



**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

## **Proyecto de tesis**

# **Cianotoxinas en abrevaderos: peligrosidad y efectos negativos para el ganado**

**Estudiante: Elizabeth Font Iribarne**

**Orientadora: Dra. Sylvia Bonilla, Facultad de Ciencias**

**Co-orientadora: Dra. Beatriz Brena, Facultad de Química**

**Fecha: junio 2014**

# **Cianotoxinas en abrevaderos: peligrosidad y efectos negativos para el ganado**

## **Resumen**

La calidad del agua es afectada por el proceso de eutrofización que resulta del aumento de nutrientes en los cursos de agua. Una de las consecuencias principales es el crecimiento de cianobacterias planctónicas que producen cianotoxinas de alto riesgo para la salud humana y animal. La ganadería es uno de los principales rubros económicos del país, existen registros de abrevaderos con presencia de cianotoxinas que podrían afectar al ganado. Este trabajo tiene por objetivo vincular la presencia de cianotoxinas en embalses del Río Negro con ganado afectado por consumo de agua con cianobacterias y generar un protocolo de acción preventiva para alertar a productores. Se realizarán muestreos en embalses del Río Negro para observación al microscopio y determinación de clorofila *a*. Si la concentración de ésta alcanza el nivel de alerta II de la OMS, se realizará recuento de células, análisis de microcistinas y bioensayos. Aparte, se obtendrán muestras de suero en caso de animales afectados para análisis de microcistinas, y en caso de muerte del animal se obtendrán cortes de tejidos con el mismo fin. Se espera poder establecer una relación causal entre la presencia de cianobacterias en abrevaderos y la afectación de ganado que consume de éstos; y alertar a productores a través del protocolo mencionado. Este es el primer estudio que se hará en el país sobre esta temática, por tanto los resultados podrán ser insumos clave para estimar pérdidas económicas en el principal rubro de exportación del país y establecer planes de mitigación a nivel nacional.

## **Introducción**

### **1.- Cianobacterias y cianotoxinas**

Las cianobacterias son microorganismos procariotas unicelulares y/o multicelulares que poseen clorofila *a* y realizan fotosíntesis oxigénica (Whitton, 2012). Son organismos muy antiguos (origen: Precámbrico, 3500 millones de años), encontrándose tanto en ecosistemas acuáticos como en el suelo (Whitton et al, 1992), desde fuentes termales (Castenholz et al, 1973) hasta los hielos polares (Skulberg et al, 1996), distribuyéndose de manera general en las aguas continentales y marinas de todo el mundo (Gallon et al, 1996). Uno de los hábitats que han colonizado con mayor éxito es el fitoplancton de los ecosistemas de aguas continentales. Se denomina fitoplancton al grupo de microorganismos fotosintéticos (cianobacterias y algas eucariotas) adaptados a vivir en mares, lagos, estanques o ríos donde se mueven a la deriva de los movimientos del agua. El fitoplancton cumple un papel fundamental ya que suministran la mayor parte del carbono orgánico disponible para las redes tróficas de la zona pelágica de los ecosistemas acuáticos (Reynolds 2006).

Las floraciones algales, también conocidas como “blooms”, son eventos de multiplicación y acumulación de organismos fitoplanctónicos que presentan un incremento significativo de biomasa de una o pocas especies en cortos periodos de tiempo (Smayda et al, 1997). Si bien estos eventos ocurren naturalmente debido a factores como el incremento de la temperatura e intensidad luminosa o la baja turbulencia del agua, se ha registrado un incremento mundial en su frecuencia y duración asociado a las condiciones de eutrofización de los cuerpos de agua (Hallegraeff et al, 1992; Paerl et al, 1996). El proceso de eutrofización refiere al incremento de producción biológica en ríos, lagos y reservorios, causado por un aumento en la concentración de nutrientes, generalmente asociado a compuestos de fósforo y nitrógeno (Lampert & Sommers 2007). Según algunos autores, este proceso puede ser de origen natural o antrópico, aunque ejemplos del primero son escasos. Otros autores respaldan la eutrofización como un fenómeno antrópico que contamina el agua con aportes de nutrientes de diverso origen. Por ende, los blooms son más frecuentes en regiones donde la agricultura y la urbanización han sufrido un rápido crecimiento (Lampert & Sommers 2007, Azevedo et al, 2002).

Las floraciones más frecuentes de los cuerpos de agua continentales eutróficos corresponden a cianobacterias (Whitton, 2012). Estas pueden detectarse por la coloración generalmente verde y la turbidez que le confieren al agua, o por la presencia de acumulaciones o franjas densas superficiales. Estas últimas se denominan "scums" y pueden ser observadas a varios metros de distancia (Chorus & Bartram, 1999, Pirez et al, 2013). Generalmente, la proliferación de cianobacterias trae asociados efectos negativos, causando pérdidas económicas severas para la pesquería, operaciones turísticas y otras actividades relacionadas al agua, provocando mayores impactos en el ambiente y en la salud humana y animal (Hallegraeff et al, 1992). Una de las mayores consecuencias es la producción de sustancias tóxicas, conocidas como cianotoxinas, que pueden causar problemas de salud crónicos o agudos al ser ingeridas (Paerl, 1988). Otros aspectos que deterioran el agua son: la producción de sustancias como la geosmina que confiere fuerte olor desagradable al agua; la acumulación de biomasa que colorea el agua, interfiere con filtros en turbinas y puede provocar un descenso brusco de oxígeno disuelto durante la noche por la respiración. Este último aspecto a menudo ocasiona la muerte masiva de peces por asfixia (Paerl, 1988). Estos efectos traen problemas estéticos, perjudican el uso recreacional y afectan el gusto del agua potable tratada.

Las cianotoxinas comprenden una diversa naturaleza química: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos, aunque normalmente se clasifican por los efectos que producen: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas irritantes (Chorus & Bartram, 1999). El tipo de cianotoxina producida depende del género y la especie de cianobacteria presente en la floración (Tabla 1.) Los niveles de toxicidad varían para la misma especie, en el mismo cuerpo de agua y durante la misma floración. A pesar del creciente aumento en estudios sobre este fenómeno, se desconoce cuál es el factor que desencadena la síntesis de toxinas durante una floración. Se atribuye importancia a la temperatura, la luz, la estabilidad de la columna de agua y el pH, sin descartar otros factores ambientales y biológicos (Utkilen et al, 1992). También existen diferencias entre

cepas de una misma especie que pueden producir más o menos toxina en el ambiente (Piccini et al 2011).

Las floraciones de cianobacterias hepatotóxicas, especialmente conteniendo microcistinas, son las más reportadas en todas partes del mundo. Esto podría deberse a la disponibilidad de tecnología adecuada para su detección, en primera instancia fue el HPLC y más recientemente los inmunoensayos tipo ELISA (Chorus & Bartram, 1999).

**Tabla 1. Toxicidad potencial de los géneros planctónicos de cianobacterias, extraída de Quesada et al, 2004.**

Género	Microcistinas y/o Nodularinas	Otras cianotoxinas	Referencias
<i>Anabaena</i>	Si	Saxitoxinas Anatoxinas	Kaebnick & Neilan, 2001
<i>Cylindrospermopsis</i>	–	Cylindrospermopsina Saxitoxinas	Saker & Neilan, 2001 Lagos et al, 1999
<i>Microcystis</i>	Si	Anatoxinas	Vezie et al, 2002
<i>Nodularia</i>	Si	–	Stolte et al, 2002
<i>Nostoc</i>	Si	–	Beattie et al, 1998
<i>Oscillatoria</i>	Si	Anatoxinas	James et al, 1997
<i>Planktothrix</i>	Si	Homoanatoxina-a Anatoxinas	Blom et al, 2001
<i>Pseudoanabaena</i>	Si	–	Oudra et al, 2001
<i>Raphidiopsis</i>	–	Cylindrospermopsina	Li et al, 2001 Nascimento et al, 1999

## 2.- Cianotoxinas y toxicidad en animales

Las cianotoxinas son producidas y contenidas en células de cianobacterias con crecimiento activo. La liberación de éstas al medio circundante dando lugar a toxinas disueltas ocurre generalmente durante la ruptura, muerte o senescencia celular (Chorus & Bartram, 1999). Según las vías de exposición, las cianotoxinas pueden causar enfermedades transmitidas por contaminación del agua de consumo, siendo la vía de entrada al organismo la ingesta

al beber. También pueden causar enfermedades por contacto con el agua durante el uso recreacional, las vías de exposición corresponden a piel y mucosas (Chorus & Bartram, 1999). Existen otros tipos de exposición poco frecuentes como la vía intravenosa en clínicas de hemodiálisis que han culminado en fatalidades humanas (Azevedo et al, 2002), la inhalación de aerosoles de agua o la ingesta a través de suplementos dietarios conteniendo cianobacterias, donde los niveles de cianotoxinas no son controlados (Dietrich et al, 2008).

Para aves o mamíferos, y específicamente ganado, el consumo de agua contaminada con cianotoxinas es la vía de exposición principal (Stewart et al, 2008; Lürling et al, 2013). La disponibilidad de agua para ingesta del ganado en cantidad y calidad es fundamental ya que puede afectar negativamente el estado sanitario y nivel productivo del animal. 3 categorías describen los factores que afectan el requerimiento de agua del ganado: a) relativos al ambiente, b) relativos a la dieta, c) relativos al animal. Generalizando podemos decir que una vaca lechera consume entre 38 y 110 litros de agua por día (L/d), un bovino para carne aproximadamente 26-70 L/d, y una oveja 4-15 L/d. La gran cantidad de agua que necesita consumir el ganado determina una vulnerabilidad aumentada al efecto de cianotoxinas en caso de que existan floraciones en aguas de abrevadero (Duarte, 2011).

El tipo de cianotoxina determina los efectos tóxicos observados en animales. Si bien las más extendidas son hepatotóxicas (microcistinas, nodularinas), algunas cianotoxinas son poderosos neurotóxicos, como anatoxina-a, anatoxina-a(s) y saxitoxinas. El primero es un potente agonista nicotínico colinérgico post-sináptico, el segundo es un organofosforado inhibidor de la acetilcolinesterasa y el último un bloqueador de los canales de sodio de las neuronas (Codd et al, 1999). Solo se conocen efectos agudos de neurotoxinas en mamíferos produciendo la muerte por falla respiratoria sin presentar órganos dañados en evaluaciones post mortem (Chorus & Bartram, 1999, Stewart et al, 2008). Los LPS (lipopolisacáridos) pueden causar respuestas tóxicas o alérgicas por contacto con piel y mucosas, también se cree pueden ser responsables de gastroenteritis y problemas

respiratorios (Stewart et al, 2006). Poco se conoce acerca de los efectos agudos o crónicos de éstos. Otras cianotoxinas como las cylindrospermosinas son citotoxinas que producen inhibición irreversible de síntesis proteica, necrosis celular, y desarrollo de tumores o mutagenesis (Wiegand et al, 2005).

Han sido caracterizadas hasta 89 variantes estructurales de microcistina (Welker et al, 2006) y solo unas pocas de nodularina, ambas toxinas inhiben la fosfatasa proteica tipo 1 y 2A (Chorus & Bartram, 1999), pueden inducir disociación, degeneración o necrosis hepatocelular dependiendo de la dosis ingerida (Kral et al, 2012). Se han atribuido mortandades importantes de animales debido a microcistinas presentes en el agua de consumo como el caso de los flamencos del Parque Nacional de Doñana, Brasil (Alonso-Andicoberry et al, 2002), así como animales domésticos (Lürling et al, 2013) y distintos tipos de ganado por efecto directo de ésta cianotoxina y otras neurotóxicas (Odriozola et al, 1984; Negri et al, 1995).

La toxicidad aguda de microcistinas y nodularinas presenta una  $DL_{50}$  i.p. en ratón de aproximadamente 50-70  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal (Sivonen et al, 1996). La  $DL_{50}$  oral en ratones es de 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso, aproximadamente un factor 100 más elevada que la  $DL_{50}$  i.p., implicando una menor toxicidad por vía oral. Existe menos información disponible respecto a la toxicidad crónica, la cual fue estudiada por Fawell et al (1994) en ratones mediante administración oral de diferentes concentraciones de microcistina (MC-LR) por día durante 13 semanas estableciéndose el nivel sin efectos observables en 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso por día. A partir de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso por día se observa un hígado ligeramente patológico (Fawell et al, 1994). Luego de exposición aguda a altas dosis en animales ocurre la muerte por hemorragia o insuficiencia hepática; también pueden promover el crecimiento de tumores de hígado y otros órganos luego de exposición crónica a bajas dosis (Chorus & Bartram, 1999, Dietrich et al, 2005). En otros órganos también pueden observarse cambios patológicos: coagulación intravascular diseminada en pulmones (Falconer et al, 1981), mesenterio alterado con equimosis (DeVries et al, 1993), corazón con pequeñas

hemorragias en superficie (Handeland et al, 2010). Dentro de los síntomas que presentan los animales afectados por estas toxinas cabe destacar letargo, hiperventilación, ictericia, contracciones musculares involuntarias y pequeñas, fiebre, apatía, fotosensibilización, entre otras (DeVries et al, 1993; Handeland et al, 2010). En este trabajo se propone identificar animales potencialmente afectados según la presencia de síntomas de efectos agudos (astenia, dificultad para respirar y/o contracciones involuntarias, alteraciones en vista y mucosas); y crónicos (pérdida de peso), según se detallan en Chorus & Bartram 1999.

### **3. Indicadores de floraciones y legislación**

En general, para el manejo del riesgo, una floración se define en términos de concentraciones de células con potencial de causar daño a humanos, y se utilizan diversos indicadores tales como la clorofila *a* (Clo *a*), indicador indirecto de la biomasa del fitoplancton o el número total de células de cianobacterias. Existen guías internacionales para 2 tipos de uso de agua, agua potable y agua recreacional.

En agua potable, la Organización Mundial de la Salud propuso en 1998, un valor provisional de referencia para microcistina-LR (OMS, 1998) de 1 µg/L, nivel máximo aceptable para el consumo oral diario de microcistina-LR (libre y unida a célula) en aguas de abastecimiento público. Uruguay establece en el decreto 375/11 un valor máximo permitido de hasta 1 µg/L de microcistina-LR. A valores de 100.000 cél/mL o 50 µg/L Clo *a*, nivel de alerta II de la OMS, se deben tomar medidas en fuentes de agua para potabilizar.

En aguas de recreación, la OMS recomienda realizar además un control visual de aparición de scums. El valor guía propuesto por la OMS para el nivel de riesgo leve o bajo en aguas de recreación es de 10 µg/L de Clo *a*, lo que corresponde aproximadamente a 20.000 cél/mL (Whitton, 2012; Gianuzzi, 2009; Chorus & Bartram, 1999). A esta densidad de cianobacterias se espera de 2 a 4 µg/L de microcistinas, o incluso hasta 10 µg/L si se trata de floraciones altamente tóxicas (Chorus & Bartram, 1999). La correlación entre



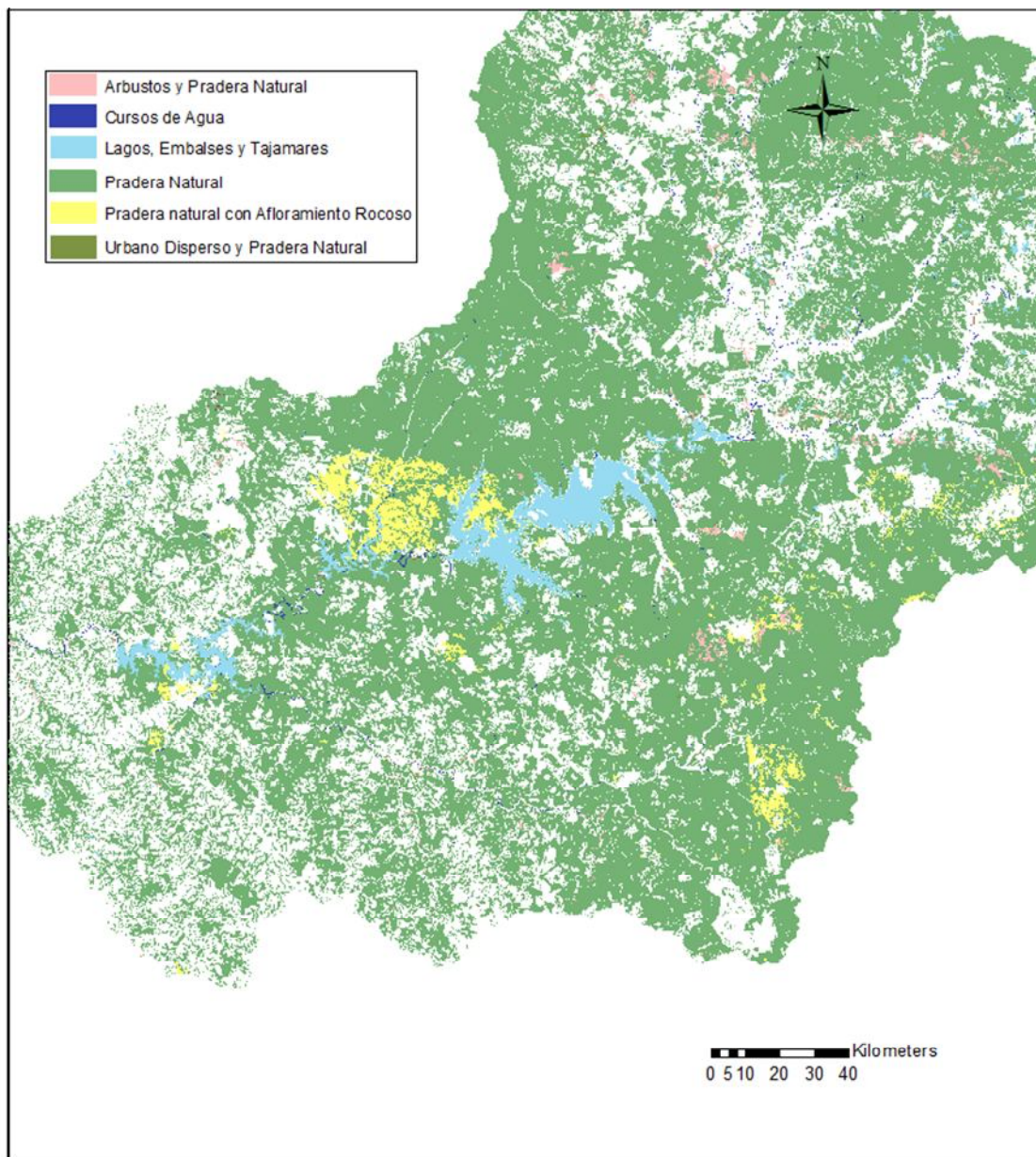
células/mL o Clo *a*, y microcistinas tiende a ser mejor a niveles bajos de clorofila y microcistina, y a perderse en muestras con concentraciones altas de estos componentes (Pirez et al, 2013). Uruguay espera actualmente la aprobación para la modificación de la legislación que pretende introducir directrices en caso de presencia de cianobacterias en agua de recreación. Frecuentemente se ven sobrepasados los valores guía establecidos por la OMS para riesgo moderado (correspondiente a 20 µg de microcistina/L) en distintos cursos de agua de nuestro país (De León et al, 2000). En casos de presencia de scums, el riesgo de efectos adversos es muy alto, pudiendo detectarse valores de 20.000 µg/L de microcistina o aún mayores en estas acumulaciones (Chorus & Bartram, 1999, Pirez et al, 2013). A valores de 100.000 cél/mL o 50 µg/L Clo *a*, nivel guía de riesgo moderado por exposición recreativa, se deben restringir las actividades en estas aguas.

No existe legislación a nivel internacional sobre la concentración permitida de microcistina en aguas de abrevaderos para ganado. Australia es el único país que hace mención a la calidad del agua dulce para consumo animal. Las guías para la calidad del agua de ANZECC (Australian and New Zealand Environment and Conservation Council) proveen un valor de 11.500 cél/mL de *M. aeruginosa* (o 2,3 µg/L microcistina-LR), a partir del cual, es esperable un riesgo aumentado en la salud del ganado. Sin embargo, genera conflicto con información adicional de otra parte de la guía que establece un rango de concentración de células de 11.500 a 81.500 cél/mL para distintas especies de ganado (Chorus, 2012). De acuerdo a estos antecedentes, similares al nivel de alerta II de la OMS, en este trabajo se utilizará este nivel como indicador de la situación para proseguir con la batería de análisis.

#### **4. Situación en Uruguay, ganado afectado**

La producción ganadera tiene una larga tradición en la historia económica y sociocultural del país, siendo uno de los principales rubros de exportación. Según datos del 2013 del Ministerio de ganadería, agricultura y pesca (MGAP, 2013) la Superficie Agropecuaria Ganadera se establece en 12,8 millones de hectáreas, existiendo 11.411.000 cabezas de bovinos y 8.225.000 cabezas de ovinos.

En nuestro país, las aguas superficiales tanto naturales (arroyos o ríos) como artificiales (tajamares), son las fuentes principales de agua de abrevadero; en menor medida, playas de lagos o embalses como ocurre en el Río Negro. Este es el principal sistema acuático del interior del Uruguay y su cuenca ocupa un 37,5 % del territorio nacional (64.000 km<sup>2</sup>). Los cambios de uso del suelo en esta cuenca están asociados a la presencia de praderas adecuadas para ganadería extensiva (Figura 1). Cuenta con 3 embalses formados artificialmente para generación de energía eléctrica, estos son: Bonete (1070 km<sup>2</sup>) en 1945, Baygorria (100 km<sup>2</sup>) en 1960 y Palmar (320 km<sup>2</sup>) en 1982. Según antecedentes, se ha clasificado el embalse de Bonete como mesotrófico (84 µg PT/L promedios anuales 2009-2011), y a Baygorria (97 µg PT/L) y Palmar (116 µg PT/L) como eutróficos (Chalar et al, en prensa). Los embalses acumulan nutrientes propiciando el desarrollo de floraciones que se aglomeran en las playas ("scums") siendo muy perjudiciales para los animales debido a la alta carga de cianotoxinas que presentan. En los embalses del Río Negro se han llegado a detectar concentraciones muy altas de microcistina-LR, el mayor registro fue de 2662 µg/L en Palmar, 551 µg/L en Baygorria y 2109 µg/L en Bonete (González-Piana et al, 2011).



**Figura 1. Mapa de usos del suelo relativos a praderas. Fuente MGAP 2012, editado por Signe Haakonsson.**

Existen muy pocos antecedentes de casos asociados a intoxicación de ganado por beber agua contaminada con cianobacterias en nuestro país. En 2009 se informó a la Sección Limnología de la Facultad de Ciencias de un caso en Canelones de muerte rápida (10 a 24 horas) de más de 30 vaquillonas que fue adjudicado a cianobacterias productoras de microcistinas presentes en el abrevadero. Los animales presentaron necrosis focal difusa en hígado, sumado a síntomas como fotosensibilización de párpados. Se desconoce si

estos casos son frecuentes dado que las muertes se adjudican a otras causas y los análisis de agua no son realizados a tiempo (Alonzo et al, 2009; Fabre et al en revisión). En febrero del 2013, se recibió en la Sección Limnología una muestra de la zona litoral del embalse de Baygorria con acumulaciones de *Microcystis* spp., proveniente de un establecimiento ganadero manifestando pérdida de peso en ganado que abrevaba en esa zona (productor Gonzalo Echegoyen). El análisis de toxinas de la muestra mediante HPLC permitió detectar los mayores valores jamás registrados para el país (35000 µg/L de Microcistina-LR) (datos no publicados, Sección Limnología), superando los de González-Piana et al 2011, lo que probablemente impactó negativamente en el peso y comportamiento de 400 cabezas de ganado que bebían agua en el sitio (Echegoyen com pers.).

A la fecha han aumentado las consultas de productores rurales y profesionales veterinarios a científicos (Sección Limnología), por la afectación de ganado que bebía agua contaminada con cianobacterias. Debido a la falta de conocimiento sobre la peligrosidad de cianobacterias en aguas de abrevadero, es conveniente establecer programas de difusión para crear conciencia sobre las cianobacterias y su potencial tóxico. Así mismo, es necesario crear un plan de acción preventiva para evitar o disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por estas toxinas. Este es el primer estudio que se hará en el país sobre esta temática, por tanto los resultados podrán ser insumos clave para estimar pérdidas económicas en el principal rubro de exportación del país y establecer planes de mitigación a nivel nacional.

En consecuencia de lo mencionado previamente se plantean los siguientes objetivos:

#### Objetivo general

- Evaluar la presencia de cianobacterias y microcistinas en aguas de abrevadero de predios rurales en zonas de embalses del Río Negro, determinar peligrosidad potencial y afectación del ganado, y desarrollar un protocolo de acciones preventivas.

### Objetivos específicos

1. Determinar la biomasa de cianobacterias y la presencia de microcistinas totales en zonas litorales de abrevaderos de interés y su potencial tóxico.
2. Relevar casos de ganado afectado potencialmente por microcistinas en la zona de estudio.
3. Establecer si los casos de afectación de ganado relevados se corresponden con la presencia de valores elevados de microcistinas en abrevaderos, estudiando tejidos de animales para establecer causalidad y determinar peligrosidad.
4. Desarrollar un protocolo de acciones preventivas dirigido a productores rurales para mitigar los efectos nocivos en el ganado por la presencia de cianotoxinas en los abrevaderos.

### Hipótesis

- El ganado es afectado negativamente por el consumo de microcistinas presentes en abrevaderos de nuestro país.

### Preguntas

1. ¿Qué concentraciones de cianobacterias y microcistinas se registran en aguas de abrevaderos de embalses del Río Negro?
2. ¿Los efectos observados en el ganado se correlacionan positivamente con la concentración de cianobacterias o microcistinas presente en el agua ingerida?
3. ¿La concentración de microcistinas y el tipo de ganado son factores que condicionan los efectos observados en animales?
4. ¿Qué concentraciones de microcistinas se puede detectar en tejidos o líquidos biológicos de un animal afectado?
5. ¿Cuál es el estado de conocimiento de los productores sobre la temática?

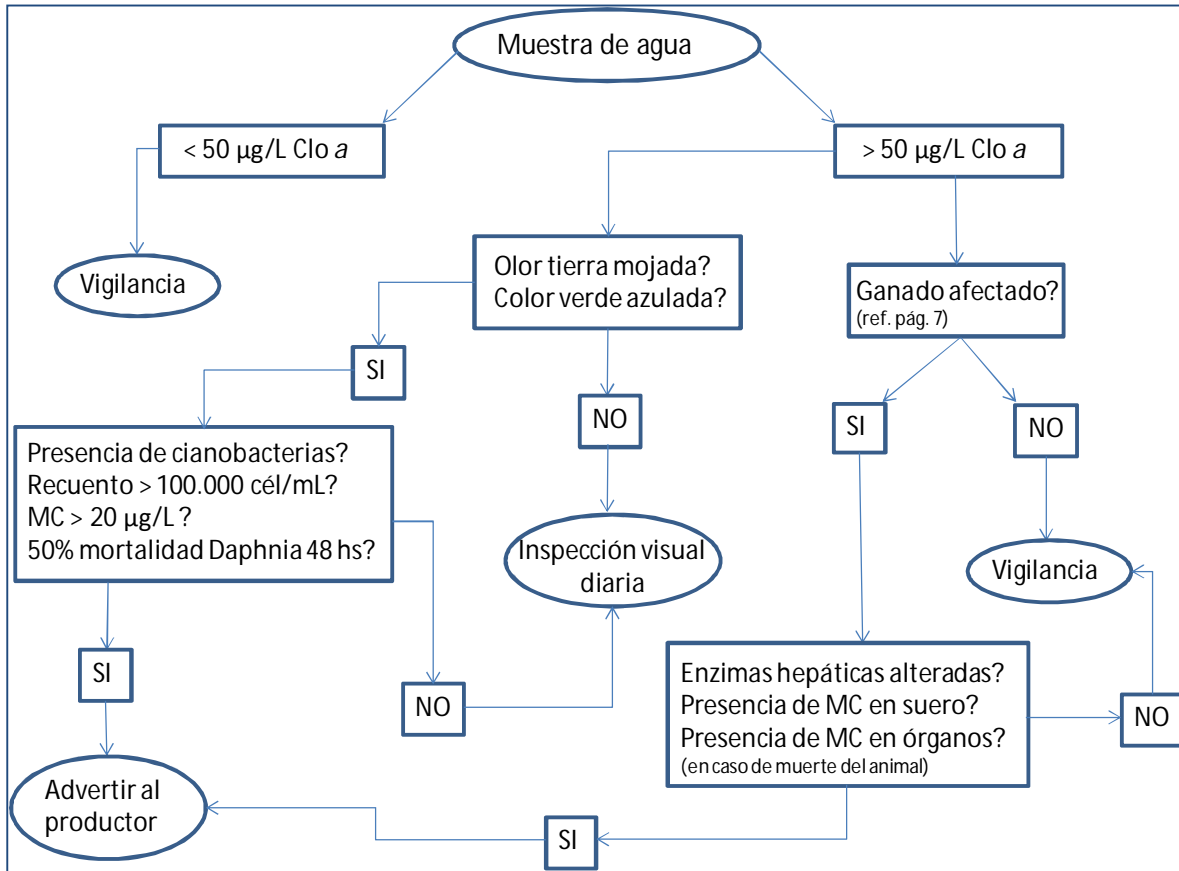


Figura 2. Árbol de decisión de la aproximación metodológica de la tesis indicando los pasos a seguir en cada nivel de acción.

## Materiales y Métodos

Se realizará un muestreo piloto para reconocer el área de estudio y decidir la localización de los sitios de muestreo, así como el tamaño de muestra y las réplicas necesarias, para diseñar el muestreo definitivo. Esto último se aplica tanto para muestras de agua como tejidos biológicos (Objetivos 1 y 3). Se utilizará el test estadístico ANOVA de una vía para probar diferencias significativas entre controles (muestras de predios con abrevaderos sin floraciones) y problemas (muestras de predios con abrevaderos con floraciones), tanto para el agua como para las muestras de animales. La hipótesis nula establece que no existen diferencias significativas entre las poblaciones control y problema mencionadas previamente. Las variables de respuesta serán: concentración de MC en las distintas matrices estudiadas y concentración de enzimas hepáticas en suero. Previo al análisis, se

probará el cumplimiento de los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene). En caso contrario, se transformarán los datos evaluando la transformación más adecuada. Si no se logra cumplir con los supuestos necesarios se utilizará estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis) (Zar, 2010).

Se detalla la metodología a seguir según el objetivo específico.

*Objetivo 1: Determinar la biomasa de cianobacterias y la presencia de microcistinas totales en zonas litorales de abrevaderos de interés y su potencial tóxico.*

Se seleccionarán sitios de muestreo en embalses del Río Negro y se harán muestreos adicionales en zonas de ésta cuenca donde se reporten floraciones. Se utilizarán como controles muestras de agua de zonas de la cuenca sin floraciones. De cada muestreo se harán determinaciones de Clo *a* y observaciones al microscopio para determinar la presencia de cianobacterias potencialmente productoras de cianotoxinas. Eventualmente se podrá hacer recuento de células, análisis de toxinas y bioensayos. Además se medirá *in situ* temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad del cuerpo de agua con sensores de campo (HORIBA). Las muestras se tomarán por triplicado de cada sitio de muestreo y se conservarán hasta su llegada al laboratorio refrigeradas (4 °C) y en oscuridad. Una vez allí, se filtran las muestras para Clo *a* en filtros de fibra de vidrio tipo GF/C, y las muestras destinadas al análisis de cianotoxinas (100 mL) se almacenan a -20 °C en oscuridad hasta su análisis.

La concentración de Clo *a*, se utilizará como un indicador indirecto de la biomasa total fitoplanctónica y se seguirán los niveles de alerta de la OMS, en particular el nivel II que refieren a la peligrosidad de la presencia de cianobacterias. Para esta determinación se utilizará el método de etanol caliente de ISO 1992 modificado (Bonilla 2009). La extracción se basa en la transferencia del pigmento (Clo *a*) a un solvente orgánico caliente sin provocar cambios químicos en la molécula. La concentración de Clo *a* se cuantificará por absorbancia en un espectrofotómetro THERMO Evolution 60, en la Sección Limnología.

La potencialidad tóxica de la floración se analizará en base a conocimientos científicos de la especie dominante y a bioensayos con cladóceros. La potencialidad tóxica es especie-específica, por ende se harán observaciones en microscopio óptico para confirmar la presencia de cianobacterias y se realizará la identificación a nivel de género según Bonilla 2009. Si la muestra presenta valores de Clo *a* mayores a 50 µg/L se realizará conteo de células de cianobacterias en cámaras de conteo de 1 mL y microscopio óptico. Las colonias se disgregarán por calentamiento según protocolo de trabajo de la Sección Limnología.

Se realizarán bioensayos agudos (48 hs) (González et al, 2011, CSN ISO 6341, 1997) con neonatos de *Daphnia magna* en placas de 6 pocillos con capacidad de 10 mL. Se realizarán 5 réplicas por placa control y tratamiento, con 3 *Daphnia magna* en 8 mL de muestra por pocillo. Como control se utiliza agua declorada autoclavada, y como tratamiento, las muestras de agua conteniendo colonias de *Microcystis*, las cuales se pasarán 3 veces por jeringa para disminuir el tamaño de las colonias (Vico com pers). Se registrará en lupa binocular cada 24 hs el estado general de los cladóceros, vitalidad, mortalidad o si únicamente presentan movimientos del músculo cardíaco. Al finalizar el ensayo se observará al microscopio si los cladóceros presentan colonias de *Microcystis* en el tracto digestivo. Para la determinación de microcistinas se utilizarán kits nacionales de inmunoensayos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) desarrollados y validados localmente, no requieren procesos complejos de preparación de muestra y presentan alta sensibilidad. Para la realización de estos ensayos se trabajará en el Instituto de Higiene.

*Objetivo 2: Relevar casos de ganado afectado potencialmente por microcistinas en la zona de estudio.*

Se recopilará información histórica sobre registros de posibles casos de ganado afectado por microcistina en la cuenca del Río Negro en diferentes instituciones nacionales como INIA, MGAP, Regional Norte, Facultad de Ciencias, Veterinaria y Agronomía. Por otra parte, se llevará a cabo una encuesta a productores rurales con preguntas sencillas, de respuesta objetiva, con casillas para tildar SI o NO, de múltiple opción y con rangos de



frecuencia para floraciones y ganado afectado. Tanto la información existente en instituciones como la encuesta realizada a productores buscara recolectar información sobre la localización del campo, fuente de agua de los animales, presencia y frecuencia de floraciones en años anteriores, número de ganado afectado, sintomatología, entre otras variables.

*Objetivo 3: Establecer si los casos de afectación de ganado relevados se corresponden con la presencia de valores elevados de microcistinas en abrevaderos, estudiando tejidos de animales para establecer causalidad y determinar peligrosidad.*

Se realizarán muestreos puntuales en la cuenca del Río Negro según se reporten apariciones de posibles casos de ganado afectado por hepatotoxinas. Se realizarán los estudios mencionados en el objetivo 1 para el agua de abrevadero de zonas problema y control, y se obtendrán muestras biológicas de animales para la determinación de microcistinas y análisis de enzimas hepáticas. En caso de muerte de ganado, se tomarán muestras por duplicado de hígado y riñón conservándolas en frío para luego congelarlas a -80 °C para ser liofilizadas y enviadas a analizar al Department of Molecular Biosciences, School of Veterinary Medicine University of California, a cargo de la Dra. Birgit Puschner. Se tomarán 18 mL de sangre por animal afectado en tubos con aceleradores de la coagulación y suero separador, éstos se transportarán en frío hasta su centrifugación a 4000 rpm durante 5 min para obtener el suero en el cual se realizará la determinación por ELISA. Si bien no se dispone de una metodología validada, se estudiará el comportamiento del ensayo en muestras de suero y se participará en la puesta a punto del método en el Instituto de Higiene. Se correlacionarán los datos obtenidos de concentraciones de microcistinas en las distintas matrices para determinar causalidad y peligrosidad. A su vez, se tomará 9 mL de sangre del mismo animal afectado para evaluar las enzimas hepáticas: transaminasa glutámico oxalacética (GOT),  $\gamma$ -Glutamilttransferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (FAS) pues responden rápidamente a alteraciones en hepatocitos (Henry, 2010). Estos análisis se tercerizarán en el servicio del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de

Veterinaria. En todos los casos, las muestras de sangre se obtendrán tanto de animales afectados como de controles, los últimos con abrevaderos sin floraciones.

*Objetivo 4: Desarrollar un protocolo de acciones preventivas para prevenir los efectos nocivos en el ganado por la presencia de cianotoxinas en los abrevaderos.*

Se llevará a cabo una revisión bibliográfica de las medidas y prevenciones aplicadas en casos de floraciones de cianobacterias en abrevaderos o sistemas límnicos en otras partes del mundo. Se diseñará un protocolo de acciones preventivas dirigido a productores para prevenir las pérdidas ocasionadas por la presencia de cianotoxinas en abrevaderos. Para ello se evaluará que sea simple, que la información contenida sea clara, que busque alertar o prevenir. Se distribuirá a través del MGAP, INIA, Facultad de Agronomía y Veterinaria, y en asociaciones rurales como FUCREA.

### **Resultados esperados**

Identificar abrevaderos con presencia de microcistinas en zona de estudio.

Obtener un mapa de distribución de potenciales casos de ganado afectado por microcistina en zona de estudio.

Determinar utilidad de bioensayos como herramienta rápida para establecer peligrosidad potencial en el ganado.

Establecer relación directa y causal entre la muerte o afectación de ganado y la presencia de microcistinas en el agua.

Evidenciar la utilidad de ensayos ELISA para detección de microcistinas en suero de animales.

Corroborar que la concentración de las enzimas hepáticas aumenta al incrementar la concentración de microcistinas en suero.

Producir y difundir un protocolo de acciones preventivas para uso de productores en caso de presencia de floraciones.

## Cronograma

	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D1	X											
B	X	X										
M		X										
O1			X	X	X	X	X	X	X			
O2			X	X								
O3					X	X	X	X	X			
O4						X	X	X				
O5			X	X								
R								X	X	X	X	
E											X	
D2												X

**Aclaraciones.** Mes 1: Julio 2014, D1: Defensa proyecto de tesis, B: lectura bibliográfica, M: puesta a punto de metodología, O1-O5: objetivos 1-5, R: redacción de tesis, E: entrega tesis tribunal, D2: defensa tesis.

## Factibilidad

El proyecto se ejecutará en la Sección Limnología de la Facultad de Ciencias y en el Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina. Ambos laboratorios cuentan con la infraestructura y equipamientos necesarios para la correcta ejecución del proyecto. Si bien el proyecto no cuenta con financiamiento propio, los gastos de materiales y fungibles de laboratorio para su realización se obtendrán de los proyectos ANII FCE6384 y Convenio DINAMA Cianobacterias.

## Bibliografía

- Azevedo, S.; Carmichael, W.; Jochimsen, E.; Rinehart, K.; Lau, S.; Shaw, G.; Eaglesham, G. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*. 2002. Vol. 181-182, pag. 441-446.
- Alonso-Andicoberry C., García Villada L., Lopez-Rodas V., Costas E. Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *The Veterinary Record*. 2002. Vol. 151 (23) 706-707.
- Alonzo, P., Collazo, S., De León, L., Paullier, C. Diagnóstico de intoxicación por algas verde-azuladas (cianobacterias) en Uruguay. "Resúmenes de las XXXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría", 2009, pág. 142-143.
- Bonilla, Sylvia. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión. UNESCO. 2009, pg. 96.
- Castenholz, R. 1973. Ecology of blue-green algae in hot springs. In: N.G. Carr and B.A. Whitton [Eds] *The Biology of Blue-Green Algae*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 379-414.
- Chorus, I. and Bartram, J. (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*. Für WHO durch E & FN Spon /Chapman & Hall, London, 416 pp.  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resourcesquality/toxicyanbact/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxicyanbact/en/index.html)
- Chorus, I. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environment Agency, Germany. 2012, pg. 147.
- Chalar, G., Gerhard, M., Gonzalez-Piana M., Fabian, D. (en prensa). Hidroquímica y eutrofización en tres embalses subtropicales en cadena. **In:** *Procesos geoquímicas de la superficie en América Latina*. Jorge E. Marcovecchio, Sandra E. Botté y Rubén Hugo Freije (Eds). Editorial de la Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca.

- Codd, G., Bell, S., Kaya, K., Ward, C., Beattie, K., Metcalf, J. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*. 1999, Vol. 34. Issue 4, pg. 405-415.
- CSN ISO 6341, 1997. Water Quality – Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia Magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute Toxicity Test.
- De León, L., Yunes, J. First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 2000, pg. 110-112.
- DeVries, S., Galey, F., Namikoshi, M., Woo, J. Clinical and pathological findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1993, Vol. 5, Issue 3, pg. 403–408.
- Dietrich, D., Fischer, A., Michel, C., Hoeger, S.J. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2008, Vol. 619, pg. 885-912.
- Dietrich, D. Hoeger, S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and applied pharmacology*. 2005, Vol. 203, Issue 3, pg. 273-289.
- Duarte, E. Uso del agua en establecimientos agropecuarios. Sistema de abrevadero. *Revista Plan Agropecuario*. 2011, N° 139, pág. 52-55.
- Fabre A., Fabiano G., Silveira S., Carnevia D., Perretta A., Aubriot L., Martigani F., Pérez M., Brena B. y Bonilla S. Floraciones de cianobacterias y mortandad de lisas en la laguna de castillos, Rocha. (En revisión).
- Falconer, I.R., Jackson, A.R., Langley, J., Runnegar, M.T. Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust. J. Biol. Sci.* 1981, Vol. 34, pg. 179–187.
- Fawell, J., James, C., James, H. Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of Microcystin-LR and a method for its determination in water. *Foundation for Water Research, Marlow, UK*, 1994, pg. 1-46.
- Gallon, J.R., Jones, D.A. and Page, T.S. *Trichodesmium*, the paradoxical diazotroph. *Arch. Hydrobiol. Suppl., Algological Studies*. 1996, Vol. 83, pg. 215-243.

- Giannuzzi, L. Cianobacterias y cianotoxinas: identificación, toxicología, monitoreo y evaluación de riesgo. 2009, pág. 238.
- González, S., Espínola, J., Bonilla, S. Protocolo para la detección de neurotoxinas de cianobacterias mediante bioensayos agudos con *Daphnia pulex*. Publicación técnica de la DINAMA. 2011
- González-Piana M, Fabian, D., Delbene, L., Chalar, G. Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Río Negro reservoirs, Uruguay. Harmful algae news. 2011, Vol. 43, pg. 16-17.
- Hallegraef, G.M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Marine Pollution Bulletin. 1992, Vol. 25, pg. 186-190.
- Handeland K., Østensvik, Ø. Microcystin poisoning in roe deer (*Capreolus capreolus*). Toxicon. 2010, Vol. 56, Issue 6, pg. 1076–1078.
- Henry, J. El laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Marbán. 2010, pg. 1490.
- ISO (1992). Water quality measurement of biochemical parameters spectrophotometric determination of chlorophyll-a concentration. Ginebra, International Organization for Standardization: 1-6.
- Kral, J., Pikula, J., Bandouchova, H., Damkova, V., Hilscherova, K., Misik, J., Novotny, L., Ondracek, K., Osickova, J., Mlcakova, V., Pohanka, M., Skochova, H., Vitula, F., Tremel, F. Avian high-dose toxicity of cyanobacterial biomass. Neuroendocrinology Letters. 2012, Vol. 33, pg.161-165.
- Lampert & Sommers. Limnoecology. Second edition. The ecology of lakes and streams. Oxford University Press Inc. 2007, pg. 324.
- Lürling, M.; Faassen, E. J. Dog Poisonings Associated with a *Microcystis aeruginosa* Bloom in the Netherlands. Toxins 2013. Vol. 5, Issue 3, pag. 556-567.
- MGAP.  
<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,86,O,S,0,MNU;E;2;16;10;8;MNU>
- Negri, A., Jones, G., Hindmarsh, M. Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. Toxicon. 1995, Vol. 33, Issue 10, pg. 1321-1329.

- Odriozola, E., Ballabene, N., Salamano, A. Poisoning of cattle by blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*). Rev. Argent. Microbiol. 1984, Vol. 16, Issue 4, pg. 219-224.
- Paerl, H. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. American Society of Limnology and Oceanography. 1988. Vol. 3, pag. 823-847.
- Paerl, H. Microscale physiological and ecological studies of aquatic cyanobacteria: macroscale implications. Microscopy Research and Technique. 1996, Vol. 33, Issue 1, pg. 47-72.
- Pirez, M., Gonzalez-Sapienza, G., Sienna, D., Ferrari, G., Last, M., Last, J. A., Brena, B. M., Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: Simple and affordable methods may be the answer. Journal of Environmental Management. 2013, Vol. 114, pg. 63-71.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amarala, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C.C., Vidal, L., Kruk, C., Bonilla, S. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. Harmful Algae. 2011, Vol. 10, Issue 6, pg. 644–653.
- Quesada, A., Sanchis, D., Carrasco, D. (2004). Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? Limnetica 23 (1-2): 109-118.
- Reynolds, C. The Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press 2006, pg. 535.
- Skulberg, O.M. 1996. Terrestrial and limnic algae and cyanobacteria In: A. Elvebakk and P. Prestrud [Eds] A Catalogue of Svalbard Plants, Fungi, Algae and Cyanobacteria. Part 9, Norsk Polarinstitutt Skrifter 198, 383-395.
- Smayda, T. Bloom dynamics: Physiology , behavior , trophic effects. American Society of Limnology and Oceanography, Inc. 1997 Vol. 42 (5, part 2), pg. 1132-1136.
- Stewart, I.; Seawright, A.; Shaw, G. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds - an overview. Advances in experimental medicine and biology. 2008, Vol. 619, pg. 613-37.
- Stewart, I.; Schluter, P.; Shaw, G. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health –a review. Environmental health: a global access science source. 2006, Vol. 5, pg. 7.

- Utkilen, H.; Gjolme, N. Toxin Production by *Microcystis aeruginosa* as a Function of Light in Continuous Cultures and Its Ecological Significance. *Applied and environmental microbiology*, 1992, Vol. 58, Issue 4, p. 1321-1325.
- Welker, M.; von Döhren H. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, Vol. 30, Issue 4, pg. 530 – 563.
- Whitton, B.A. 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: N.H. Mann and N.G. Carr [Eds] *Photosynthetic Prokaryotes*. Plenum Press, New York, 1-51.
- Whitton, B.A. The Ecology of Cyanobacteria II. Their diversity in space and time. Springer 2012, pg. 760.
- Wiegand, C.; Pflugmacher, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, Vol. 203, Issue 3, pg. 201–218.
- Zar, J. *Biostatistical Analysis*. 5th ed. Prentice Hall, Inc. 2010, pg. 944.