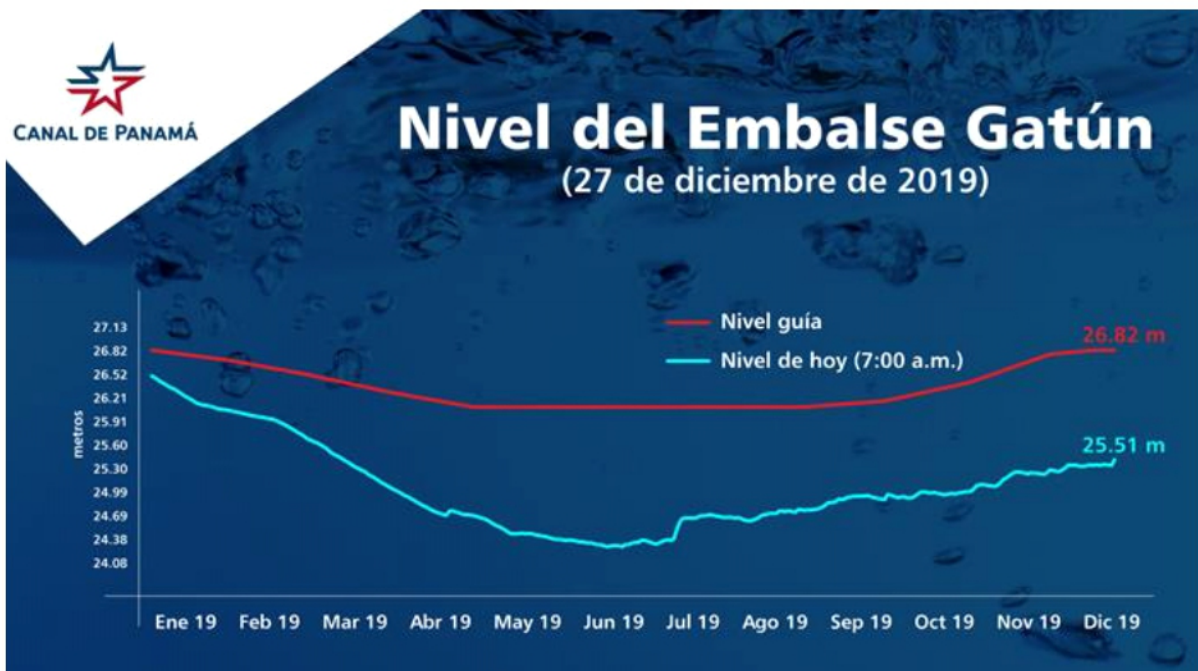
**Figura 25.** Muestras siendo cargadas en los pocillos para su electroforesis.



**Figura 26.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%



**Figura 27.** Electroforesis de genes de cianobacterias potencialmente tóxicos en gel de agarosa. Carril 1 control positivo del gen ficocianina, carril 2 control positivo de gen mcyB, carril 3 control positivo de gen mcyE, carril 4, 5, 6 (gen ficocianina, mcyB y mcyE) en muestra de Escobal, Carril 7, 8, 9 (gen ficocianina, mcyB y mcyE) en muestra de BCI.



Fuente: Canal de Panamá. 2019

**Figura 28.** Niveles de agua del Embalse Gatún durante el año 2019.

### Base de datos #1. Mayo 2019-Febrero 2020

Sitio	Mes	FIC	McyB	McyE	Presencia/ausencia	NO2	NO3	PO4	SO4
BCI	Agosto	1	1	1	1	0.008	0.067	0.013	0.11
BCI	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	18.69
BCI	Enero	1	1	1	1	0.000	0.025	0.010	17.16
BCI	Febrero	1	1	1	1	0.000	0.046	0.000	21.38
BCI	Julio	1	1	1	1	0.000	0.022	0.013	16.11
BCI	Junio	0	0	0	0	0.000	0.033	0.011	16.69
BCI	Mayo	0	0	0	0	0.002	0.023	0.015	17.05
BCI	Noviembre	0	0	0	0	0.001	0.076	0.010	17.40
BCI	Octubre	0	0	0	0	0.000	0.015	0.013	19.52
BCI	Septiembre	0	1	1	1	0.001	0.026	0.013	22.32
DCI	Agosto	1	1	1	1	0.002	0.381	0.013	0.110
DCI	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	11.05
DCI	Enero	0	0	0	0	0.001	0.041	0.013	8.34
DCI	Febrero	1	1	1	1	0.004	0.041	0.000	9.67
DCI	Julio	1	1	1	1	0.016	0.501	0.016	27.75
DCI	Junio	0	0	0	0	0.015	0.400	0.015	11.28
DCI	Mayo	0	0	0	0	0.002	0.470	0.015	9.52
DCI	Noviembre	0	0	0	0	0.000	0.336	0.011	13.28
DCI	Octubre	0	0	0	0	0.001	0.018	0.016	11.28
DCI	Septiembre	1	1	1	1	0.002	0.400	0.021	15.26
ESC	Agosto	1	1	1	1	0.000	0.025	0.011	0.11
ESC	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	0.11
ESC	Enero	1	1	1	1	0.000	0.02	0.011	21.75
ESC	Febrero	1	1	1	1	0.000	0.017	0.000	25.72
ESC	Julio	1	1	1	1	0.000	0.022	0.010	19.22
ESC	Junio	0	0	0	0	0.000	0.019	0.011	17.16

<b>ESC</b>	Mayo	0	0	0	0	0.000	0.012	0.015	15.28
<b>ESC</b>	Noviembre	0	0	0	0	0.000	0.052	0.014	11.75
<b>ESC</b>	Octubre	0	0	0	0	0.000	0.025	0.024	22.69
<b>ESC</b>	Septiembre	1	1	1	1	0.000	0.024	0.010	36.92
<b>LAT</b>	Agosto	0	0	0	0	0.002	0.032	0.011	23.99
<b>LAT</b>	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	7.64
<b>LAT</b>	Enero	0	0	0	0	0.005	0.072	0.011	7.52
<b>LAT</b>	Febrero	1	1	1	1	0.002	0.027	0.000	5.86
<b>LAT</b>	Julio	1	1	1	1	0.000	0.032	0.013	22.22
<b>LAT</b>	Junio	0	0	0	0	0.001	0.031	0.013	6.22
<b>LAT</b>	Mayo	0	0	0	0	0.008	0.195	0.013	7.11
<b>LAT</b>	Noviembre	0	0	0	0	0.004	0.088	0.010	8.69
<b>LAT</b>	Octubre	0	0	0	0	0.003	0.013	0.014	5.87
<b>LAT</b>	Septiembre	0	0	0	0	0.003	0.122	0.014	12.62
<b>TAC</b>	Agosto	1	1	1	1	0.001	0.024	0.011	11.87
<b>TAC</b>	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	0.11
<b>TAC</b>	Enero	1	1	1	1	0.000	0.029	0.011	5.16
<b>TAC</b>	Febrero	1	1	1	1	0.000	0.018	0.000	6.51
<b>TAC</b>	Julio	1	1	1	1	0.002	0.038	0.013	11.40
<b>TAC</b>	Junio	0	0	0	0	0.000	0.032	0.011	5.52
<b>TAC</b>	Mayo	0	0	0	0	0.001	0.011	0.017	6.58
<b>TAC</b>	Noviembre	0	0	0	0	0.001	0.054	0.017	6.22
<b>TAC</b>	Octubre	0	0	0	0	0.000	0.023	0.022	9.05
<b>TAC</b>	Septiembre	1	1	1	1	0.000	0.019	0.011	12.34
<b>TAS</b>	Agosto	1	1	1	1	0.002	0.047	0.016	0.11
<b>TAS</b>	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	12.93
<b>TAS</b>	Enero	0	0	0	0	0.002	0.042	0.013	10.58
<b>TAS</b>	Febrero	1	1	1	1	0.000	0.041	0.000	15.72
<b>TAS</b>	Julio	0	0	0	0	0.000	0.041	0.014	20.34

<b>TAS</b>	Junio	0	0	0	0	0.000	0.042	0.013	12.34
<b>TAS</b>	Mayo	1	1	1	1	0.001	0.026	0.019	13.52
<b>TAS</b>	Noviembre	1	1	1	1	0.001	0.050	0.014	15.05
<b>TAS</b>	Octubre	0	0	0	0	0.001	0.016	0.014	16.58
<b>TAS</b>	Septiembre	1	1	1	1	0.002	0.050	0.011	23.27
<b>TME</b>	Agosto	1	1	1	1	0.003	0.094	0.010	23.05
<b>TME</b>	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	8.46
<b>TME</b>	Enero	0	0	0	0	0.006	0.085	0.011	5.28
<b>TME</b>	Febrero	1	1	1	1	0.003	0.065	0.000	7.17
<b>TME</b>	Julio	1	1	1	1	0.002	0.052	0.011	20.93
<b>TME</b>	Junio	0	0	0	0	0.001	0.054	0.015	3.75
<b>TME</b>	Mayo	0	0	0	0	0.003	0.064	0.015	7.22
<b>TME</b>	Noviembre	1	1	1	1	0.005	0.112	0.010	7.64
<b>TME</b>	Octubre	0	0	0	0	0.004	0.012	0.014	6.81
<b>TME</b>	Septiembre	0	0	0	0	0.003	0.118	0.013	11.44
<b>TMH</b>	Agosto	1	1	1	1	0.000	0.028	0.010	31.99
<b>TMH</b>	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	10.58
<b>TMH</b>	Enero	1	1	1	1	0.000	0.047	0.010	10.69
<b>TMH</b>	Febrero	1	1	1	1	0.001	0.053	0.000	14.93
<b>TMH</b>	Julio	1	1	1	1	0.001	0.022	0.011	14.58
<b>TMH</b>	Junio	0	0	0	0	0.000	0.013	0.011	11.64
<b>TMH</b>	Mayo	1	1	0	1	0.001	0.013	0.015	11.75
<b>TMH</b>	Noviembre	1	1	1	1	0.000	0.047	0.014	10.11
<b>TMH</b>	Octubre	0	0	0	0	0.000	0.015	0.011	12.81
<b>TMH</b>	Septiembre	1	1	1	1	0.003	0.057	0.011	19.27
<b>TMR</b>	Agosto	1	1	1	1	0.001	0.419	0.014	15.75
<b>TMR</b>	Diciembre	1	1	1	1	0.001	0.013	0.010	30.11
<b>TMR</b>	Enero	1	1	1	1	0.001	0.026	0.011	25.75
<b>TMR</b>	Febrero	1	1	1	1	0.000	0.030	0.000	36.12

<b>TMR</b>	Julio	0	0	0	0	0.000	0.488	0.017	22.93
<b>TMR</b>	Junio	0	0	0	0	0.001	0.464	0.020	20.58
<b>TMR</b>	Mayo	1	0	0	0	0.001	0.095	0.017	10.81
<b>TMR</b>	Noviembre	1	1	1	1	0.000	0.330	0.024	29.40
<b>TMR</b>	Octubre	0	0	0	0	0.000	0.019	0.017	14.69
<b>TMR</b>	Septiembre	1	1	1	1	0.001	0.422	0.017	23.79

**Base de datos #2. Mayo2019- Febrero 2020**

<b>Sitio</b>	<b>Mes</b>	<b>TURBIEDAD</b>	<b>ALCALINIDAD</b>	<b>MC</b>	<b>pH</b>	<b>Temp</b>	<b>CHL</b>	<b>YLD</b>	<b>PC:CHL</b>
<b>BCI</b>	Agosto	2.02	35.5	0.00	7.53	29.79	4.12	0.06	0.5394
<b>BCI</b>	Diciembre	1.13	36.2	0.03	7.90	27.32	4.82	0.01	0.8292
<b>BCI</b>	Enero	0.55	37.2	0.03	8.67	29.06	1.39	0.26	1.3692
<b>BCI</b>	Febrero	1.33	43.0	0.05	7.65	28.90	0.64	0.51	0.4363
<b>BCI</b>	Julio	2.75	32.0	0.03	7.71	29.73	1.80	0.01	0.1612
<b>BCI</b>	Junio	1.79	33.0	0.03	7.57	30.90	3.74	0.14	0.3862
<b>BCI</b>	Mayo	1.90	32.7	0.05	7.34	30.11	1.85	0.47	0.1671
<b>BCI</b>	Noviembre	0.77	39.0	0.03	7.55	29.77	2.26	0.16	1.0013
<b>BCI</b>	Octubre	1.45	35.5	0.02	7.69	29.50	3.14	0.11	0.7596
<b>BCI</b>	Septiembre	1.84	33.1	0.10	7.67	30.00	8.02	0.27	0.7142
<b>DCI</b>	Agosto	28.30	55.9	0.03	7.08	28.89	5.64	0.10	0.3755
<b>DCI</b>	Diciembre	13.40	55.9	0.02	7.84	27.05	11.2	0.11	0.1225
<b>DCI</b>	Enero	10.40	53.7	0.04	8.37	28.45	8.12	0.30	0.1109
<b>DCI</b>	Febrero	6.87	56.0	0.05	7.57	28.70	3.50	0.54	0.0921
<b>DCI</b>	Julio	82.10	50.7	0.04	7.00	27.53	11.74	0.18	0.4147
<b>DCI</b>	Junio	11.90	54.8	0.04	6.94	30.05	7.75	0.25	0.2837
<b>DCI</b>	Mayo	23.80	48.1	0.04	7.03	29.48	10.11	0.47	0.0981
<b>DCI</b>	Noviembre	12.20	56.9	0.08	7.27	28.66	4.55	0.19	0.5669
<b>DCI</b>	Octubre	15.70	51.6	0.04	7.40	28.71	5.40	0.24	0.2886
<b>DCI</b>	Septiembre	29.50	53.4	0.06	7.17	28.30	7.79	0.24	0.3011
<b>ESC</b>	Agosto	0.81	29.9	0.05	7.78	30.07	4.09	0.06	0.6934
<b>ESC</b>	Diciembre	0.43	32.5	0.00	7.90	24.46	2.02	0.02	0.8941
<b>ESC</b>	Enero	0.45	29.3	0.03	8.11	29.70	2.15	0.12	1.2937
<b>ESC</b>	Febrero	0.79	34.0	0.05	7.92	28.65	0.73	0.20	0.4953
<b>ESC</b>	Julio	1.03	30.5	0.02	7.55	29.73	4.42	0.01	0.9424

<b>ESC</b>	Junio	0.98	30.4	0.03	7.60	30.98	2.34	0.12	0.6977
<b>ESC</b>	Mayo	0.83	28.3	0.04	S/D	30.18	2.56	0.22	0.8387
<b>ESC</b>	Noviembre	0.56	31.2	0.03	7.79	29.35	1.46	0.09	0.9704
<b>ESC</b>	Octubre	0.62	33.1	0.05	7.61	29.58	2.83	0.17	0.9548
<b>ESC</b>	Septiembre	0.83	29.8	0.03	7.70	29.72	3.03	0.07	0.3927
<b>LAT</b>	Agosto	9.83	13.1	0.05	7.03	29.74	13.57	0.03	0.5472
<b>LAT</b>	Diciembre	6.87	17.3	0.08	6.84	28.24	9.23	0.01	0.5432
<b>LAT</b>	Enero	5.12	17.2	0.02	8.29	29.16	4.85	0.21	0.3525
<b>LAT</b>	Febrero	4.95	19.0	0.06	7.55	28.72	2.95	0.19	0.0765
<b>LAT</b>	Julio	12.60	13.7	0.03	7.55	29.46	25.68	0.25	0.1050
<b>LAT</b>	Junio	2.38	14.3	0.03	6.76	31.64	7.53	0.17	0.2187
<b>LAT</b>	Mayo	4.54	15.1	0.08	7.14	29.18	6.88	0.43	0.1306
<b>LAT</b>	Noviembre	8.57	13.1	0.02	6.62	30.07	8.21	0.20	0.3646
<b>LAT</b>	Octubre	12.60	13.1	0.01	7.40	28.84	8.69	0.22	0.4638
<b>LAT</b>	Septiembre	13.70	13.0	0.02	7.00	29.00	11.55	0.05	0.1904
<b>TAC</b>	Agosto	1.76	20.0	0.06	7.35	29.93	7.55	0.22	0.4225
<b>TAC</b>	Diciembre	1.24	21.4	0.03	7.34	29.84	6.54	0.24	0.6117
<b>TAC</b>	Enero	1.35	20.7	0.06	7.57	30.27	4.39	0.01	3.0323
<b>TAC</b>	Febrero	1.80	23.0	0.07	7.61	29.39	2.46	0.46	0.6382
<b>TAC</b>	Julio	2.34	20.2	0.08	6.88	29.06	8.37	0.20	0.6253
<b>TAC</b>	Junio	1.81	21.2	0.04	7.42	31.02	7.67	0.29	0.5908
<b>TAC</b>	Mayo	1.95	19.4	0.05	7.26	30.65	5.35	0.20	0.7333
<b>TAC</b>	Noviembre	1.62	22.7	0.00	6.87	28.48	4.00	0.16	0.4701
<b>TAC</b>	Octubre	1.33	21.8	0.02	7.49	29.52	6.83	0.20	0.3803
<b>TAC</b>	Septiembre	2.26	20.1	0.06	7.27	29.36	6.82	0.23	0.7483
<b>TAS</b>	Agosto	1.50	41.5	0.06	7.18	28.65	4.20	0.20	0.6176
<b>TAS</b>	Diciembre	1.05	49.4	0.04	7.47	28.63	2.33	0.03	0.6813
<b>TAS</b>	Enero	1.47	47.7	0.03	6.88	28.20	3.55	0.14	0.4715
<b>TAS</b>	Febrero	0.93	50.0	0.09	7.35	29.02	1.16	0.40	0.1996

<b>TAS</b>	Julio	1.09	40.4	0.06	7.35	30.18	3.03	0.01	0.6978
<b>TAS</b>	Junio	0.81	40.7	0.03	6.53	30.85	3.59	0.07	0.3967
<b>TAS</b>	Mayo	0.96	40.0	0.07	6.58	30.02	3.65	0.38	0.2050
<b>TAS</b>	Noviembre	2.46	47.6	0.06	7.39	30.10	3.39	0.18	0.2469
<b>TAS</b>	Octubre	0.98	46.8	0.05	7.52	30.29	4.34	0.27	0.3996
<b>TAS</b>	Septiembre	1.32	41.2	0.07	7.18	29.26	5.66	0.23	0.3355
<b>TME</b>	Agosto	10.20	12.3	0.03	6.68	29.42	12.52	0.16	0.3543
<b>TME</b>	Diciembre	8.28	16.5	0.00	6.79	27.56	8.98	0.03	0.2416
<b>TME</b>	Enero	4.35	16.7	0.01	8.31	28.93	5.37	0.01	0.8066
<b>TME</b>	Febrero	4.94	19.0	0.05	6.99	28.31	3.54	0.30	0.1266
<b>TME</b>	Julio	19.40	12.3	0.04	7.13	28.55	14.99	0.03	0.1210
<b>TME</b>	Junio	2.36	12.8	0.04	6.71	30.97	8.40	0.19	0.1442
<b>TME</b>	Mayo	3.38	14.7	0.04	7.04	29.58	4.03	0.47	0.2151
<b>TME</b>	Noviembre	9.28	12.9	0.03	6.52	29.24	7.03	0.13	0.4063
<b>TME</b>	Octubre	10.80	12.5	0.02	7.23	29.60	9.66	0.24	0.4476
<b>TME</b>	Septiembre	11.20	12.2	0.08	6.80	29.00	12.34	0.19	0.2329
<b>TMH</b>	Agosto	1.06	41.2	0.04	7.30	28.32	5.93	0.01	0.9540
<b>TMH</b>	Diciembre	0.78	54.8	0.02	7.21	28.71	3.48	0.20	2.8138
<b>TMH</b>	Enero	0.94	46.0	0.04	6.39	28.60	2.19	0.27	0.5782
<b>TMH</b>	Febrero	0.77	49.0	0.09	6.80	28.86	1.27	0.47	0.2953
<b>TMH</b>	Julio	1.02	40.3	0.05	7.40	30.02	2.26	0.14	0.1923
<b>TMH</b>	Junio	0.76	40.7	0.04	7.28	31.25	2.85	0.16	0.5721
<b>TMH</b>	Mayo	0.66	41.2	0.07	7.38	31.03	2.82	0.13	0.3522
<b>TMH</b>	Noviembre	0.73	48.7	0.06	7.32	29.49	3.74	0.26	0.3695
<b>TMH</b>	Octubre	0.75	46.7	0.05	7.56	30.02	3.70	0.13	0.7890
<b>TMH</b>	Septiembre	0.84	41.6	0.04	7.15	29.17	5.54	0.23	0.5652
<b>TMR</b>	Agosto	18.80	59.3	0.00	7.60	29.08	7.88	0.02	0.2869
<b>TMR</b>	Diciembre	10.50	63.3	0.00	8.17	27.12	8.10	0.26	0.1550
<b>TMR</b>	Enero	4.70	56.2	0.03	7.82	28.29	9.26	0.49	0.059

<b>TMR</b>	Febrero	7.06	60.0	0.07	8.05	28.64	5.85	0.57	0.1060
<b>TMR</b>	Julio	31.70	55.0	0.07	7.36	28.89	4.39	0.01	0.2190
<b>TMR</b>	Junio	15.10	51.7	0.02	7.32	29.82	7.43	0.22	0.3476
<b>TMR</b>	Mayo	17.60	54.4	0.08	7.54	29.67	10.49	0.40	0.1005
<b>TMR</b>	Noviembre	12.90	62.0	0.06	7.52	28.61	4.54	0.20	0.2959
<b>TMR</b>	Octubre	16.90	57.2	0.02	7.24	28.80	6.75	0.10	0.3219
<b>TMR</b>	Septiembre	25.50	52.5	0.05	7.19	28.70	8.98	0.21	0.4205