

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**Determinación de la presencia de microcistinas en el agua de planta potabilizadora
de Cartago**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Tecnológico de Costa Rica para
optar por el título de Licenciatura en Biotecnología.**

ESTUDIANTE:

Andrea María Sánchez Parajeles

JUNIO 2020

TEC | Tecnológico
de Costa Rica

 *Ingeniería en*
Biología
Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

 **MUNICIPALIDAD**
CARTAGO

Resumen

Las cianotoxinas son contaminantes cada vez más frecuentes a nivel mundial en el agua potable procedente de aguas superficiales, debido a que las condiciones del cambio climático pueden aumentar la proliferación de las cianobacterias. La presencia de estas toxinas en el agua potable puede generar diferentes problemas a la salud como: daño hepático y daño a nivel neurológico. En Costa Rica, los análisis de cianobacterias en agua potable se realizan en casos excepcionales como cuando ocurren intoxicaciones masivas, por lo tanto, actualmente son escasos los datos que se tienen sobre las cianobacterias y sus toxinas: En 1994, Peinador aisló tres especies de cianobacterias de la Planta Potabilizadora de Tres Ríos, y en el año 2006 Avendaño y Arguedas encontraron en el agua cruda de la Planta Potabilizadora de Tres Ríos concentraciones superiores a lo establecido en la normativa.

En este estudio se analizaron los datos suministrados por el ICE (Instituto Costarricense de Electricidad) sobre el embalse El Llano (fuente de la planta potabilizadora de Cartago) de los parámetros de temperatura, pH, fósforo total y amonio de las épocas entre 2016-2018, para determinar si con las características históricas del embalse, se podrían desarrollar las cianobacterias; además se empleó la técnica de espectrofotometría con el kit comercial Mycrocistest® para determinar la concentración de microcistinas tóxicas en el agua cruda y tratada de la planta potabilizadora de Cartago. Tras el análisis de los datos históricos se encontró que, con las características históricas de los parámetros analizados, si era posible el crecimiento de las cianobacterias y por ende de la producción de toxinas. Al realizar los ensayos, no se detectaron microcistinas (Mcs) en concentraciones iguales o superiores a 0,25 µg/L, lo que podría deberse a algunos factores como la presencia de sedimentos en el embalse, la biodegradación de las Mcs por parte de los microorganismos que crecen en el embalse, el corto tiempo de retención del embalse, entre otros. No obstante, no se descarta en el futuro, la presencia de cianobacterias, ni de cianotoxinas, por lo que se recomienda establecer un monitoreo de vigilancia de las densidades de cianobacterias presentes en el agua cruda de la planta y en caso de detectar densidades importantes, realizar una prueba de toxicidad.

Palabras clave: cianobacterias, cianobacterias bentónicas, cianotoxinas, microcistinas L-R (Mc-LR), embalse El Llano, Mycrocistest®

Abstract

Cyanotoxins are an increasingly frequent pollutant worldwide in drinking water from surface waters, as the conditions of climate change can increase the proliferation of cyanobacteria. The presence of these toxins in drinking water can generate different health problems, such as liver damage and neurological damage. In Costa Rica, the analysis of cyanobacteria in drinking water is carried out in exceptional cases such as when massive intoxications occur, therefore, currently there is little data on cyanobacteria and their toxins: In 1994, Peinador isolated three species of cyanobacteria of the Tres Ríos drinking water treatment Plant, and in 2006 Avendaño and Arguedas found in the raw water of the same plant concentrations higher than that established in the regulations.

In this study, the data provided by the ICE (Instituto Costarricense de Electricidad) on the El Llano reservoir (source of the Cartago drinking water treatment plant) of the parameters of temperature, pH, total phosphorus and ammonium of the periods between 2016-2018 were analyzed, to determine if with the historical characteristics of the reservoir, cyanobacteria could be developed. In addition, the spectrophotometric technique was used with the commercial Mycrocistest® kit to determine the concentration of toxic microcystins in the raw and treated water of the Cartago drinking water treatment plant. After analyzing the historical data, it was found that with the historical characteristics of the analyzed parameters, there is the possible for the growth of cyanobacteria and therefore the production of toxins. When performing the tests, no microcystins (Mcs) were detected in concentrations equal to or greater than 0.25 µg / L, which could be due to some factors such as the presence of sediments in the reservoir, the biodegradation of the Mcs by the microorganisms that grow in the reservoir, the short retention time of the reservoir, among others. However, the presence of cyanobacteria or cyanotoxins is not ruled out in the future, so it is recommended to establish surveillance monitoring of the densities of cyanobacteria present in the raw water of the plant and in case of detecting significant densities, perform a toxicity test.

Key words: cyanobacterias, bentich cyanobacterias, cyanotoxins , microcystins L-R (Mc-LR), El Llano reservoir, Mycrocistest®.

**Determinación de la presencia de microcistinas en el agua de la planta
potabilizadora de Cartago**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Tecnológico de Costa Rica para
optar por el título de Licenciatura en Biotecnología**

Sustentante

**Andrea María Sánchez Parajeles
Estudiante**

Miembros del Tribunal

**Lic. Andrea Quesada González MQC
Profesora-Investigadora
Profesora Tutora-TEC**

**Ing. Óscar Fernández Segura
Subdirector del Acueducto
Asesor Municipalidad de Cartago**

**Ing. Randall Chacón Cerdas M. Eng
Profesor-Investigador
Lector-TEC**

Dedicatoria

A mi padre Carlos Luis que aunque ya no está físicamente, siempre me incentivó a estudiar y sé que estaría muy feliz al verme concluir esta etapa.

A Bodo, Jochi, Pelucha y Mauri por hacer mi vida más plena día a día.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por todo lo que me ha dado y me dará para siempre ser una mejor persona.

Al Área Técnica de Acueductos, específicamente a don Julio Urbina Rojas y Óscar Fernández Segura por permitirme realizar este trabajo sobre la Planta Potabilizadora y por la compra de reactivos para la realización de las pruebas correspondientes.

Al personal del ICE que me facilitó los datos del Embalse el Llano para su análisis y poder sustentar mejor este trabajo.

A Andrea Quesada González por ser una guía para la realización de este trabajo

A Randall Chacón Cerdas por su valioso aporte para refrescar la parte estadística, además por sus valiosos aportes en el documento.

A la profe Vilma Jiménez Bonilla por impulsarme a ingresar a la Licenciatura después de mucho tiempo de haber egresado del Bachillerato.

Índice General

Resumen	ii
Abstract	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Índice General	vii
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	x
Introducción	1
Revisión de Literatura	3
Generalidades de las cianobacterias	3
Floraciones de cianobacterias	5
Factores que influyen en el crecimiento de las cianobacterias	6
Temperatura	6
pH (potencial de hidrógeno).....	6
Fósforo	7
Nitrógeno	8
Efecto de las actividades humanas sobre las cianobacterias	8
Toxinas de las cianobacterias: cianotoxinas.....	9
Efecto de las cianotoxinas sobre la salud.....	9
Presencia de cianobacterias y sus toxinas en las reservas de agua dulce	12
Microcistinas	14
Regulación sanitaria de las microcistinas	15
Remoción de cianotoxinas	15
Cianotoxinas en Costa Rica	16
Métodos de detección de cianobacterias y cianotoxinas en agua.....	17
□ Microscopio:	17
□ Métodos físico químicos:	17
□ Métodos basados en anticuerpos y actividad enzimática:.....	18
□ Métodos químicos:.....	19
Objetivos.....	20
Materiales y métodos.....	21
Resultados y Discusión.....	26

Conclusiones	38
Recomendaciones	39
Bibliografía.....	40
Anexo 1: Pasos empleados a la hora de utilizar el kit Microcystest®	49
Apéndice 1: Prueba de Anderson Darling realizadas las diferentes variables	50

Índice de cuadros

Cuadro 1: Características de las cianobacterias y su relación con las algas-bacterias	3
Cuadro 2: Información de las cianotoxinas y su efecto en la salud	10
Cuadro 3: Cianobacterias y cianotoxinas en diferentes embalses.....	12
Cuadro 4 : Datos de los muestreos realizados en la Planta Potabilizadora de Cartago. .	23
Cuadro 5: Estadísticos básicos de los parámetros analizados	26
Cuadro 6: Resultados obtenidos de la estación seca	32
Cuadro 7: Resultados obtenidos de la estación lluviosa	33

Índice de figuras

Figura 1: A) <i>Coelosphaerium</i> sp. (10 µm); B) <i>Leptolyngbya</i> sp. (10 µm); C) <i>Anabaena</i> sp. (20 µm); D) <i>Komvophoro</i> sp. ((20 µm)	4
Figura 2: Efectos de las cianotoxinas sobre la salud. Elaboración propia a partir de información consultada.	11
Figura 3: Estructura de la molécula de MC-LR.....	14
Figura 4: Ubicación de la Planta Potabilizadora de Cartago.....	22
Figura 5: Curva de calibración obtenida en corrida de muestras de estación seca	24
Figura 6: Curva de calibración obtenida en corrida de muestras de estación lluviosa	25
Figura 7: Comportamiento del pH en las diferentes épocas entre el año 2016-2018.....	27
Figura 8: Comportamiento de la temperatura en las diferentes épocas <i>entre el año 2016-2018</i>	28
Figura 9: Comportamiento del amonio en las diferentes épocas <i>entre los años 2016-2018</i>	29
Figura 10: Comportamiento del fósforo total en las diferentes épocas <i>entre el año 2016-2018</i>	30

Introducción

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.

Entre los contaminantes del agua se puede mencionar las cianobacterias. Estas son procariontes que comparten características de las algas y de las bacterias. No poseen membrana nuclear y poseen un sistema que les permite realizar fotosíntesis, además de producir oxígeno (American water Works association, 2015; Quesada *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2000). 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).

Los principales grupos de cianotoxinas de acuerdo a su composición química son las microcistinas y nodularinas que son hepatotóxicas, otro grupo importante son las anatoxinas las cuales son neurotóxicas (Sivonen y Jones 1999). 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 (WHO, 2015).

A través del tiempo, las normas internacionales de calidad de agua se han basado en ciertos parámetros para determinar la calidad del agua, en Costa Rica no es la excepción. Por ejemplo, en Costa Rica, estos parámetros están regulados en el Reglamento 38924-S (2015) y su modificación el 41499-S (2019).

En estos, se establecen una serie de niveles de monitoreo para controlar la calidad, por ejemplo, el nivel 1 o básico (N1) regula la presencia de indicadores de contaminación como *E.coli* y coliformes fecales, así como, los parámetros básicos: pH, turbidez y conductividad. El nivel 2 y 3 (N2 y N3) regula la concentración de metales y otros compuestos químicos. El nivel 4 (N4) regula todos los otros parámetros que no están presentes en los niveles previos y sólo en casos de una situación de emergencia, estableciéndose en este último nivel que las cianobacterias tóxicas deben estar ausentes en el agua potable. Es por lo anterior, que en Costa Rica se tienen escasos datos sobre la presencia y concentración de cianotoxinas en el agua potable, no obstante, Peinador (1994) logró aislar de la Planta

Potabilizadora de Tres Ríos, tres especies de cianobacterias con potencial de producir toxinas, además en un estudio realizado por Avendaño y Arguedas (2006) se encontró concentraciones de microcistinas en el agua cruda entre (0,5 - 3,0) ppb en la Planta potabilizadora de Tres Ríos, la cual también posee como una de las fuentes el embalse el Llano, no obstante, a la fecha no existe ningún estudio en la Planta Potabilizadora de Cartago.

El presente trabajo tiene como objetivo analizar los datos históricos suministrados por el ICE de pH, temperatura, amonio y fósforo total del Embalse El Llano, para determinar si con las características de estos parámetros se podrían desarrollar las cianobacterias, además de cuantificar la concentración de cianotoxinas L-R en el agua cruda y tratada de la planta potabilizadora de Cartago en diferentes momentos del año 2019, para lo cual se empleó un kit comercial avalado por la EPA (Environmental Protection Agency) de la marca Mycrocistest®, todo lo anterior con el fin de identificar si es necesario un tratamiento adicional al realizado actualmente en la planta potabilizadora.

Revisión de Literatura

Generalidades de las cianobacterias

Las cianobacterias pertenecen al dominio Bacteria, no obstante, comparten características estructurales y funcionales con las bacterias heterótrofas y algas, respectivamente. Estas últimas, organismos eucariotas (Bonilla y Aubriot, 2009). En el Cuadro 1 se presenta una comparación entre las algas, bacterias y cianobacterias.

Cuadro 1: Características de las cianobacterias y su relación con las algas-bacterias

Algas	Cianobacterias	Bacterias
Eucariotas	Procariotas	
Fotosintéticas		No fotosintéticas
Unicelular y multicelular	Unicelular, colonial y filamentoso	
No producen toxinas	Cianotoxinas	Pueden producir toxinas
Ambientes acuáticos	Diferentes hábitats	

Son los organismos fotosintetizadores aerobios más antiguos del planeta, con aproximadamente más de 2700 millones de años, fueron los organismos responsables de crear la atmósfera oxidante mediante la liberación de oxígeno en la fotosíntesis (Bonilla y Aubriot, 2009).

La mayoría son de vida libre, se encuentran en ambientes acuáticos de agua dulce y salada. Tienen capacidad para establecerse en ambientes extremos, habitando sistemas hipersalinos, aguas termales e incluso regiones en los polos (Chorus y Bartram, 1999; Bonilla y Aubriot, 2009, Meichtry *et al.*, 2009, Cantoral *et al.*, 2017).

La cantidad de especies de cianobacterias no está claramente definida, Rivera (2008) menciona que pueden ascender a 2000 especies, sin embargo, datos más recientes, indican alrededor de 2698 especies identificadas y más de 6000 por describir (Nabout *et al.*, 2013)

Las cianobacterias o también llamadas algas cianofíceas (algas verdes-azuladas) son procariontes por lo que no poseen un núcleo rodeado por una membrana ni orgánulos subcelulares (característica de las bacterias), además son autótrofos oxigénicos similares a otras algas y a las plantas. Sólo poseen una forma de clorofila, la llamada clorofila a,

además, todas presentan compuestos biliproteicos llamados ficobilinas que son las que dan el color verde-azulado (Madigan *et al.*, 2000; Quesada *et al.*, 2006).

Las cianobacterias presentan diversidad de formas y estructuras. Existen las unicelulares las cuales tienen formas esféricas, ovoides o cilíndricas; también pueden estar en forma de células aisladas o unidas en colonias irregulares y las filamentosas, las cuales son típicas de un cierto número de cianobacterias (Giannuzzi *et al.*, 2017). En la Figura 1 se presentan algunas fotografías de cianobacterias y las formas que pueden presentar.

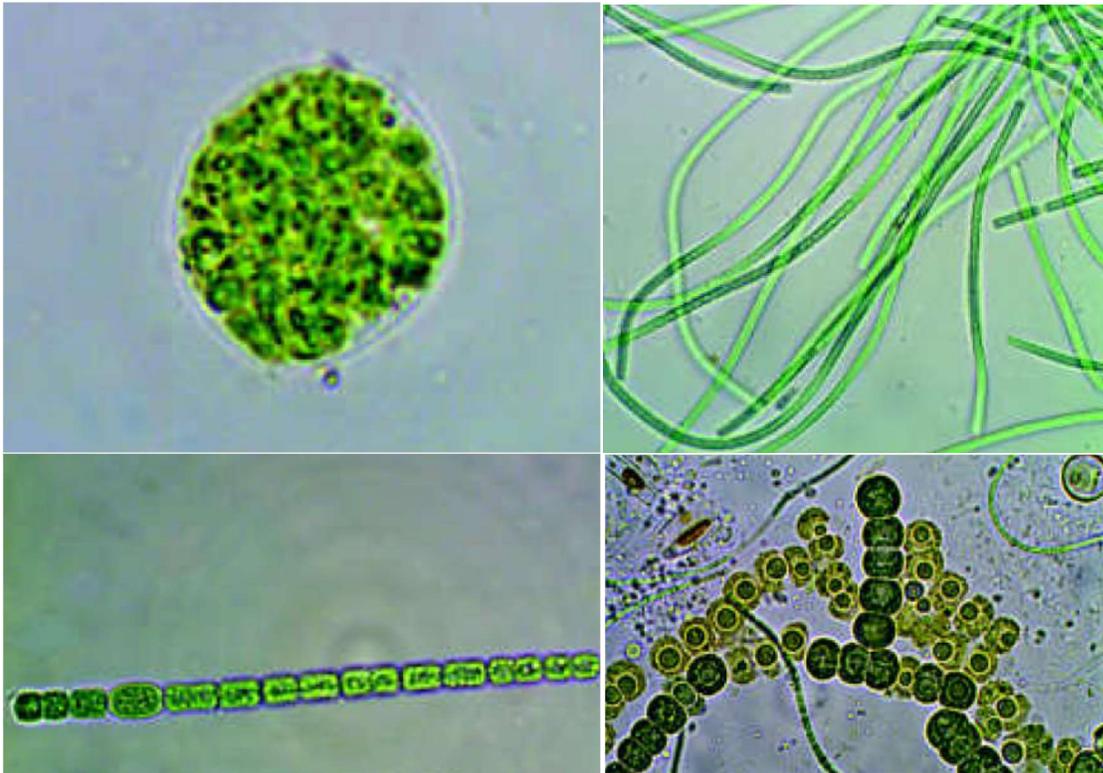


Figura 1: A) *Coelosphaerium* sp. (10 μm); B) *Leptolyngbya* sp. (10 μm); C) *Anabaena* sp. (20 μm); D) *Komvophoro* sp. ((20 μm))

Tomado de Guarmán y González, 2016.

Floraciones de cianobacterias

El crecimiento exponencial de las cianobacterias genera un aumento de biomasa, generándose lo que se conoce como floración o **blooms**, este crecimiento puede darse en unas horas o días, así mismo, puede desaparecer fácilmente o permanecer por períodos prolongados. Estas floraciones pueden ser de una o varias especies de cianobacterias y ocurre en un período de tiempo corto, no obstante, pueden permanecer por meses si las condiciones son favorables (Bonilla y Aubriot, 2009; Lepillanca *et al.*, 2018)

Las floraciones se pueden reconocer fácilmente por la coloración del agua, no obstante, existen floraciones incoloras debido a que las poblaciones pueden presentarse dispersas en toda la masa de agua o concentrarse a ciertas profundidades (Aguilera y Echenique, 2011).

La aparición de las floraciones de cianobacterias se favorece por las actividades antropogénicas como actividad ganadera, industrial, las urbanizaciones, agricultura, vertido de aguas residuales, debido principalmente al aporte que hacen estas actividades de nutrientes a los cuerpos de agua y favoreciendo la eutrofización (Lepillanca *et al.*, 2018).

Además, el crecimiento exponencial se ve influenciado por factores como altas temperaturas, alta concentración de nutrientes (concentraciones de fósforo total mayor a 25 µg/L), pH alcalino y bajo caudal, así como, tiempos de retención superiores a un mes (WHO, 2015; Meichtry *et al.*, 2009). Tiempos de retención inferiores a cinco días no permitirían la formación de *blooms* o crecimientos masivos de cianobacterias planctónicas (Chorus y Bartram, 1999; Kruk, *et al.*, 2019). Rangel *et al.*, (2012) indican que en siete de ocho embalses hidroeléctricos evaluados, el tiempo de residencia fue la variable que mejor explicó la variación del crecimiento del fitoplancton entre otras variables ambientales. El aumento en el tiempo de retención en un 45% generó que las poblaciones de *Microcystis aeruginosa* fueran de uno a dos órdenes de magnitud (Romo *et al.*, 2013).

A estas características Aguilera y Echenique (2011) agregan la buena disponibilidad lumínica y ausencia de vientos. Sobre este último punto Meichtry *et al.*, (2009) indican que el viento persistente, condiciones de turbulencia y aumento de caudales provocan la destrucción rápida de la floración formada, por lo tanto, en momentos donde se presentan estas condiciones se espera menor concentración de cianobacterias.

Las floraciones de cianobacterias pueden afectar el desempeño de las plantas potabilizadoras, la presencia de células, colonias o filamentos podrían interferir en la formación de flóculos y generar la rápida obstrucción de los filtros (Sens *et al.*, 2013).

Factores que influyen en el crecimiento de las cianobacterias

Temperatura

La temperatura es un factor que afecta no sólo el crecimiento de las cianobacterias sino la acumulación de las toxinas producidas por éstas (Sivonen y Jones (1999); Walls *et al.*, 2018). No obstante, actualmente existen diferencias de criterio entre diferentes autores sobre las temperaturas y los rangos de crecimiento.

Por ejemplo, existen autores (Paerl y Huisman, 2008) y Glibert (2020) que indican que las cianobacterias crecen mejor a elevadas temperaturas (por encima de los 25 °C), sin embargo, otros indican que al aumentar la temperatura sobre los 20 °C, se favorece la liberación de las toxinas de las cianobacterias, pero no el crecimiento de las mismas, las cuales más bien detuvieron su crecimiento a los 30 °C (Walls *et al.*, 2018). Por otro lado, Davis *et al.*, (2009) indican en su estudio que al aumentar la temperatura se favoreció el crecimiento de las cepas tóxicas de *Microcystis* sp en el 83% de los ensayos realizados, pero no las cepas no tóxicas del mismo género, lo cual podría sugerir que ante un eventual calentamiento global debido al cambio climático las cepas tóxicas se favorecerían.

pH (potencial de hidrógeno)

El pH para el desarrollo de las cianobacterias es un factor crítico, favoreciéndose el crecimiento a pH neutro y alcalino, por el contrario, el pH ácido afecta en forma negativa el crecimiento de las mismas. Según indican Giraldez *et al.*, (1997) en un ensayo realizado, las cianobacterias fueron incapaces de mantener el pH interno constante a pH 6 o menor, indicando una acidificación del citoplasma, al respecto Fuenmayor *et al.*, (2009) mencionan que por debajo de seis unidades de pH se inhiben hasta el 60% de la fotosíntesis de diversas cianobacterias, lo que se interpreta como estrés para las cianobacterias y la producción mayor de toxinas. Por el contrario, Gao *et al.*, 2014 reportan el crecimiento denso de cianobacterias en pH de 9-10.5 en el Río Sassafras en EEUU.

Sobre el aumento de pH, Gao *et al.*, 2014 mencionan que al elevar el pH se acelera la liberación de nitrógeno y fósforo de los sedimentos, lo que daría soporte a los requerimientos nutricionales de las cianobacterias.

Fósforo

El fósforo es un elemento esencial para la vida debido a que es un componente de los ácidos nucleicos que rigen la síntesis de proteínas y de la transformación de la adenosina fosfatasa que impulsan el transporte intracelular. El origen del fósforo en forma natural en cuerpos de agua procede principalmente de la meteorización de minerales, (Reynolds, 2006) y de ahí se transporta por la cadena alimentaria; no obstante, las actividades humanas también incorporan fósforo.

A menudo se menciona que el fósforo es el nutriente más importante en el control de fitoplancton en los lagos, y por ende de las cianobacterias (Shindler *et al.*, 2016), sin embargo, esto se reporta principalmente en estudios realizados en las regiones templadas de Norte América y Europa (Wurtsbaugh *et al.*, 1990), no obstante, algunos estudios indican que en lagos y embalses tropicales, el nitrógeno limitaría en mayor medida el crecimiento de las cianobacterias dependientes de nitrógeno en lugar del fósforo (González y Ortaz, 1998).

Sobre el tema de si el fósforo es limitante o no en el crecimiento de cianobacterias en cuerpos de agua, Wan *et al.*, (2019) indican que las diferentes especies de cianobacterias poseen distintas formas de responder a la disponibilidad de fósforo, por lo que el control de las floraciones de cianobacterias por la reducción de este nutriente, dependerá de las especies dominantes; por ejemplo, en el estudio de ellos, la reducción de fósforo fue más efectiva en controlar las cianobacterias diazotróficas que las cianobacterias no diazotróficas.

Los nutrientes en un lago o embalse estarán afectados por la biogeoquímica de la cuenca, así como, por los contaminantes antropogénicos y procesos que se desarrollan alrededor del cuerpo de agua, por lo tanto, cada lago no estará limitado por los mismos nutrientes (Wan *et al.*, 2019).

La producción de cianotoxinas por parte de las cianobacterias, tendría algún tipo de relación con la concentración de fósforo, como indican Zurawell *et al.*,2005; la liberación de las microcistinas L-R se asocia a un ambiente limitado en fósforo.

Nitrógeno

El nitrógeno al igual que el fósforo también es un constituyente de los aminoácidos y por lo tanto necesario para algunas proteínas (Reynolds, 2006). En los ecosistemas acuáticos las formas iónicas de nitrógeno inorgánico más comunes son el amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), los cuales pueden estar en forma natural en el agua debido a la deposición atmosférica, escorrentía superficial y subterránea, disolución de depósitos geológicos ricos en nitrógeno, descomposición de materia orgánica y la fijación de nitrógeno por ciertos procariontes (Camargo y Alonso, 2007).

Algunas cianobacterias son capaces de fijar el nitrógeno (N_2) gaseoso, de esta manera las floraciones pueden mejorar la captura de nitrógeno, fomentando su propagación en aguas limitadas de nitrógeno, alterando así las proporciones de nutrientes en ecosistemas acuáticos (O' Neil *et al.*,2012).

El nitrógeno como amonio (NH_4^+) es la forma más reactiva del nitrógeno presente en los ecosistemas acuáticos, y preferida por las algas y plantas para crecer. Este se adhiere al suelo y sedimentos, pero cuando el oxígeno disuelto está disponible, las bacterias transforman rápidamente por medio de la oxidación, el amonio a nitrito y de ahí a nitrato a través del proceso llamado nitrificación. Existen bacterias que producen amonio producto de la descomposición de plantas y animales (Addy *et al.*,2005).

Efecto de las actividades humanas sobre las cianobacterias

El aumento de la eutrofización de los cuerpos de agua debido a las actividades humanas, se considera una de las principales causas del aumento de floraciones a nivel mundial (Mrdjen *et al.*,2018; Glibert, 2020).

El cambio climático también puede afectar el crecimiento de las cianobacterias debido al calentamiento de las aguas y eventos de precipitación. Las lluvias intensas pueden

incrementar la descarga de nutrientes hacia los cuerpos de agua, promoviendo así la formación de floraciones. Por otro lado, los lugares donde más bien se presenten condiciones de sequía, los tiempos de retención de cuerpos de agua aumentan por lo que los nutrientes se concentran favoreciendo la floración de cianobacterias (WHO, 2015).

Qin *et al.*, (2010) indican que el cambio climático, especialmente el calentamiento jugará un rol en el establecimiento, duración y severidad de los afloramientos. Por lo tanto, el manejo a largo plazo de lagos o embalses, que sirven para el abastecimiento de agua potable a diferentes poblaciones, deberá contemplar el factor humano y el climático.

Toxinas de las cianobacterias: cianotoxinas

Las toxinas producidas por las cianobacterias se llaman cianotoxinas y pueden provocar intoxicaciones agudas en personas y animales, no obstante, para este tipo de intoxicaciones se requiere una ingesta elevada que ocurre raramente o bajo condiciones extraordinarias. La ingesta de bajas concentraciones (subletales) en un tiempo prolongado, puede provocar efectos tóxicos en personas y animales, sin embargo, aún no ha sido determinado el período de exposición necesario y la concentración de microcistina para que se manifieste un cuadro patológico (Rivera, 2008).

Estas toxinas se pueden acumular en peces, almejas, cangrejos, entre otros, incluyendo el ser humano. La mortandad de peces y animales provocadas por floraciones de cianobacterias son recurrentes en varias partes del mundo (Prieto *et al.*, 2008; Meichtry *et al.*, 2009; Vargas y Freer, 2004).

La estructura química de las cianotoxinas puede ser de tres tipos: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos.

Efecto de las cianotoxinas sobre la salud

Existen varios estudios que demuestran el efecto de las cianotoxinas sobre la salud. Se tiene evidencia de intoxicaciones por microcistinas en 50 pacientes con diálisis en Brasil, además de la hospitalización de más de 140 niños que ingirieron agua conteniendo *Cylindrospermopsis raciborskii* en Australia. También se reporta gastroenteritis después de floraciones de cianobacterias en fuentes de agua para consumo en Norteamérica,

Suramérica y Europa (Kuiper y Falconer, 1999). En el Cuadro 2, se presenta información importante, donde relaciona el tipo de estructura química, el órgano al que afecta y el género de cianobacteria involucrado con el grupo de cianotoxinas. En la Figura 2 se presentan los principales órganos y el efecto.

Cuadro 2: Información de las cianotoxinas y su efecto en la salud

Grupo de cianotoxinas	Órgano blanco en mamíferos	Efecto en la salud	Género de Cianobacterias
Péptidos cíclicos			
Microcistinas	Hígado	Dolor abdominal Vómito Diarrea	<i>Mycrocistis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Anabaenopsis</i>
Nodularinas	Hígado	Inflamación del hígado Daño hepático Daño de riñones	<i>Nodularia</i>
Alcaloides			
Anatoxinas-a	Sinapsis nerviosa	Quemaduras Incoherencia	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Aphanizomenon</i>
Anatoxinas-a(s)	Sinapsis nerviosa	Salivación Parálisis respiratoria	<i>Anabaena</i>
Aplysiatoxinas	Piel		<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Oscillatoria</i>
Cilindrospermopsinas	Hígado	Dolor abdominal Vómito Diarrea Inflamación del hígado Daño hepático Daño de riñones	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Umezakia</i>
Lyngbyatoxina-a	Piel, tracto gastrointestinal		<i>Lyngbya</i>
Saxitoxinas	Sistema nervioso		<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>
Lipopolisacáridos			
Lipopolisacáridos (LPS)	Irritante potencial, afecta cualquier tejido expuesto.		Todas las especies

Adaptado de Sivonen y Jones (1999); EPA (2014).

Zhang *et al.*, (2015) concluyeron en su estudio una asociación estadísticamente significativa entre floraciones de cianobacterias y enfermedad del hígado no alcohólica en Estados Unidos, según datos recolectados desde 1999 hasta 2010.

Las cianotoxinas pueden ser neurotóxicas (anatoxina-a, anatoxinas, saxitoxinas) o hepatotóxicas (microcistinas, nodularina y cilindroespermopsina) inclusive se mencionan liposacáridos con efecto gastroenterítico e irritaciones en la piel y alergias (aplisianotoxinas y lingbiatoxinas) (Sens *et al.*,2013). Las microcistinas son las hepatoxinas más frecuentes, afectan el hígado y pueden en pocas horas o días generar necrosis en este órgano cuando se administra en dosis letales, en dosis bajas su efecto es crónico y acumulativo (Carmichael, 1994).

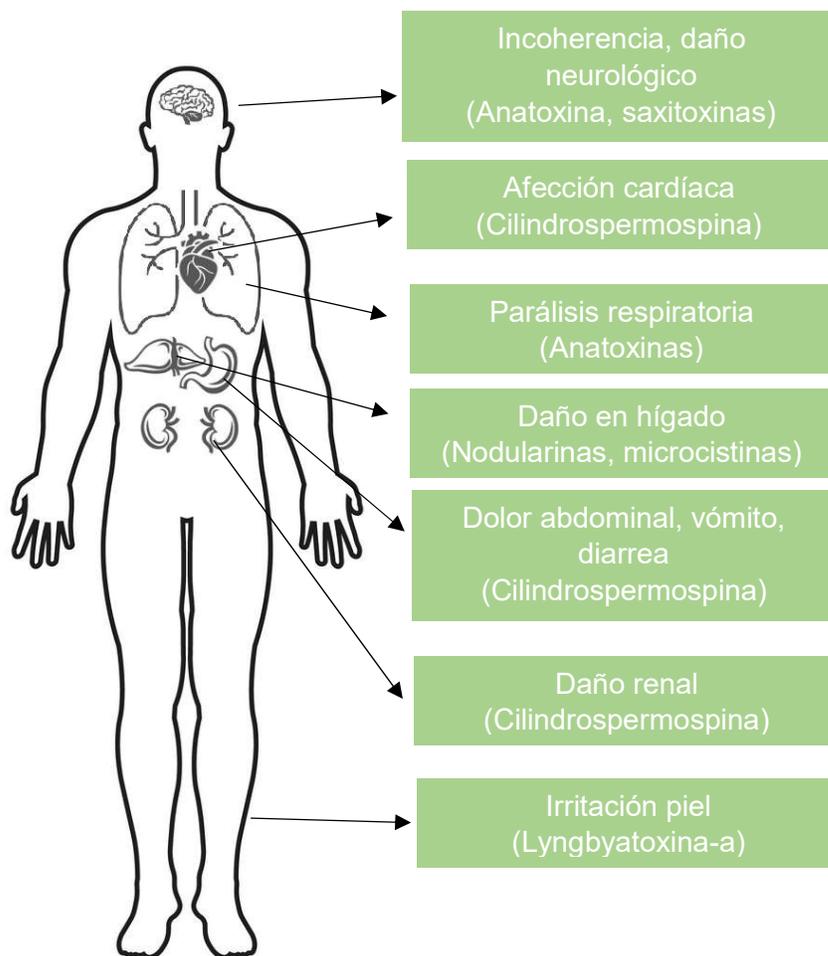


Figura 2: Efectos de las cianotoxinas sobre la salud. Elaboración propia a partir de información consultada.

Presencia de cianobacterias y sus toxinas en las reservas de agua dulce

En el inicio del siglo 21 son varios los estudios que evidencian la presencia de las cianobacterias y sus toxinas en reservorios de agua para consumo de la población, no limitándose únicamente a reservorios de electricidad o de recreación.

Por ejemplo, la presencia de cianobacterias en el año 2002 en fuentes de agua en la ciudad de Tolhuin (Tierra del fuego), generó el reemplazo del agua que abastecía a la ciudad, también en el año 2000 en la Bahía Blanca en Buenos Aires, Argentina, se detectaron alteraciones organolépticas del agua (olor y sabor desagradables), producto de la liberación de geosmina por floración de *Dolichospermum circinale*, coincidiendo con la aparición de problemas dérmicos y respiratorios de la población (Giannuzzi *et al.*, 2017). En el Cuadro 3 se presentan algunos de los lugares en Latinoamérica y Europa donde se han presentado problemas por cianobacterias y sus toxinas.

Cuadro 3: Cianobacterias y cianotoxinas en diferentes embalses

Lugar reportado	Resultado de los estudios	Autor
Embalse Campina grande, Paraíba, Brasil	Se detectaron microcistinas y nodularinas en concentraciones de hasta 0,5 µg/L, no obstante, con estas concentraciones se detectaron defectos en el desarrollo del pez cebra; por lo que los autores recomiendan la necesidad de un programa de monitoreo del agua de este embalse.	Walter <i>et al.</i> , 2018
Embalse Limón, Salta, Argentina.	Se encontraron varias especies con potencial toxicológico por lo que sugieren el monitoreo permanente del embalse. No se determinó la concentración de las cianotoxinas.	Vidaurre <i>et al.</i> , 2018.
Embalse Las Forcadas, Galicia, España.	Se obtuvieron concentraciones de hasta 1,40 µg/L de microcistina-LR disuelta, superior a lo indicado por la Organización Mundial de la Salud.	Lago <i>et al.</i> , 2015.
Embalse Salto Grande, Uruguay	La concentración de microcistina-LR se detectó únicamente en verano, con	Lepillanca <i>et al.</i> , 2018

Lugar reportado	Resultado de los estudios	Autor
	variaciones entre (5,5 – 96) µg/L en una zona del embalse; en otra se encontró entre (0 - 5,5) µg/L. Encontraron que las poblaciones de cianobacterias tóxicas que florecen en verano son diferentes a las que se mantienen en invierno.	
Parque Nacional de Doña Ana, Huelva, España.	En tres ocasiones se produjeron mortandades masivas de aves y peces, siendo la responsable de estas, la cianobacteria tóxica <i>Microcystis aeruginosa</i> .	Costas y López, 2006

Fuente: Elaboración propia a partir de la lectura de varios artículos

En años recientes, las cianobacterias sobresalen en términos de investigación debido a las cianotoxinas y a los problemas de salud que estas causan, además de que afectan las características organolépticas del agua (Meichtry *et al.*, 2009). Sobre este último punto, la American Water Works Association (2015), menciona además que las cianobacterias modifican en muchos casos el tratamiento del agua en las plantas potabilizadoras.

La presencia de cianobacterias en agua contribuye con sus propiedades organolépticas afectando su color y olor, debido a la liberación de compuestos no tóxicos como son la geosmina y el 2-metilisoborneol (Sens *et al.*, 2013). Según indica Meichtry *et al.*, (2009), estos compuestos le dan al agua un olor a tierra, moho o a un conocido insecticida gamexane.

Las floraciones de cianobacterias se reportan como un importante problema en la calidad del agua en muchos países del mundo (Park y Watanabe, 1996), debido a la producción de hepatotoxinas y neurotoxinas que las convierten en un riesgo para la salud, tanto para humanos como en animales.

Microcistinas

Las microcistinas (MCs) de naturaleza peptídica e hidrosolubles son las cianotoxinas que mayor número de intoxicaciones registran, de alta peligrosidad tanto para humanos como animales. La estructura química se presenta en la Figura 3, donde puede apreciarse que es un heptapéptido cíclico, además posee un aminoácido hidrofóbico característico denominado ADDA (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico) responsable de las características tóxicas de la molécula. La isoforma de las microcistinas más estudiada es la LR (MC-LR), que se diferencia por tener una leucina en la posición X y una arginina en la posición Y. (Gianuzzi *et al.*, 2017).

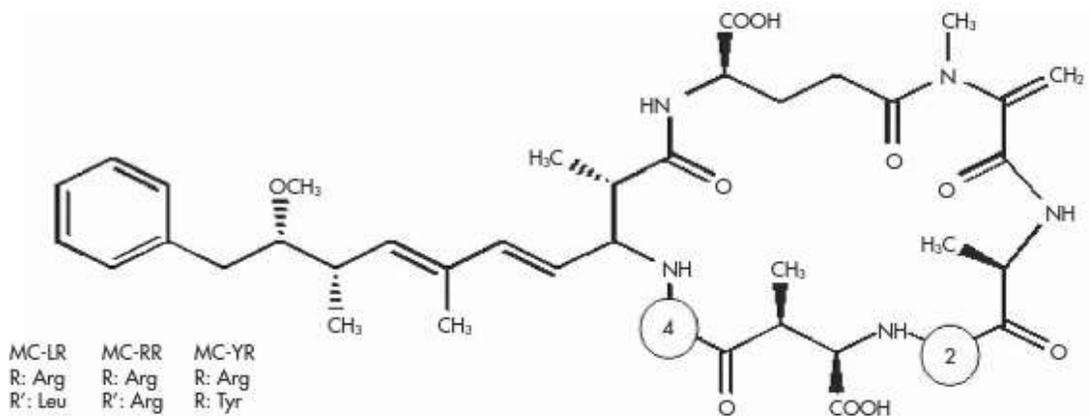


Figura 3: Estructura de la molécula de MC-LR.

Tomado de Gianuzzi *et al.*, 2017

Regulación sanitaria de las microcistinas

La concentración máxima aceptada de microcistinas para agua potable es de 1,0 ppb, según indica la OMS (2006). Países como Polonia y Canadá tienen normativa similar, de 1,0 ppb y 1,5 ppb respectivamente. La legislación brasileña indica 1,0 ppb para las microcistinas y 3,0 ppb para las saxitoxinas, además de un control semanal o mensual del número de células/mL (Sens *et al.*, 2013).

La evaluación de la relación entre las cianotoxinas y la concentración de células es actualmente inadecuada, debido a la falta de métodos estándares para el muestreo ambiental, procesamiento y técnicas analíticas empleadas, lo que hace que las comparaciones no sean confiables, por lo tanto, hasta que no se tengan más datos se recomienda la medición de cianotoxinas, si las densidades celulares son superiores a 2000 células por mL (Otten y Paerl, 2015).

Remoción de cianotoxinas

Debido a que las cianotoxinas se encuentran en el interior de las cianobacterias, es necesario que la remoción de las cianobacterias se realice sin destruir las células, con el fin de que no haya liberación de toxinas al agua. Las cianotoxinas son muy solubles, lo que genera que se requieran otras técnicas de post tratamiento. (Sens *et al.*, 2013).

La EPA (2015) indica que entre las estrategias de tratamiento para aguas con cianobacterias y generalmente empleadas en plantas se tienen: a) la remoción de las cianobacterias intactas, b) minimización de la preoxidación del agua cruda, c) uso de carbón activado, d) incremento de la post cloración. La post cloración, presenta el inconveniente de que se da la formación de sustancias tóxicas como los trihalometanos.

Cianotoxinas en Costa Rica

El monitoreo de la presencia de cianobacterias en fuentes de agua en Costa Rica no es algo que se realice habitualmente. Como se indicó anteriormente y según Reglamento de Calidad de Agua 38924-S y su modificación 41499-S, el monitoreo de estas sólo se realiza en casos de emergencia.

No existen registros de intoxicaciones por cianobacterias, los únicos datos registrados, corresponden a dos investigaciones. La primera investigación publicada data del año 1994, realizada por Peinador (1994) en siete plantas potabilizadoras de agua del Gran Área Metropolitana (GAM), en esta se aislaron 50 especies, de las cuales 25 se identificaron como productoras de cianotoxinas.

La segunda, fue realizada por Avendaño y Arguedas (2006), cuyo objetivo fue determinar la presencia de microcistinas en el agua cruda y tratada de cinco plantas potabilizadoras de agua del Gran Área Metropolitana (Tres Ríos, Guadalupe, Los Sitios, Alajuelita y San Juan de Dios de Desamparados), esto se realizó en época seca y lluviosa. En la época lluviosa se detectó microcistinas con concentraciones inferiores a los 0,5 ppb en el agua cruda, no obstante, en la época seca se detectó microcistinas en concentraciones mayores a 3,0 ppb en el agua cruda que ingresa a la planta de Tres Ríos, esta concentración disminuyó a 0,5 ppb tras el tratamiento que se realiza al agua cruda. Los autores atribuyen esta disminución en la concentración, al tratamiento químico que se realiza al agua, indicando una acción degradativa de los compuestos sobre la microcistina.

Métodos de detección de cianobacterias y cianotoxinas en agua

La detección de cianobacterias y cianotoxinas se puede realizar mediante una diversa variedad de pruebas y métodos de laboratorio, los cuales varían en complejidad e información que proporcionan. Entre estos métodos de identificación se pueden mencionar los siguientes:

- **Microscopio:**

El análisis al microscopio ha sido empleado tradicionalmente para el monitoreo de comunidades de cianobacterias en cuerpos de agua. Es de bajo costo, no obstante, se requiere un importante entrenamiento en la identificación y disponer de bibliografía amplia y actualizada. El análisis de las características morfológicas permite identificar los géneros, sin embargo, no permite discriminar entre cepas tóxicas y no tóxicas (Giannuzzi *et al.*, 2017; Sanseverino *et al.*, 2017).

- **Métodos físico químicos:**

Incluyen la disponibilidad de nutrientes, o presencia de foto-pigmentos que pueden ser empleados para evaluar la condición de crecimiento del fitoplancton en los cuerpos de agua.

- **Medición de clorofila a:** es un pigmento que se analiza frecuentemente en limnología, está presente en muchos organismos y por lo tanto, es un buen indicador del total del fitoplancton autotrófico. Puede ser extraído por medio de metanol o acetona y cuantificado por fluorimetría (Sanseverino *et al.*, 2017).
- **Otros parámetros físico químicos:** otros parámetros como radiación, temperatura del agua, pH, salinidad, concentración de nutrientes como fósforo y nitrógeno, son parámetros empleados para evaluar las condiciones de crecimiento de las cianobacterias en cuerpos de agua Sanseverino *et al.*, 2017).

- **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 y PPIA (ensayo de la inhibición de las enzimas fosfatasas). 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).

- **ELISA:** del acrónimo Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, es un ensayo basado en anticuerpos los cuales pueden ser monoclonales, específicos para ciertas moléculas variantes o policlonales, los cuales reconocen varios tipos de moléculas. Este tipo de ensayo es rápido, sensible y no se requiere alto nivel de experiencia. Son útiles como pruebas preliminares para tamizaje; los límites de detección son de alrededor 0,1 ug/L, sin embargo, son susceptibles a interferencias que limitan su uso en ensayos cuantitativos (Sanseverino *et al.*, 2017).
- **PPIA:** Las microcistinas y nodularinas son potentes inhibidores de las enzimas fosfatasas, por lo tanto, pueden ser detectadas empleando un ensayo de inhibición de las fosfatasas. Este es un método colorimétrico simple, rápido, sensible y reproducible. La inhibición de las enzimas fosfatasas de eucariotas es un ensayo establecido como indicador de la concentración de la toxicidad (Sanseverino *et al.*, 2017). Si la microcistina está presente, se produce la inhibición de la enzima fosfatasa, la cual no podrá hidrolizar el sustrato cromogénico que se agrega, determinándose este cambio por la lectura de absorbancia.

- **Métodos químicos:**

Los métodos químicos empleados para determinar las cianotoxinas en agua, son principalmente separaciones basadas en líquidos, como por ejemplo el HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) combinada con ultravioleta (UV), fluorescencia o detector de masas (Sanseverino *et al.*, 2017).

- **HPLC:** es uno de los procedimientos más sensibles que permiten identificar las microcistinas y nodularinas. Es un método rápido y ampliamente utilizado, no obstante, no es específico, por el contrario se basa en el reconocimiento de espectros de absorción y tiempo de retención determinados, por lo tanto, requiere de técnicas accesorias como el bioensayo o los test enzimáticos para confirmar la presencia y toxicidad de las toxinas (Chorus y Bartran, 1999).

Debido a la gran diversidad de formas moleculares de las microcistinas, no es posible conseguir u obtener todos los estándares requeridos para la completa identificación y cuantificación de variantes de microcistinas, otro aspecto es que las cianobacterias poseen péptidos no tóxicos que generan cromatogramas de compleja interpretación (Chorus y Bartran, 1999; Rivera, 2008; Sanseverino *et a.*,2017).

Objetivos

Objetivo general

- Analizar si las condiciones físico químicas del Embalse El Llano, Cartago favorecen el crecimiento de cianobacterias potenciales productoras de microcistinas.

Objetivos específicos

- Evaluar los datos históricos entre los años 2016-2018 de las condiciones de pH, temperatura, concentración de amonio y concentración de fósforo total del agua del embalse El Llano, para establecer relaciones potenciales de acumulación de microcistinas.
- Determinar la concentración de microcistinas en el afluente y efluente de la planta potabilizadora de Cartago, en la época seca y lluviosa de 2019, para verificar las relaciones potenciales con las condiciones fisicoquímicas del agua.

Materiales y métodos

Análisis histórico de datos disponibles de las épocas secas y lluviosas del período (2016-2018) de pH, temperatura, amonio y fósforo total en el embalse El Llano

Parámetros físico químicos analizados

Se analizaron los datos de pH, temperatura, amonio y fósforo total de las épocas seca, transición y lluviosa entre los años 2016 – 2018. Los datos sin procesar fueron facilitados por el Instituto Costarricense de Electricidad (ICE). Se empleó el programa Minitab 19 para realizar los análisis.

Análisis estadísticos realizados

Estadística descriptiva: Se obtuvo los estadísticos descriptivos (número de campañas realizadas o N, promedio o media, mediana, desviación estándar, máximo, mínimo, el cuartil 1 y cuartil 3) de cada uno de los parámetros analizados.

Análisis de varianza:

Se realizó la prueba Anderson Darling para determinar la normalidad de las variables. En los casos donde no se cumplió la normalidad, se realizó análisis no paramétrico para determinar diferencias entre las épocas, para lo cual se empleó la prueba de la mediana de Mood. En los casos donde se cumplió la normalidad se aplicó la prueba de Tukey. El nivel de significancia empleado fue de 95%.

Concentración de microcistinas en las muestras de la planta potabilizadora de Cartago

Sitio de estudio para la determinación de microcistinas

Las muestras analizadas para determinar la presencia de microcistinas se recolectaron en la Planta Potabilizadora de Cartago ubicada 200 metros oeste de la entrada sur oeste del Tec, en las coordenadas CRTM05 509186 y 1089711; el agua empleada en dicha planta proviene del Embalse El Llano de Orosí, propiedad del ICE. Dicha planta es operada por el AyA. En la Figura 4 se presenta la ubicación espacial de la planta.

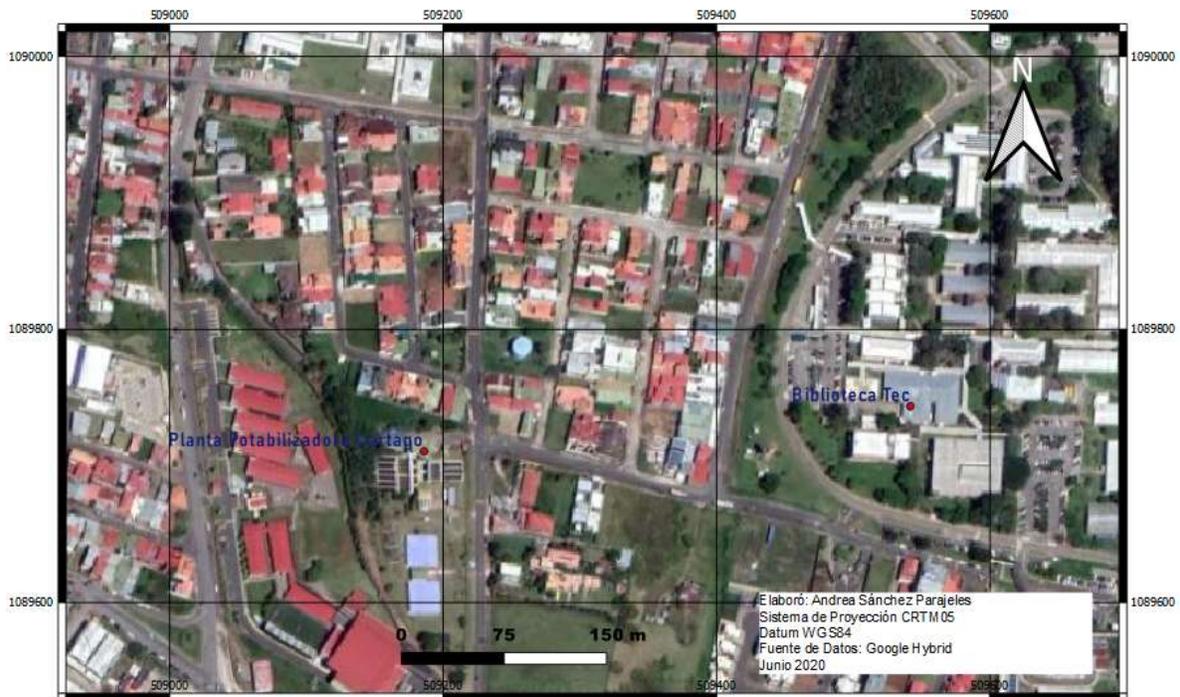


Figura 4: Ubicación de la Planta Potabilizadora de Cartago

Recolección de muestras para determinación de microcistinas

La recolección de las muestras se realizó entre los meses de marzo y agosto del año 2019. En el cuadro 4 se presentan las fechas de muestreo y los sitios en donde se recolectaron las muestras.

Cuadro 4 : Datos de los muestreos realizados en la Planta Potabilizadora de Cartago.

Fecha de muestreo Año 2019	Puntos de muestreo
13 de marzo	Afluente de la planta (agua cruda) (E) Efluente sin clorar (agua tratada sin clorar) (S) Efluente clorada (agua tratada clorada) (SC)
20 de marzo	
03 de abril	
25 de abril	
08 de mayo	
15 de mayo	
08 de agosto	
09 de agosto	

Las muestras se recolectaron en los diferentes puntos indicados en el cuadro 3, se rotularon y almacenaron en contenedores de vidrio en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

Cuantificación de las microcistinas presentes en las muestras

La determinación de la concentración de microcistinas se realizó empleando el kit de Microcystest® del laboratorio español Zeulab, el cual se basa en la capacidad inhibitoria que tienen las microcistinas sobre la enzima fosfatasa.

Para realizar el ensayo se usó 50 μL de cada patrón de Microcistina_LR (0,25 μg , 0,5 μg , 1,0 μg y 2,5 μg) y se colocaron por duplicado en los pocillos de microtitulación, se colocó también por duplicado cada una de las muestras, así como, un control positivo (Microcystin-RR) y un control negativo (agua destilada).

Posteriormente se agregó a cada uno de los pocillos (patrones, muestras y controles), la enzima fosfatasa y el sustrato cromogénico. Seguidamente se incubó a 37°C durante 30

minutos; luego se agregó la solución para detener la reacción y por último se realizó la lectura a una longitud de onda de 405 nm. El análisis que se realizó a las microcistinas presentes se determinó de forma total, debido a que al congelar las muestras, las toxinas son liberadas, por lo tanto, se determinaron las que estaban dentro como fuera de la célula. En el anexo 1 se presentan los detalles del procedimiento descrito.

Para relacionar la absorbancia de las muestras con la concentración de la sustancia de interés (microcistina-LR), se realizó una curva de calibración con los patrones del mismo kit (0,25 µg; 0,50 µg; 1,0 µg y 2,5 µg). Se elaboró un gráfico con los datos de absorbancia de cada patrón a 405 nm en el eje Y, con la concentración de Microcistina L-R en escala logarítmica en el eje X, esto de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del kit. De esta manera se obtuvo la ecuación de la curva y el valor R^2 .

- **Estación seca**

La curva de calibración obtenida en la primera corrida realizada para evaluar las muestras recolectadas en la estación se seca, se presenta en la Figura 5. Con esta curva de calibración, se obtuvo la ecuación que permitió obtener las concentraciones encontradas de microcistinas en las muestras en la época seca.

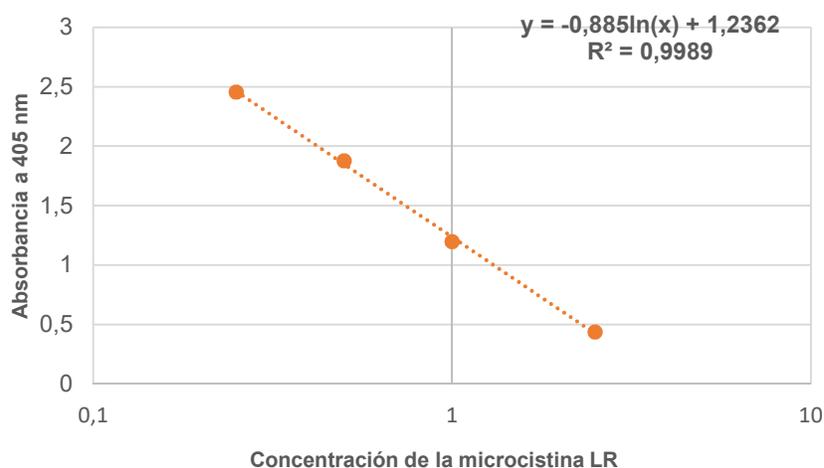


Figura 5: Curva de calibración obtenida en corrida de muestras de estación seca

- **Estación lluviosa**

La curva de calibración obtenida de la segunda corrida realizada para las muestras de la estación lluviosa, se presenta en la Figura 6. Mediante esta curva de calibración, se obtuvo la ecuación que permitió obtener las concentraciones encontradas de microcistinas en las muestras en la época lluviosa.

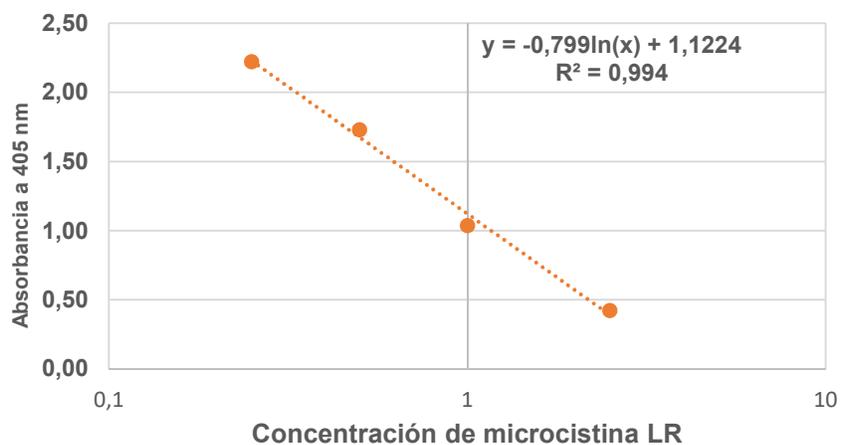


Figura 6: Curva de calibración obtenida en corrida de muestras de estación lluviosa

Resultados y Discusión

Análisis histórico de datos disponibles de las épocas secas y lluviosas del período (2016-2018) de pH, temperatura, amonio y fósforo total en el embalse El Llano

El análisis de estadística descriptiva de las variables físico-químicas, por período climatológico o época, se presenta en el Cuadro 5. El pH y la temperatura se comportaron como variables con distribución de probabilidad normales, a diferencia de la concentración de fósforo y amonio, lo anterior de acuerdo a la prueba de Anderson Darling (Apéndice 1). Por lo tanto, se empleó estadística paramétrica (prueba de Tukey) para el pH y temperatura; y no paramétrica (mediana de Mood) para la concentración de amonio y fósforo, y determinar si existieron diferencias de sus valores entre las épocas de muestreo.

Cuadro 5: Estadísticos básicos de los parámetros analizados

Variable	Época	N	Media	Mediana	D.E*	Máximo	Mínimo	Q1**	Q3***	Significancia estadística (p-value)****
pH	Lluviosa	15	6,90	7,0	0,36	7,40	6,20	6,60	7,17	0,03
	Seca	9	7,06	6,90	0,45	7,80	6,60	6,75	7,45	
	Transición	12	7,38	7,30	0,55	8,80	6,70	7,03	7,64	
Temperatura (°C)	Lluviosa	15	15,59	15,20	1,11	17,90	14,40	14,90	16,20	0,16
	Seca	9	15,06	14,50	1,35	17,50	13,50	13,95	16,30	
	Transición	12	15,98	15,90	0,73	17,20	14,90	15,30	16,60	
Fósforo Total (mg/L)	Lluviosa	15	5,68	3,19	5,94	19,86	0,50	1,60	9,40	0,011
	Seca	8	1,90	2,21	0,93	3,04	0,56	0,92	2,66	
	Transición	12	0,59	0	0,91	2,93	0,00	0,00	1,20	
Amonio(ug/L)	Lluviosa	12	198,80	37,8	299,10	821,00	18,80	31,60	435,10	0,002
	Seca	6	674,00	703,0	99,60	766,00	538,00	568,00	758,50	
	Transición	12	610,60	527,9	314,50	1182,00	96,00	400,10	895,80	

*D.E=Desviación Estándar/ **Q1=cuartil 1/ ***cuartil 3. **** Valores de p inferiores al nivel Alpha (5%, 0.05) indican diferencia estadística significativa para la variable en evaluación.

pH

El pH encontrado en las diferentes épocas del periodo (2016-2018) permite inferir que son aguas que tienden a la neutralidad, aunque existen momentos en los que tienden a ser ligeramente ácidas o ligeramente alcalinas. Estas condiciones permitirían el desarrollo de las cianobacterias, las cuales pueden desarrollarse bien en ambientes neutros y alcalinos (Okechukwu y Ugwumba, 2009; Gao *et al.*, 2014). Se encontraron diferencias entre las épocas transición y lluviosa, sin embargo, no se encontraron diferencias entre la época seca y transición, ni entre la seca y lluviosa ($\alpha=0,05$).

En la Figura 7 se presenta el comportamiento del pH en las diferentes épocas; se observó que en la época lluviosa, el pH en algunos de los muestreos presentaba tendencia a ser ligeramente ácida, lo que podría deberse a que al ser agua superficial, en época de lluvia arrastra más suelo y por lo tanto, mayor presencia de ácidos húmicos (Camargo y Cruz (1999)

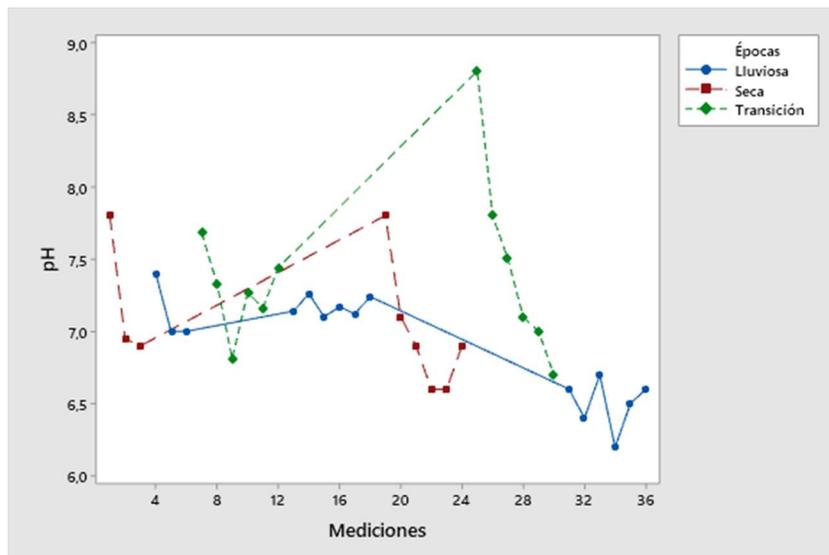


Figura 7: Comportamiento del pH en las diferentes épocas entre el año 2016-2018.

Temperatura

El agua del embalse El Llano procede del Parque Nacional Tapantí, lugar que posee extensa vegetación y con influencia de zonas altas, lo que provoca que esta posea temperaturas bajas, no superando las máximas los 18 °C, cómo se observa en el Cuadro 5 y Figura 8.

Al aplicar la prueba de Tukey no se encontraron diferencias significativas entre las épocas de los años 2016-2018 ($\alpha=0,05$), aunque sí se observa que, en la época seca, algunas de las mediciones realizadas reportan temperaturas inferiores a los 15 °C. Sin embargo, estas temperaturas no serían un impedimento para el crecimiento de cianobacterias, ya que, aunque las temperaturas óptimas de crecimiento son superiores a los 25 °C (Paerl y Huisman, 2008; Mour *et al.*, 2011; Glibert, 2020); la gran capacidad adaptativa que poseen, les permite que también puedan crecer a temperaturas entre 11-15 °C (Fabre *et al.*, 2010; Cantoral *et al.*, 2017).

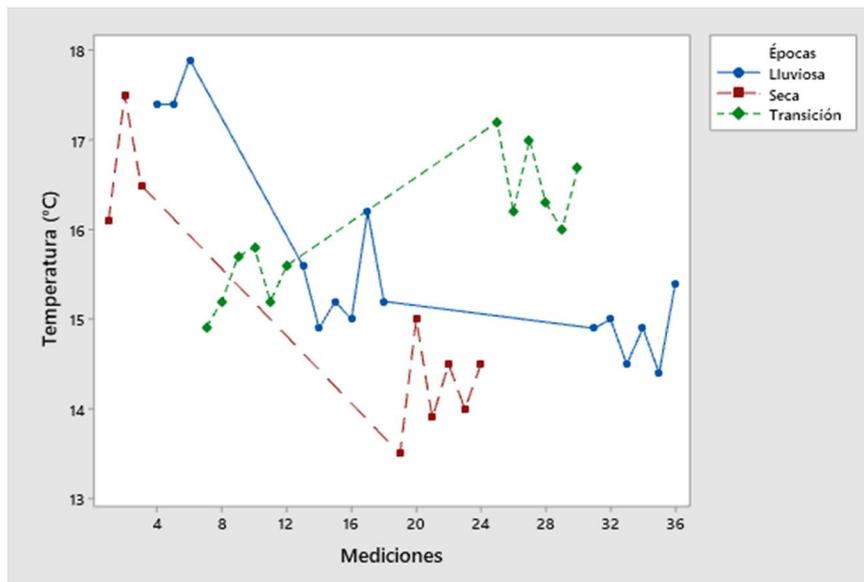


Figura 8: Comportamiento de la temperatura en las diferentes épocas *entre el año 2016-2018*.

Amonio

Las concentraciones de amonio en el Embalse El Llano en diferentes épocas entre los años (2016-2018) fueron más elevadas en la época seca y transición, que en la época lluviosa (Ver Cuadro 5 y Figura 9), debido probablemente al factor de concentración por mayor evaporación en la época seca y transición; por el contrario en la época lluviosa, la concentración fue inferior debido probablemente al factor de dilución al existir mayor cantidad de lluvias. No se encontraron diferencias significativas entre la época seca y transición, sin embargo, sí se encontraron diferencias entre la época lluviosa y seca; y lluviosa y transición ($\alpha=0,05$).

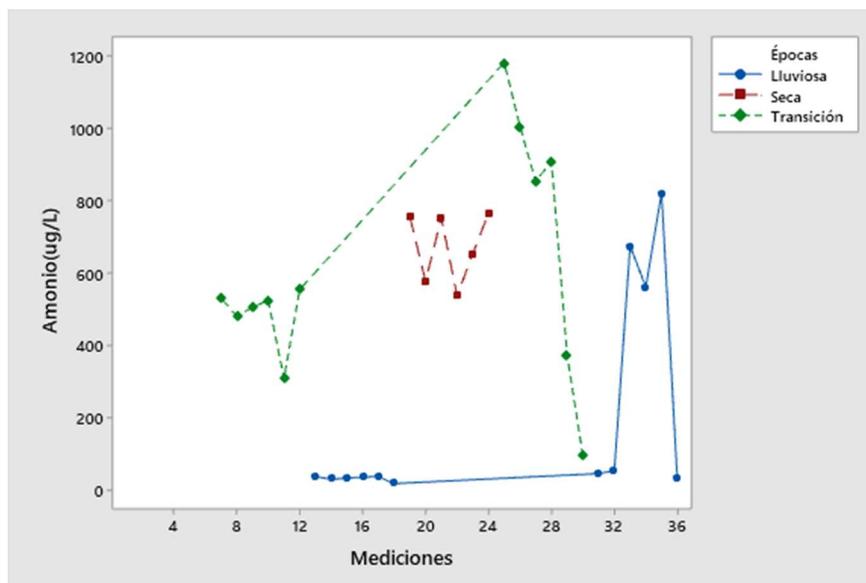


Figura 9: Comportamiento del amonio en las diferentes épocas *entre los años 2016-2018*.

Carrasco (2007) indica que en concentraciones superiores de 70 $\mu\text{g/L}$ de amonio, se pueden desarrollar cianobacterias tóxicas por lo tanto, las concentraciones encontradas en el Embalse El Llano en las diferentes épocas en el periodo analizado, sí permitirían el crecimiento de cianobacterias no fijadoras de nitrógeno, ya que en el caso de las fijadoras, no sería un impedimento.

Fósforo total

La mayor cantidad de fósforo total encontrada en la época lluviosa (Ver Cuadro 5 y Figura 10), se podría deber a que en la época lluviosa debido a las precipitaciones y al mayor ingreso de agua al embalse, se da la suspensión de sedimentos del fondo del embalse, lo que favorece la liberación del fósforo acumulado en los sedimentos (Cobo, 2015), además que en época lluviosa el agua transita por rocas que podrían aportar fósforo (Beita y Barahona, 2010). Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre la época lluviosa y seca, y lluviosa y transición, pero no entre seca y transición (con un nivel de significancia del 95%).

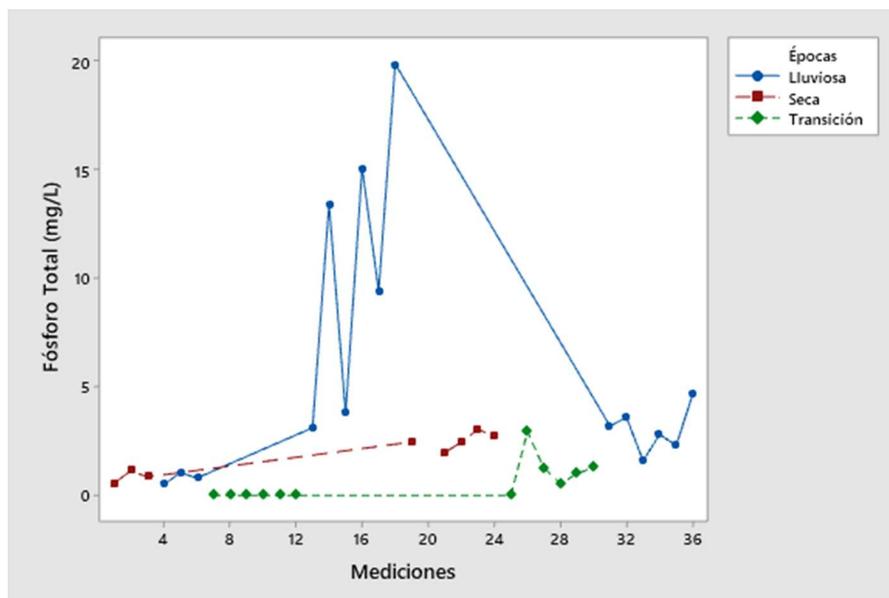


Figura 10: Comportamiento del fósforo total en las diferentes épocas *entre el año 2016-2018*.

Estas concentraciones reportadas por el Instituto Costarricense de Electricidad (ICE) en mg/L y analizadas en este estudio son elevadas. Según indican varios autores, para que un embalse se considere eutrófico y se favorezcan las floraciones de cianobacterias, se requieren concentraciones entre 25-100 $\mu\text{g/L}$ (WHO, 2015; Meichtry *et al.*, 2009; Ledesma *et al.*, 2013). Por lo tanto, las concentraciones presentadas favorecerían el crecimiento de las cianobacterias.

Las condiciones de pH, temperatura, fósforo y amonio presentadas en el embalse en las épocas seca, transición y lluviosa entre los años 2016-2018 y mostradas anteriormente, indican que bajo esas condiciones las cianobacterias sí pueden crecer, por lo tanto, y con

el antecedente de que en el año 1994 Peinador, aisló del agua de la Planta potabilizadora de Tres Ríos, tres cianobacterias que pueden producir toxinas, además que en el año 2006, Avendaño y Arguedas encontraron cianotoxinas en concentraciones superiores a las normadas en la legislación nacional en el agua cruda de la Planta Potabilizadora de Tres Ríos. Debido a lo anterior se realizó un ensayo en el año 2019 para determinar la presencia de microcistinas L-R, en el agua de la planta potabilizadora de Cartago, la cual tiene el mismo origen que la Planta Potabilizadora de Tres Ríos.

Concentración de microcistinas en las muestras de la planta potabilizadora de Cartago

Los resultados obtenidos del análisis realizado al agua de la Planta Potabilizadora de Cartago en la estación seca y lluviosa se presentan en los Cuadros 5 y 6, respectivamente. De acuerdo a los resultados obtenidos, **no se detectaron** en el agua microcistinas (MCs) en una concentración superior a 0,25 µg/L, en los días en que se realizaron los muestreos.

Cuadro 6: Resultados obtenidos de la estación seca

Punto de muestreo	Fecha de recolección de muestra	Código de muestra	Absorbancia a 405 nm	Concentración (µg/L)	Concentración corregida	Resultado
E	13 de marzo	M1	2,53	0,23	0,01	No detectable
S		M2	2,26	0,33	0,11	No detectable
Sc		M3	2,55	0,23	0,01	No detectable
E	20 de marzo	M4	2,52	0,23	0,01	No detectable
S		M5	2,60	0,22	0	No detectable
Sc		M6	2,46	0,25	0,03	No detectable
E	3 de abril	M7	2,62	0,20	-0,02	No detectable
S		M8	2,56	0,22	0	No detectable
Sc		M9	2,55	0,23	0,01	No detectable
E	25 de abril	M10	2,61	0,23	0,01	No detectable
S		M11	2,57	0,22	0	No detectable
Sc		M12	2,30	0,30	0,08	No detectable
Control positivo		Control	0,29	2,92	NA	Detectable
Control negativo		Agua destilada	2,58	0,22	NA	No detectable

Cuadro 7: Resultados obtenidos de la estación lluviosa

Punto de muestreo	Fecha de recolección de muestra	Código de muestra	Absorbancia a 405 nm	Concentración (µg/L)	Concentración corregida	Resultado
E	8 de mayo	M13	2,48	0,18	0,02	No detectable
S		M14	2,53	0,18	0,02	No detectable
Sc		M15	2,63	0,17	0,01	No detectable
E	15 de mayo	M16	2,51	0,17	0,01	No detectable
S		M17	2,43	0,19	0,03	No detectable
Sc		M18	2,39	0,20	0,04	No detectable
E	8 agosto	M19	2,23	0,24	0,08	No detectable
S		M20	2,43	0,20	0,04	No detectable
Sc		M21	2,46	0,19	0,03	No detectable
E	9 agosto	M22	2,71	0,16	0,00	No detectable
S		M23	2,58	0,17	0,01	No detectable
Control positivo		Control	0,28	2,83	NA	Detectable
Control negativo		Agua destilada	2,58	0,22	NA	No detectable

La no detección de MCs en el agua cruda de la planta Potabilizadora de Cartago en concentraciones superiores a 0,25 µg/L (límite de detección del método empleado), aun cuando las condiciones físico químicas analizadas en el historial en el periodo 2016-2018 (pH, temperatura, fósforo y amonio), eran favorables para el crecimiento de las cianobacterias, generó la interrogante ¿Qué otras variables podrían estar influyendo en el crecimiento de éstas y la generación de toxinas?, determinándose algunos factores que podrían estar influyendo en este resultado, entre ellas, tiempo de retención, concentración de fósforo, presencia de sedimentos, entre otros.

En la literatura se menciona que la presencia de sedimentos en los embalses influye en la disminución de la concentración de toxinas. Al respecto, Herrera *et al.*, (2015), indican en su estudio, que en las muestras donde se tenía sedimento, la concentración de MC-LR disminuyó hasta niveles inferiores al límite de detección, por el contrario en muestras con agua sin sedimento, la concentración de MC-LR se mantuvo constante en concentraciones del orden de 5 µg/mL. El efecto del sedimento sobre la concentración de MC-LR también fue investigado por Song *et al.*, (2014), encontrando que la presencia de la MC-LR disminuyó significativamente en forma exponencial en presencia de sedimentos. La cantidad de sedimentos del embalse El Llano según datos suministrados por el ICE (L. Rodríguez, comunicación personal correo electrónico, 2 de marzo de 2020), es de aproximadamente 136.130 m³, cantidad importante que podría estar ayudando en la disminución de MCs, lo que podría explicar por qué no se detectaron con el método empleado.

Además, existen bacterias capaces de degradar MCs, las cuales se han encontrado en varios ecosistemas acuáticos (Chorus y Bartram, 1999). Lezcano (2017), detectó actividad de biodegradación de microcistinas en el embalse San Juan en España, además, aisló bacterias de las familias *Sphingomonadaceae* y *Xanthomonadaceae*, las cuales lograron disminuir la concentración de MC en el orden de entre 90 - 2.230 veces su concentración inicial. No se descarta, que la no detección de MC en el agua del embalse El Llano, esté asociada a la biodegradación de estas de parte de otros microorganismos que crecen en el agua del embalse.

Con respecto al tiempo de retención del embalse, este podría no favorecer el crecimiento masivo de cianobacterias y por ende la producción de las cianotoxinas. Después de realizar la consulta respectiva al personal del ICE sobre caudales y volúmenes útiles, se determinó que el tiempo de retención es de escasos 2 días (L. Rodríguez, comunicación personal correo electrónico, 2 de marzo de 2020); el cual es un tiempo corto, lo que podría explicar por qué no se detectaron las MC-LR en concentraciones superiores al límite de detección. Como se ha mencionado anteriormente, la producción de cianotoxinas está asociado al crecimiento masivo de cianobacterias conocidos como **blooms** o **floraciones**, sin embargo, como mencionan Bartram, 1999; Kruk, *et al.*, 2019, tiempos inferiores a 5 días parece que no favorecen la formación de estos crecimientos masivos y por ende de las cianotoxinas en concentraciones elevadas, lo cual podría explicar la no detección de cianotoxinas por el método empleado.

Otra razón que podría explicar la ausencia de MCs en concentraciones superiores al límite de detección, es la alta concentración de fósforo en el agua del embalse. Hay investigaciones que indican que a altas concentraciones de este elemento, la producción de toxinas se ve disminuida (Chen *et al.*, 2008; Kameyama *et al.*, 2010). No obstante, se desconoce la razón de esta situación, ya que se podría pensar que al favorecerse el crecimiento de las cianobacterias con la alta concentración de nutrientes, se favorecería también la producción de toxinas, sin embargo, como menciona Quiblier *et al.*, (2013), los datos sobre las variables que regulan el crecimiento y producción de toxinas, no son claros y aún existe la necesidad de investigación para elucidar o esclarecer esta información.

La concentración baja de cianotoxinas no significa que las productoras de estas no están presentes, por ejemplo, Aboal y Puig (2005), encontraron en el Río Cenajo concentraciones de microcistinas en el orden de entre 0,032-0,078 µg/L en el año de estudio, mientras que para el río Ojos sólo las detectaron en la época de verano en concentraciones de 0,170 µg/L, asociadas al crecimiento de cianobacterias bentónicas como *Rivularia blasolettiana*, *Tolypothrix distoria* y *Phormidium* sp. Por lo tanto, el hecho de que en este estudio no se detectaron MCs-LR en concentraciones superiores a 0,25 µg/L, no significa que las toxinas no están presentes en concentraciones menores, o que las cianobacterias no están creciendo. Al respecto del estudio de Aboal y Puig (2005), llama la atención que la producción de cianotoxinas en bajas concentraciones estuviese asociada sólo a cianobacterias bentónicas y no planctónicas.

Sobre las primeras, como su nombre lo indica, poseen unas estructuras que les permite fijarse o adherirse; el desarrollo de estos tapetes de cianobacterias puede ocurrir en una variedad de sustratos como rocas, arena, sedimentos o inclusive estructuras artificiales, lo que evita que sean arrastradas por la velocidad de la corriente (Quiblier *et al.*, 2013; Bojorge y Uriza, 2016). También existen cianobacterias que poseen ciclos de vida pelágico y béntico, lo que significa que puede crecer en la columna de agua y también adheridas a piedras o sedimentos, como por ejemplo *Microcystis* sp (Brunberg y Blomqvist; 2002)

El crecimiento de este tipo de cianobacterias bentónicas o las que poseen dobles ciclos como la *Microcystis* sp, podría verse favorecido en el embalse El Llano, ya que podrían adherirse a las piedras de los ríos que alimentan el embalse, al sedimento, a estructuras como la toma de aguas, tanques o inclusive a algunas tuberías de conducción que dependiendo de su estado podrían favorecer su adherencia, crecimiento y producción de toxinas. No obstante, esto deberá de corroborarse con más investigación al respecto, ya que existe poca información sobre las cianobacterias en el país, y lo poco que existe hace referencia a las cianobacterias planctónicas.

La temperatura promedio de acuerdo al historial del agua del embalse El Llano (2016- 2018) fue de 15,50 °C; no superando las máximas los 18,0 °C. Ante el cambio climático, estas temperaturas podrían aumentar; según indica Glibert (2020), las proyecciones del calentamiento global, indican un calentamiento > 1,5 °C. Este calentamiento jugará un rol en el establecimiento, duración y severidad de los afloramientos de cianobacterias y de la producción de las cianotoxinas (Qin *et al.*, (2010). Por lo tanto, el manejo a largo plazo de lagos y embalses que sirven para el abastecimiento de agua potable, deberá contemplar el factor humano y el climático, así como el manejo de las cuencas y subcuencas que alimentan estos.

Ante estos escenarios de cambio climático, y con la gran capacidad adaptativa que poseen las cianobacterias (Cantoral *et al.*, 2017), no se descarta que las cianobacterias planctónicas y/o bentónicas crezcan en concentraciones importantes en los ríos que alimentan el embalse o en el propio embalse El Llano, liberando toxinas y afectando la calidad del agua potable, por lo tanto, es importante considerar un monitoreo periódico. Al respecto, Chorus y Bartram (1999); Bonilla y Aubriot (2009) mencionan la importancia de establecer niveles de vigilancia y alerta temprana, realizando monitoreos en las plantas de potabilización y estableciendo árboles de decisión que permitan además de generar información sobre el crecimiento de las cianobacterias en reservorios de agua potable,

establecer medidas correctivas en caso de presentarse en concentraciones que puedan afectar la salud de las personas.

Las posibles causas de la no detección de las MCs en el agua de la planta potabilizadora de Cartago, el posible crecimiento de las cianobacterias planctónicas y bentónicas y los efectos del cambio climático sobre los afloramientos en embalses, abre líneas de investigación necesarias y muy interesantes para el país, que permitirán determinar las causas locales de la liberación, producción y biodegradación de toxinas, así como la identificación de las cianobacterias que pueden estar creciendo, y las medidas que deben considerarse ante el cambio climático.

Conclusiones

- El historial de las características físico químicas (pH, temperatura, amonio y fósforo total), del agua del embalse El Llano en los muestreos realizados por el ICE en las diferentes épocas entre 2016-2018, indican que son favorables para el crecimiento de las cianobacterias, no obstante, la no detección de las MCs por medio del test Mycrocistest®, podría deberse a la presencia de sedimentos, aireación, biodegradación de las toxinas por otros microorganismos e inclusive, por el tiempo de retención del embalse, todo esto deberá investigarse con mayor detalle.
- El test Mycrocistest® aplicado para determinar la concentración de microcistinas en el agua de la planta potabilizadora de Cartago, procedente del embalse El Llano, demostró que no se detectaron MCs en concentraciones iguales o superiores a 0,25 µg/L, en las campañas de muestreo realizadas en época seca y lluviosa del año 2019, cumpliendo con el valor límite de 1 µg/L, establecido por la OMS para este tipo de toxina. No obstante, esto no significa que no existan en concentraciones inferiores.
- No se descarta la presencia de cianobacterias en el agua del embalse, ya que con el test aplicado lo que se determinó fue la presencia de microcistinas. Se requieren estudios adicionales que permitan determinar tipos y densidades de cianobacterias en el agua del embalse en estudio.
- El cambio climático, y especialmente el calentamiento del planeta podría favorecer el crecimiento de las cianobacterias en los cuerpos de agua para consumo humano y para recreación, de ahí la importancia de más investigación para conocer sobre las cianobacterias y sus toxinas en ambientes tropicales.

Recomendaciones

- Debido a lo elevado de las concentraciones de fósforo total reportadas por el ICE, se recomienda realizar más muestreos en el embalse y por más tiempo, para determinar si este comportamiento se mantiene; también se recomienda incluir este parámetro en el monitoreo para el agua cruda que ingresa a la Planta Potabilizadora de Cartago, ya que actualmente no se realiza, porque no es un parámetro normado en el Reglamento de la Calidad del Agua 38924-S y su modificación el 41499-S, sin embargo, podría a futuro dar información importante sobre la fluctuación de este parámetro, que es clave para el desarrollo de las cianobacterias.
- Se recomienda establecer un monitoreo y vigilancia inicial, el cual se puede realizar por medio del análisis al microscopio, para determinar las densidades de las cianobacterias. La literatura menciona que en caso de detectar densidades superiores a 2000 células/mL (Otten y Paerl, 2015), es necesario determinar su toxicidad por algún método, como el test empleado en este estudio u otro que se tenga disponible en el mercado, que ofrezca alta especificidad y sensibilidad.
- En el país existe poca investigación sobre las cianobacterias y sus toxinas en fuentes de agua potable y de recreación. Por lo tanto, es necesario que se amplíen las investigaciones sobre este tipo de seres vivos, con el fin de tener más información que permita visualizar posibles afectaciones en un futuro próximo, debido al cambio climático.

Bibliografía

- ABOAL, M; PUIG, M. 2005. Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the River Segura basin, Murcia, SE Spain *Toxicon* 45(4):509-18
- ADDY, K; GREEN, L; HERRON, E. 2005. Nitrogen and water Quality. University of Rhode Island (en línea). Consultado el 5 de febrero de 2020. Disponible en <http://cels.uri.edu/docslink/ww/Publications/NitrogenFactsheet.pdf>
- AGUILERA, A; ECHENIQUE, R. 2011. Consideraciones generales de cyanobacterias: aspectos ecológicos y taxonómicos. En *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud*. Departamento de Salud Ambiental. Argentina. p.21-40
- AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 2015. A water utility manager's guide to cyanotoxins (en línea). Consultado el 5 de setiembre de 2017. Disponible en <http://www.waterrf.org/PublicReportLibrary/4548a.pdf>
- AVENDAÑO, A; ARGUEDAS, C. 2006. Microcistinas en plantas de tratamiento de agua para consumo humano en un ambiente tropical: Área Metropolitana de Costa Rica. *Revista Biología Tropical*. 54(3): 711-716
- BEITA, W; BARAHONA, M. 2010. Físico-química de las aguas superficiales de la cuenca del río Rincón, Península de Osa, Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED*. 2 (2): 157-179
- BONILLA, S; AUBRIOT, L. 2009. Cianobacterias plactónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión (en línea). Revisado el 16 de agosto de 2019. Disponible en: <http://limno.fcien.edu.uy/divulgacion/manual.de.cianobacterias.pdf>
- BOJORGE, M Y URIZA, E. 2016. La importancia ecológica de las algas en los ríos. *Hidrobiológica* 26 (1): 1-8.
- BRUNBERG, A; BLOMQUIST, P. 2002. Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions. *Journal of plankton research* 24: (2): 1247-1252.

- CAMARGO, M; CRUZ, L. 1999. Sustancias húmicas en aguas de abastecimiento. Revista Ingeniería e Investigación 44
- CAMARGO, J; ALONSO, A. 2007. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua e implicaciones del cambio climático. Asociación española de ecología terrestre, Ecosistemas. 16(2): 98-110
- CANTORAL, E; ASECIO, A; ABOAL, M. 2017. Cianotoxinas:efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. Hidrobiológica. 27 (2):241-251
- CARMICHAEL, W. 1994. The toxins of cyanobacterias. Science American 270: 78-86
- CARRASCO, D. 2007. Cianobacterias planctónicas y cianotoxinas en embalses españoles. Tesis PhD. Madrid, España. Universidad Autónoma de Madrid 300 p.
- COBO, F. 2015. Métodos de control de las floraciones de cianobacterias en aguas continentales. Limnética 34 (1): 247-268
- CHEN, G; YANG, Z; MA, Y; DING, CH. 2008. Effect of nitrogen and phosphorous on the production of microcystin under laboratory conditions. Journal of hygiene research. 37(2):147-50
- CHORUS, I; BARTRAM, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences monitoring and management. London.Editorial E & FN Spon. s.p.
- COSTAS, E; LÓPEZ, V. 2006. Cianobacterias tóxicas y mortandades masivas en el parque nacional Doña Ana: red de alerta temprana y estrategias de gestión (en línea). Consultado el 12 de febrero de 2020. Disponible en [https://www.miteco.gob.es/es/red-parques-nacionales/ Embalse el Llano. Datos 2016-2019-investigacion/oapn_inv_art_0204_tcm30-65610.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/red-parques-nacionales/Embalse%20el%20Llano.%20Datos%202016-2019-investigacion/oapn_inv_art_0204_tcm30-65610.pdf)

- DAVIS, T; BERRY, D; BOYER, G; GOBLER, C. 2009. The Effects of Temperature and Nutrients on the Growth and Dynamics of Toxic and Non-Toxic Strains of Microcystis during Cyanobacteria Blooms. Harmful Algae 8 (5): 715-725
- DECRETO 38924-S. Diario oficial La Gaceta 69, setiembre 2015. Imprenta Nacional, Uruca. Costa Rica
- DECRETO 41499-S. Diario oficial La Gaceta 15, Enero 2019. Imprenta Nacional, Uruca. Costa Rica
- EPA, 2014. Cyanobacteria and cyanotoxins:information for drinking water systems (en línea). Consultado el 3 de setiembre de 2017. Disponible en https://www.epa.gov/sites/production/files/201408/documents/cyanobacteria_factsheet.pdf
- EPA, 2015. Recommendations for public water systems to manage cyanotoxins in drinking water (en línea). Consultado el 1 de setiembre de 2017. Disponible en <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/recommendations-public-water-systems-manage-cyanotoxins-drinking>
- FABRE, A; CARBALLO, C; HERNÁNDEZ, E; PIRIZ, P; BERGAMINO, L; MELLO, L; GONZÁLEZ, S; PÉREZ, G; LEÓN, J; AUBRIOT, L; BONILLA, S; KRUK, C. 2010. Pan American Journal of Aquatic sciences 5(1):112-125
- FUENMAYOR, G; JONTE, L; ROSALES, N; MORALES, E. 2009. Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria sp* en relación al pH en cultivos discontinuos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 29:21-25
- GAO, Y; CORNWELL, J; STOECKER, D; OWENS, M. 2014. Influence of cyanobacteria blooms on sediment biogeochemistry and nutrient fluxes. Limnol Oceanography 59 (3): 959-971

- GIANNUZZI, L; PETCHENESHKY, T; HANSEN, M. 2017. Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Ministerio de Salud-Argentina (en línea). Consultado el 5 de febrero de 2020. Disponible en http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000334cnt-Ciano_2017.pdf
- GIRALDEZ, N; MATEO, P; BONILLA, I; FERNÁNDEZ, F. 1997. The relationship between intracellular pH, growth characteristics and calcium in the cyanobacterium *Anabaena* exposed to low pH. *New phytol* 137:599-605
- GLIBERT, P. 2020. Harmful algae at the complex nexus of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 91:1-15
- GONZÁLEZ, E; ORTAZ, M. 1998. Efectos del enriquecimiento con N y P sobre la comunidad del fitoplancton en microcosmos de un embalse tropical (La Mariposa, Venezuela). *Revista Biología Tropical* 46(1) 27-34
- GUARMÁN, M; GONZÁLEZ, N. 2016. Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador (en línea). Consultado el 10 de abril de 2020. Disponible en <http://energia.org.ec/cie/wp-content/uploads/2017/09/Catlogo-de-Microalgas-y-Cianobacterias-del-Ecuador.pdf>
- HERRERA, N; FLÓREZ, M; ECHEVERRI, F. 2015. Evaluación preliminar de la reducción de microcistina-LR en muestras de florecimiento a través de sistemas sedimentarios. *Revista internacional de contaminación ambiental* 31(4) 405-414.
- KAMEYAMA, K; SUGIURA, H. ISODA, Y; INAMORI, Y. MAEKAWA. T. 2010. Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by *Microcystis viridis*. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 5 : 443-449
- KRUK, C; MARTÍNEZ, A; MARTÍNEZ, G; TRINCHIN, R; MANTA, G; SEGURA, A; PICCINI, C; BREANA, B; FABIANO, G; PIREZ, M; GABITO, L; ALCÁNTARA, I; YANICELLI, B. 2019. Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. *Revista del laboratorio tecnológico de Uruguay*. 18: 36-68

- KUIPER, I; FALCONER, I; FITZGERALD, J. 1999. Human health aspects. En Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Editado por Chorus y Bartram. WHO. s.p.
- LAGO, L; BARCA, S; VIEIRA-LLANERO, R; COBO, F. 2015. Características ambientales, composición del fitoplancton y variación temporal de microcistina-LR disuelta en el embalse de AS Forcadas (Galicia, España). *Limnetica*, 34 (1): 187-204
- LEDESMA, C; BONANSEA, M; RODRÍGUEZ, C; SÁNCHEZ A. 2013. Determinación de indicadores de eutrofización en el embalse Río Tercero, Córdoba (Argentina). *Revista Ciencia Agronómica* 44 (3): 419-425
- LEPILLANCA, F; MARTÍNEZ, G; BORDET, F; O´FARREL, I; PICCINI, C. 2018. Detection of toxic *Microcystis* sp. genotypes with different environmental preferences. Case study: Salto Grande reservoir. *INNOTECH* 16:08-16
- LEZCANO, M. 2017. Biodegradation of microcystins by freshwater bacteria: new genetic and ecological perspectives. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 219 pages.
- 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.
- MEICHTRY, N; MARTENS, I; LLANO, V. 2009. Cyanobacterias 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
- MOUR, A; DANTAS, E; OLIVIRA, H; BITTENCOURT, O. 2011. Dinâmica vertical e temporal de cianobactérias no reservatório de Carpina de abastecimento de água no nordeste do Brasil *Brazilian Journal of Biology* 71 (2):451-459

- MRDJEN, I; FENNESSY, S; SCHALL, A; DENNIS, R; SLONCZEWSKI, J; LEE, S; LEE, J. 2018. Tile drainage and anthropogenic land use contribute to harmful algal blooms and microbiota shifts in inland water bodies. *Environmental Science & Tecnology*. 52: 8215-8223
- NABOUT, J; DA SILVA, B; MELO, F; SANT'ANNA, C. 2013. How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodiversity and conservation* 22: 2907-2918
- O'NEIL, J; DAVIS, T, BURFORD, M; GOBLER, J. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14: 313–334
- OKECHUKWU, O; UGWUMBA, A. 2009. Cyanobacteria abundance and its relationship to water quality in te mid cross river floodplain, Nigeria. *Revista Biología Tropical*. 57 (1): 33-43
- OMS (2006). Guías para la calidad del agua potable (en línea). Consultado el 1 de setiembre de 2018. Disponible en http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf
- OTTEN, T; PAERL, H. 2015. Health effects of toxic cyanobacteria in U.S. drinking and recreational waters: our current understanding and proposed direction. *Curr Environ Health* 2:75-84
- PAERL, H; HUISMAN, J. 2008. Blooms like it hot. *Science*, 320 (5872), 57-58
- PARK, H; WATANABE, M. 1996. Toxic Mycrocystis in eutrophic lakes. *Toxic Microcystis*. CRC Press, London. 57-58
- PEINADOR, M. 1994. Cianobacterias potencialmente tóxicas en plantas de tratamiento de agua de Costa Rica. *Biología Tropical* 42 5-8
- PRIETO, A; PUERTO, P; MORENO, J; CAMÉAN, A. 2008. Efectos tóxicos producidos por las microcistinas en peces. *Rev. Toxicol* 25:22-31

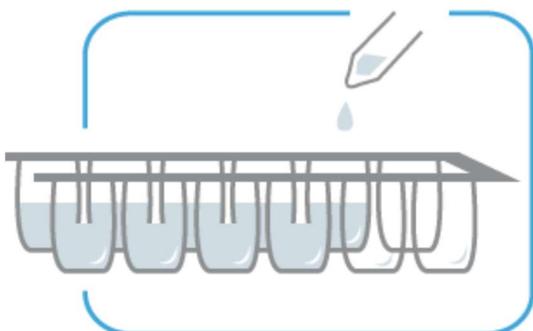
- QIN, B; ZHU, G; GAO, G; ZHANG, Y; PAERL, H; CARMICHAEL, W. 2010. A drinking water crisis in Lake Taihu, China: linkage to climatic variability and lake management. *Environmental Management* 45 105-12
- QUESADA, A; CARRASCO, D; CIRÉS, S. 2006. Cianobacterias en aguas de consumo y recreo: un problema de todos. Departamento de biología. Universidad Autónoma de Madrid (en línea). Consultado el 3 de setiembre de 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/242293366_CIANOBIACTERIAS_EN_AGUAS_DE_CONSUMO_Y_DE_RECREO_UN_PROBLEMA_DE_TODOS
- QUIBLIER, C; WOOD, S; ECHENIQUE, I; HUMBERT, J. 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria - Ecology, toxin production and risk management. *Water Research* 47(15)
- RANGEL, L; SILVA, L; ROSA, P; ROLAND F; HUSZAR. 2012. Phytoplankton biomass is mainly controlled by hydrology and phosphorus concentrations in tropical hydroelectric reservoirs. *Hydrobiologia*, 693 13-28
- REYNOLDS, C. 2006. The ecology of phytoplankton. Cambridge, University. 535 p.
- RIVERA, A. 2008. Impacto de las cianotoxinas en la ecología acuática y la calidad de agua de consumo humano: estado actual de investigación en Costa Rica y México. Tesis Lic. San Pedro, CR. UCR. 106 p
- ROMO, S; SORIA, J; DEL CAMPO, F. 2013. Water residence time and the dynamics of toxic cyanobacteria. *Freshwater biology* 58 (3) 513-522
- 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
- SENS, MAURICIO; PIZZOLATTI, BRUNO; MONDARDO, RENATA; ROMERO, LUIS. 2013. La filtración inducida como una alternativa de tratamiento de agua para remover cianobacterias y cianotoxinas. *Interciencia*, 38 (4): 253-259

- SHINDLER, D; CARPENTER, S; CHAPRA, S; HECKY, R; ORIHIEL, D. 2016. Reducing Phosphorus to Curb Lake Eutrophication is a Success. *Environ. Sci. Technol.* 50 8923–8929
- SIVONEN, K; JONES; G. 1999. Cyanobacterial toxins. En *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Editado por Chorus y Bartram. WHO. s.p.
- SONG, H; REICHWALDT, E; GHADOUANI, A. 2014. Contribution of sediments in the removal of microcystin-LR from water. *Toxicon* 83 (1) 84-90
- VARGAS, M; FREER, E. 2004. Proliferaciones algales nocivas de cianobacterias (Oscillatoriaceae) y dinoflagelados (Gymnodiniaceae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista Biología Tropical* 52
- VIDAURRE, A; ALVAREZ, F; MORAÑA, L; SALUSSO, M. 2018. Cianobacterias en un embalse subtropical de la provincia de Salta en Argentina. *Bol. Soc. Argentina Botánica* 53(4): 543-549
- WALL, J; WYATT, K; DOLL, J; RUBENSTEIN, E; ROBER, A. 2018. Hot and toxic: temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. *Science of the total environment* 610 786-795
- WALTER, JULINE; LOPES, FABYANO, LOPES-FERREIRA, MÓNICA; VIDAL, L; LEOMIL, LUCIANA; MELO, FABIANA, AZEVEDO, GIRLENE; OLIVEIRA, ROSSANDRA; MEDEIROS, ALBA; MELO, ADRIANA; DE REZENDE, CARLOS; TANURI, AMILCAR; THOMPSON, FABIANO. 2018. Occurrence of harmful cyanobacteria in drinking water from severely drought impacted semi arid region. *Frontiers in Microbiology* 9: 176
- WAN, L; CHEN, X; DENG, Q; YANG, L; LI, X; ZHANG, J; SONG, CH; ZHOU, Y; CAO, X. 2019. Phosphorus strategy in bloom forming cyanobacteria (*Dolichospermum* and *Microcystis*) and its role in their succession. *Harmful Algae* 84 46-55

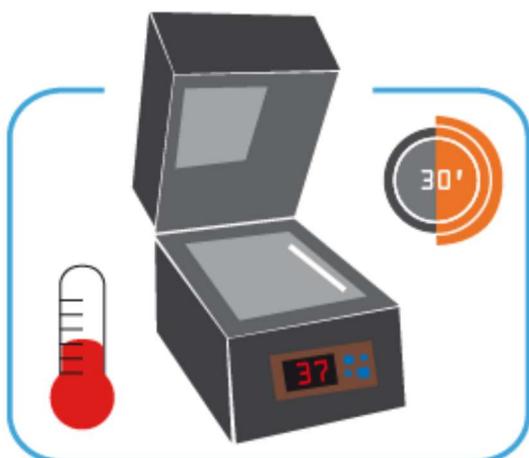
- WHO, 2015. Management of cyanobacteria in drinking-water supplies: information for regulators and water suppliers (en línea). Consultado el 3 de setiembre de 2017. Disponible en <http://apps.who.int/iris/handle/10665/153970>
 - Wurtsbaugh, W; Vincent, W; Vincent, C; Carney, H; Richerson, P; Lazzaro, X; Tapia, R. 1990. Nutrientes y su limitación del crecimiento del fitoplancton (en línea). Consultado el 12 de febrero de 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/32979153_Nutrientes_y_su_limitacion_d_el_crecimiento_del_fitoplancton/citations
 - ZEULAB, 2019. Test for the detection of microcystins in water. Revisión 12. 11 p.
 - ZHANG, F; LEE, J; LIANG, S; SHUM, C. 2015. Cyanobacteria blooms and non-alcoholic liver disease: evidence from a county level ecological study in the United States. *Environmental Health* 14 (41): 1-11
- ZURAWELL, R; CHEN, J; BURKE, E. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 8: 1-37

Anexo 1: Pasos empleados a la hora de utilizar el kit Microcystest®

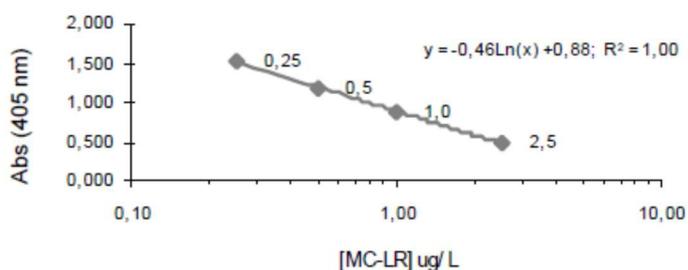
Pasos empleados a la hora de utilizar el kit Microcystest® y la determinación de las microcistinas en agua. Tomado del fabricante del Test (Zeulab, 2019).



- 50 µL de cada patrón de Microcistina_LR (0,25, 0,5, 1 y 2,5 µg) por duplicado
- 50 µL de cada una de las muestras por duplicado en el resto de los pocillos
- 70 µL de disolución de fosfatasa a cada pocillo que contiene la muestra
- 90 µL del sustrato cromogénico y agitar suavemente
- colocar la tira adhesiva y cubrir todos los pocillos.



- Incubar a 37 °C durante 30 minutos
- Transcurrido este tiempo se debe añadir 70 µL de disolución "stop" y agitar suavemente y leer la absorbancia a 405 nm.



- Representar los datos de absorbancia de cada patrón a 405 nm, frente a la concentración de Microcistina L-R en escala logarítmica, y obtener la curva de calibrado.

Apéndice 1: Prueba de Anderson Darling realizadas las diferentes variables

