



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Programa de Posgrado en
Ciencias Ambientales



Cianotoxinas en abrevaderos: peligrosidad y efectos negativos para el ganado

Autor: Elizabeth Font Iribarne (efiribarne@hotmail.com)

Tutor: Dra. Sylvia Bonilla, Facultad de Ciencias (sylvia.e.bonilla@gmail.com)

Cotutor: Dra. Beatriz Brena, Facultad de Química (bbrena@fq.edu.uy)

Miembros del tribunal:

Valeria Freitas de Magalhães (valeria@biof.ufrj.br)

Lizet De León (lizetdl@gmail.com)

Luis Aubriot (luis.aubriot@gmail.com)

2016

Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales

Resumen

La calidad del agua es afectada por el proceso de eutrofización, favoreciendo el crecimiento de cianobacterias planctónicas que producen cianotoxinas de alto riesgo para la salud humana y animal. Este trabajo tuvo por objetivo evaluar la presencia de cianobacterias y microcistinas en aguas de abrevadero de predios rurales en zonas de embalses del Río Negro, cuenca con antecedentes de floraciones de cianobacterias tóxicas. Se propuso determinar peligrosidad potencial y afectación del ganado, y generar insumos para desarrollar un protocolo de acciones preventivas. Se realizaron determinaciones de indicadores cuantitativos de cianobacterias (biovolumen, clorofila *a* por extracción y pigmentos *in vivo*) y de la concentración de microcistinas en agua de abrevaderos. Con el análisis de casos históricos en el país se demostraron casos de muerte de ganado potencialmente causados por cianotoxinas. Por último, se estudiaron tres enzimas hepáticas (GOT, GGT y FAS) para evaluar alteraciones en este órgano y se puso a punto una metodología para determinar microcistinas en suero animal mediante la técnica de ELISA. Los resultados evidenciaron que los indicadores cuantitativos de cianobacterias fueron buenos predictores de la presencia de microcistinas en los abrevaderos. Las enzimas hepáticas de los animales que consumieron agua conteniendo microcistinas fueron superiores a sus valores de referencia. A su vez, estos animales presentaron niveles detectables de la toxina en sangre utilizando el método puesto a punto en esta tesis. La concentración de toxina en suero se correlacionó en forma significativa y positiva con la enzima hepática GGT. Los resultados permitieron evidenciar por primera vez que esta problemática puede afectar uno de los principales rubros de exportación del país. A su vez, se reconocen carencias en los distintos niveles de manejo (actores) y se plantean soluciones para estas necesidades.

Palabras Claves: eutrofización; floraciones de cianobacterias; microcistina en agua; microcistinas en suero; toxicidad; intoxicación animal; enzimas hepáticas; producción ganadera.

Agradecimientos

A mis tutoras Sylvia Bonilla y Beatriz Brena por la orientación, el trabajo en equipo y, por sobretodo, por su apoyo no solo para con la tesis sino también en mis proyectos personales.

Al Veterinario Gonzalo Echegoyen que sin él hubiese sido imposible llevar a cabo este trabajo. Gracias Gonzalo por la dedicación, tu tiempo y el apoyo en todo momento.

A todos los productores que nos abrieron las puertas de sus establecimientos, respondieron la encuesta y trabajaron con nosotros en este proyecto.

A la Dra. Elena Cardozo del Departamento Rumiantes y Suinos, de la Facultad de Veterinaria, por proporcionarnos sueros control para el desarrollo de la técnica.

Al Laboratorio de Bioensayos del Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental por el apoyo para realizar los bioensayos.

A los chicos de Limnología y de Inmunología quienes me dieron una mano en las salidas de campo y los análisis de laboratorio.

Por último, a mi familia y amigos por acompañarme en este trayecto.

Este trabajo fue parcialmente financiado por ANII FCE_6384, la Facultad de Ciencias (UdelaR), el Convenio DINAMA - Facultad de Ciencias, CSIC-Grupo Biotecnología ambiental y médica y PEDECIBA Química.

Índice

Introducción	1
1. Cianobacterias y cianotoxinas	1
2. Cianotoxinas y toxicidad	2
3. Reportes de casos de intoxicación animal	5
4. Indicadores de floraciones y legislación	6
5. Situación en Uruguay, ganado afectado	8
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
Hipótesis	11
Preguntas	11
Capítulo 1	13
Objetivo 1	14
Materiales y Métodos	14
Selección de sitios y análisis en agua	14
Bioensayos	16
Análisis de datos	17
Resultados	17
Variables bióticas y abióticas	17
Correlaciones y modelos de ajuste	18
Situación en Baygorria	21
Situación para todos los establecimientos estudiados	23
Bioensayos	23
Discusión	23
Indicadores cuantitativos y microcistinas	23
Bioensayos	25
Capítulo 2	27
Objetivo 2	28
Materiales y Métodos	28
Relevamiento de casos históricos en el país	28
Análisis de datos	29
Resultados	29
Relevamiento de casos en el país	29

Discusión	33
Floraciones de cianobacterias en fuentes de agua	34
Tiempo de evolución del animal intoxicado	34
Factores determinantes de la afectación del ganado	35
Sintomatología de los animales intoxicados	36
Casos de animales afectados sin muerte	36
Capítulo 3	38
Objetivo 3	39
Materiales y Métodos	39
Obtención y análisis de muestras	39
Puesta a punto para la detección de microcistina en suero por ensayo ELISA	41
Análisis de datos	43
Resultados	44
Microcistinas en abrevaderos	44
Enzimas hepáticas	44
Puesta a punto para la detección de microcistina en suero por ensayo ELISA	46
Microcistinas en suero	49
Análisis conjunto de las variables estudiadas	51
Discusión	54
Enzimas hepáticas	54
Puesta a punto para la detección de microcistina en suero por ensayo ELISA	56
Microcistinas en suero animal	57
Análisis conjunto de las variables estudiadas	57
Discusión general	59
Consideraciones y recomendaciones sobre la problemática para la producción del país	60
Conclusiones	63
Bibliografía	65
Anexo 1	76
Encuesta productores	77

Índice de Figuras

Figura 1.	Regiones agropecuarias en Uruguay en el año 2011, elaborado por MGAP-DIEA con base Censo General Agropecuario 2011.	9
Figura 2.	Aproximación metodológica de la tesis a la problemática indicando los objetivos involucrados en cada etapa.	12
Figura 3.	Distribución logarítmica de: biovolumen vs Clo α , MC vs biovolumen y MC vs Clo α .	20
Figura 4.	Distribución de microcistinas totales vs ficocianina.	21
Figura 5.	Distribución de las variables: biovolumen total de cianobacterias (BV), concentración de clorofila α (CLO) y microcistinas (MC) cuantificados para cada establecimiento (E1, E2, E2P2, E3 y E4) a tiempos 1 (barra negra, fecha: 11/2014), 2 (barra gris clara, fecha: 02/0215) y 3 (barra oscura, fecha: 03/2015).	22
Figura 6.	Relación en el tamaño de los establecimientos (hectáreas) y la cantidad de cabezas de ganado y el número de ganado muerto.	32
Figura 7.	Proporción de cada síntoma en el total de establecimientos para todos los tipos de casos (afectación, muerte y “afectación + muerte”).	33
Figura 8.	Preparación de la muestra de suero adicionado hasta su medición por ELISA. Tomado de Heussner et al. (2014a).	43
Figura 9.	Concentraciones de las enzimas GOT (1), GGT (2) y FAS (3) medidas en suero de animales afectados por establecimiento (A, B y C) y por fecha (indicada para cada establecimiento).	46
Figura 10.	Esquema del protocolo desarrollado en esta tesis para la preparación de la muestra de suero animal para la determinación de microcistinas por ELISA, modificado de Heussner et al. (2014a).	50
Figura 11.	Box-plot de las concentraciones de MC detectadas por ELISA en suero de animales control y animales expuestos a floraciones de cianobacterias.	52
Figura 12.	Box-plot de las concentraciones de MC en suero en relación a la MC en agua.	53
Figura 13.	Concentración de enzimas GOT, GGT y FAS estandarizadas con sus respectivos valores de referencia versus la concentración de microcistinas en suero.	54
Figura 14.	Aproximación metodológica de la tesis a la problemática indicando los resultados encontrados en cada etapa.	60
Figura 15.	Variables por nivel de complejidad que pueden ser insumos para establecer un árbol de decisión dirigido a productores rurales para el manejo del ganado frente a una floración de cianobacterias.	63

Índice de Tablas

Tabla I.	Toxinas potencialmente producidas por diversos géneros planctónicos de cianobacterias. Extraída de Quesada et al. (2004).	2
Tabla II.	Reportes de muerte o afectación animal por intoxicación con hepatotoxinas.	6
Tabla III.	Niveles alerta y guía de la OMS frente a la presencia de cianobacterias en agua para potabilizar y agua de recreación, respectivamente. Modificado de Chorus & Bartram (1999).	8
Tabla IV.	Mediana y rango (Mín. – Máx.) y número de datos (n) de las variables estudiadas en el total de las muestras de agua de los 3 embalses de la cuenca del Río Negro.	18
Tabla V.	Coefficiente de correlación de Pearson entre las variables bióticas y entre la variables abióticas y bióticas, en el total de muestras de agua.	19
Tabla VI.	Casos históricos de ganado potencialmente afectado por toxicidad de floraciones de cianobacterias en Uruguay.	30
Tabla VII.	Características de los abrevaderos y afectación del ganado en los casos nacionales relevados.	31
Tabla VIII.	Pruebas realizadas durante la puesta a punto de la técnica de ELISA para la detección de microcistinas totales en suero animal.	49
Tabla IX.	Resultados de la determinación de microcistinas (MC) en suero de animales expuestos a fuentes de agua con presencia de floraciones.	51

Introducción

1. Cianobacterias y cianotoxinas

Las floraciones algales, también conocidas como “blooms”, son eventos de multiplicación y acumulación de organismos fitoplanctónicos que ocurren en corto plazo (Smayda et al., 1997). Si bien estos eventos suceden naturalmente debido a factores como el aumento de la temperatura e intensidad luminosa o la estabilidad de la columna de agua, también responden al aumento de la carga de nutrientes en los cuerpos de agua continentales, proceso conocido como eutrofización (Hallegraeff et al., 1992; Paerl et al., 1996). Este fenómeno está asociado usualmente a actividades antrópicas que generan aportes de fósforo y nitrógeno al agua (Lampert & Sommers, 2007). Por ende, las floraciones son más frecuentes en regiones donde la agricultura y la urbanización han sufrido un rápido crecimiento (Azevedo et al., 2002, Lampert & Sommers, 2007). Las floraciones más frecuentes de los cuerpos de agua continentales eutróficos corresponden a cianobacterias (Whitton, 2012). Estas pueden detectarse a simple vista por la presencia de acumulaciones en zonas litorales denominadas “espuma” (en inglés: “scums”) y porque le confieren color verde intenso y olor al agua (Chorus & Bartram, 1999).

Las floraciones de cianobacterias traen asociadas efectos negativos ya que deterioran la calidad del agua, restringiendo o impidiendo su uso. Pueden provocar pérdidas económicas severas para las pesquerías, operaciones turísticas y otras actividades relacionadas al agua, ocasionando impactos mayores en el ambiente y en la salud humana y animal (Hallegraeff et al., 1992). Una de las mayores consecuencias es la producción de metabolitos tóxicos, conocidos como cianotoxinas, que pueden causar problemas de salud crónicos o agudos al ser ingeridas por los animales (Paerl, 1988). Las cianobacterias también producen otros metabolitos como la geosmina que confiere fuerte olor desagradable al agua. Además, la acumulación de biomasa de cianobacterias puede provocar un descenso brusco de oxígeno disuelto durante la noche por la respiración de las células, ocasionando la muerte masiva de peces por asfixia (Paerl, 1988).

Las cianotoxinas comprenden una diversa naturaleza química: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos, aunque normalmente se clasifican por los efectos que producen en: 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 I). Los niveles de toxicidad varían para una 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 calidad e intensidad de la luz, la estabilidad de la columna de agua y el pH, sin descartar otros factores ambientales y biológicos (Utkilen et al., 1992, Beamud et al., 2016). También existen diferencias entre cepas de una misma especie que pueden producir más o menos toxina en el ambiente (Piccini et al., 2011).

Tabla I. Toxinas potencialmente producidas por diversos géneros planctónicos de cianobacterias. Extraída de Quesada et al. (2004).

Género	Microcistinas y/o Nodularinas	Otras cianotoxinas	Referencias
<i>Dolichospermum</i>	Si	Saxitoxinas Anatoxinas	Kaebernick & 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>Pseudanabaena</i>	Si	-	Oudra et al., 2001
<i>Raphidiopsis</i>	-	Cylindrospermopsina	Lie et al., 2001 Nascimento et al., 1999

2. Cianotoxinas y toxicidad

Las cianotoxinas son producidas y contenidas en las células de cianobacterias con crecimiento activo. La liberación de éstas al medio circundante ocurre generalmente durante la ruptura, muerte o senescencia celular (Chorus & Bartram, 1999). Según las vías de exposición, las cianotoxinas pueden causar enfermedades por contaminación del agua de consumo, siendo la principal vía de entrada al organismo la ingesta de agua o alimentos contaminados por cianotoxinas. 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, Stewart et al., 2006). Existen otros tipos de exposición como la vía intravenosa (Azevedo et al., 2002), la inhalación por spray de aerosoles con agua (Lang-Yona et al., 2014) o la ingesta a través de suplementos dietarios conteniendo cianobacterias (Dietrich et al., 2008).

Para aves y mamíferos el consumo de agua contaminada con cianotoxinas es la principal vía de exposición (Stewart et al., 2008; Lürling et al., 2013). En el caso del ganado, la disponibilidad de agua en cantidad y calidad es fundamental ya que puede afectar negativamente el estado sanitario y nivel productivo del animal. Tres categorías describen los factores que afectan el requerimiento de agua del ganado: a) relativos al ambiente (ej. temperatura), b) relativos a la dieta (consumo de pastura o granos), c) relativos al animal (tamaño, estado fisiológico, etc.). En términos generales, una vaca lechera consume entre 38 y 110 litros de agua por día, un bovino para carne varía entre 26 y 70 Ld⁻¹, y una oveja de 4 a 15 Ld⁻¹ (Duarte, 2011). 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 el agua de abrevadero.

Se han caracterizado hasta 89 variantes estructurales de microcistina (Welker et al., 2006) y solo unas pocas de nodularina, ambas hepatotoxinas 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). La toxicidad aguda de microcistinas y nodularinas presenta una DL₅₀ intraperitoneal (i.p.) en ratón de 50 a 1200 µgkg⁻¹ peso corporal (Chorus & Bartram, 1999). La DL₅₀ oral para microcistina-LR en ratones es de 5000 µgkg⁻¹ peso (Fawell et al., 1994), aproximadamente un factor 100 veces más elevada que la DL₅₀ i.p.

(microcistina-LR: 50 μgkg^{-1} peso), implicando una menor toxicidad por vía oral. Los animales afectados de forma aguda por estas toxinas pueden presentar una diversidad de síntomas como letargo, hiperventilación, ictericia, contracciones musculares involuntarias, fiebre, apatía, fotosensibilización, entre otras (DeVries et al., 1993, Handeland et al., 2010). Luego de una exposición aguda a altas dosis puede ocurrir la muerte por hemorragia o insuficiencia hepática (Chorus & Bartram, 1999, Dietrich et al., 2005). Pueden observarse cambios patológicos en otros órganos como ser coagulación intravascular diseminada en pulmones (Falconer et al., 1981), mesenterio alterado con equimosis (DeVries et al., 1993) y/o corazón con pequeñas hemorragias en superficie (Handeland et al., 2010).

Existe menos información disponible respecto a la toxicidad crónica, la cual fue estudiada por Fawell et al (1994) en ratones mediante administración oral diaria de diferentes concentraciones de microcistina (MC-LR) durante 13 semanas estableciéndose el nivel sin efectos observables en 40 μgkg^{-1} peso por día. A partir de 200 μgkg^{-1} peso por día se observa un hígado ligeramente patológico (Fawell et al., 1994). Este tipo de exposición puede no presentar síntomas asociados (Manubolu et al., 2014) o los mismos pueden ser muy vagos como por ejemplo pérdida de peso. Una exposición crónica a bajas dosis puede promover el crecimiento de tumores en hígado (Chorus & Bartram, 1999, Dietrich et al., 2005). Por lo tanto, los efectos a la exposición crónica pueden ser más difíciles de detectar y monitorear en el tiempo.

Las floraciones de cianobacterias hepatotóxicas, especialmente productoras de microcistinas, son las más reportadas en todas partes del mundo (Dörr et al., 2010). Existen diversas aproximaciones metodológicas para el estudio de microcistinas presentes tanto en fuentes de agua como en tejidos animales, presentando estos últimos mayor dificultad para su análisis a causa de su matriz más compleja. El primer método utilizado fue el HPLC, seguido por inmunoensayos del tipo ELISA (Chorus & Bartram, 1999). Actualmente se ha incorporando el LC-MS/MS como método de referencia para análisis de microcistinas. Otras herramientas indirectas para la determinación de toxinas en agua, corresponden a bioensayos que involucran la exposición de zooplancton de forma aguda y/o crónica a muestras de agua

potencialmente tóxicas. Estos ensayos son de carácter orientativo y presentan gran utilidad cuando se trata de muestras complejas. A su vez, son análisis de bajo costo y de fácil ejecución que han probado utilidad en determinar la presencia de cianotoxinas en el agua (Smutná et al., 2014). Una desventaja es su baja especificidad, además, se pueden encontrar grandes diferencias en los resultados de acuerdo al tipo de toxina presente en la muestra y del zooplancton (especie, cepa y estadio del crecimiento) utilizado en el bioensayo (Asselman et al., 2014). Los bioensayos podrían ser una herramienta para exploración de la toxicidad de la muestra, pero es necesario evaluar su utilidad según el tipo de toxina a analizar.

3. Reportes de casos de intoxicación animal

Se recopilaron un total de 31 publicaciones de muerte o afectación animal por intoxicación con hepatotoxinas en diversos países del mundo (Tabla II). Se reportaron muertes tanto en animales domésticos (35, 23 y 13% del total para vacas, perros y ovejas, respectivamente) como salvajes (aves, nutrias, rinocerontes, entre otros) (Tabla II). Ochenta y siete por ciento de los casos fueron de mortalidad en corto plazo (menos de 120 horas) en las estaciones de verano u otoño, o en la temporada seca para aquellos países que no presentan estaciones diferenciadas. La mayoría de los casos encontrados provienen de Estados Unidos (35 %) y Australia (13 %) (Tabla II). Las fuentes de agua con floraciones de cianobacterias fueron extremadamente variadas, representadas principalmente por lagos y embalses. La mayoría de los estudios señala la presencia de espuma de cianobacterias en el agua de abrevadero, pero únicamente un 6 % presenta información de la concentración de clorofila *a* fitoplanctónica o células de cianobacterias mL⁻¹ en la misma. Se realizaron análisis de hepatotoxinas en muestras de abrevadero en 48 % de los casos donde se registraron concentraciones en agua desde 0,4 a 135x10⁵ µg L⁻¹, y en espuma desde 198 a 4040 µgg⁻¹ en peso seco y desde 148 a 7x10⁶ µgg⁻¹ en peso húmedo (Tabla II). Los síntomas observados en los animales fueron diversos, siendo astenia el más frecuente (> 50 % de los casos), seguido por contracciones musculares involuntarias, ictericia y anorexia en menor medida.

Tabla II. Reportes de muerte o afectación animal por intoxicación con hepatotoxinas. Se indican animales domésticos y salvajes, número de animales muertos, concentración de microcistinas en agua (p.h. peso húmedo, p.s. peso seco), país y referencia. ND: no dato.

Animal	Nº de muertos	Microcistinas en agua	País	Referencias	
Ovejas	36	ND	Australia	McBarron et al., 1966	
	85	ND	Australia	Main et al., 1977	
	17	ND	Australia	Carbis et al., 1995	
	40	ND	Sudáfrica	Halderen et al., 1995	
Vacas	9	ND	Estados Unidos	Galey et al., 1987	
	0	ND	Estados Unidos	Kerr et al., 1987	
	72	ND	Argentina	Odriozola et al., 1984	
	3	24.000 $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$	Estados Unidos	Fitzgerald et al., 1993	
	3	ND	Sudáfrica	Halderen et al., 1995	
	4	ND	Estados Unidos	Frazier et al., 1998	
	13	ND	Australia	Thomas et al., 1998	
	24	148 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$ p.h.	Estados Unidos	Puschner et al., 1998	
	37	ND	Uruguay	Alonzo et al., 2009	
	6	ND	Argentina	Claro et al., 2010	
	0	4,22 $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$	Finlandia	Manubolu et al., 2014	
	Perros	1	ND	Estados Unidos	DeVries et al., 1993
		1	3470 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$ p.s.	Sudáfrica	Harding et al., 1995
		2	69,4 $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$	Estados Unidos	Walker et al., 2008
1		1607 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$ p.s.	Nueva Zelanda	Wood et al., 2010	
1		6 $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$	Estados Unidos	Van der Merwe et al., 2012	
3		1469 $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$ /4040 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$ p.s.	Holanda	Lürling et al., 2013	
0		ND	Estados Unidos	Sebbag et al., 2013	
Animales salvajes	3	ND	Sudáfrica	Soll et al., 1985	
	20	512 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$ p.s.	Japón	Matsunaga et al., 1999	
	1	198 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$ p.s.	Kenia	Krienitz et al., 2003	
	5500	135x10 ⁵ $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$	España	Costas et al., 2006	
	12	1120 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$ p.s.	Algeria	Nasri et al., 2008	
	1	ND	Noruega	Handeland et al., 2010	
	60	0,23	Argentina	Mancini et al., 2010	
	5	29x10 ⁵ $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$ p.h.	Estados Unidos	Miller et al., 2010	
	521	ND	Tanzania	Nonga et al., 2011	
12	15 $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$	Estados Unidos	Doster et al., 2014		

4. Indicadores de floraciones y legislación

Para el manejo del riesgo, una floración se define en términos de concentraciones de células con potencial de causar daño a humanos y animales, y se utilizan indicadores

cuantitativos como la clorofila a (Clo a), indicador indirecto de la biomasa del fitoplancton, el número total de células de cianobacterias o el biovolumen de cianobacterias totales. La OMS propuso guías internacionales para agua para potabilizar y agua recreacional. En estas guías se establecen diferentes niveles de alerta según los indicadores cuantitativos (Tabla III).

Para agua potable, la Organización Mundial de la Salud propuso, un valor provisional de referencia para microcistina-LR (WHO, 2011) de $1 \mu\text{gL}^{-1}$, 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 $1 \mu\text{gL}^{-1}$ de microcistina-LR en agua potable, siguiendo las recomendaciones de la OMS.

En aguas de recreación, el valor guía propuesto por la OMS para el nivel de riesgo leve o bajo es de $10 \mu\text{gL}^{-1}$ de Clo a , lo que corresponde aproximadamente a $20.000 \text{ célmL}^{-1}$. A esta densidad de cianobacterias se espera de 2 a $4 \mu\text{gL}^{-1}$ de microcistinas, o incluso hasta $10 \mu\text{gL}^{-1}$ si se trata de floraciones altamente tóxicas (Chorus & Bartram, 1999) (Tabla III). A valores de $100.000 \text{ célmL}^{-1}$ o $50 \mu\text{gL}^{-1}$ de Clo a (aproximadamente $20 \mu\text{gL}^{-1}$ de microcistinas), valores máximos del nivel guía de riesgo moderado por exposición recreativa, se deben restringir las actividades en estas aguas (Tabla III). En casos de presencia de “espuma”, el riesgo de efectos adversos es muy alto, pudiendo detectarse valores de microcistinas de $20.000 \mu\text{gL}^{-1}$ o aún mayores en estas acumulaciones, alcanzando un nivel de riesgo muy alto (Chorus & Bartram, 1999, Pérez et al., 2013).

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 (Chorus, 2012). Las guías para la calidad del agua de ANZECC (Australian and New Zealand Environment and Conservation Council) proveen un valor de $11.500 \text{ célmL}^{-1}$ de *M. aeruginosa* (o $2,3 \mu\text{gL}^{-1}$ microcistina-LR), a partir del cual, es esperable un riesgo elevado en la salud del ganado (Chorus, 2012). Sin embargo, estos límites entran en conflicto con información

adicional de otra parte de la guía de este país donde se establece un rango de concentración de células de 11.500 a 81.500 células mL⁻¹ para distintas especies de ganado.

Tabla III. Niveles alerta y guía de la OMS frente a la presencia de cianobacterias en agua para potabilizar y agua de recreación, respectivamente. Modificado de Chorus & Bartram (1999).

Niveles OMS		Biomasa de cianobacterias			Toxina
Agua para potabilizar	Agua de recreación	Biovolumen (mm ³ L ⁻¹)	Células (cél/mL ⁻¹)	Clorofila <i>a</i> (µg/L ⁻¹)	Microcistinas (µg/L ⁻¹)
Alerta I		0,2	2.000	1	
	Guía I	2	20.000	10	2 - 4
Alerta II	Guía II	10	100.000	50	5 - 20

5. 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. La aguas superficiales en el país, tanto naturales (arroyos o ríos) como artificiales (tajamares), son las principales fuentes de agua de abrevadero; en algunas zonas las playas de lagos o embalses cumplen esta función. Este último caso es frecuente en los campos que limitan con los embalses del Río Negro. Los usos del suelo en esta cuenca están asociados a la presencia de praderas adecuadas para ganadería extensiva, donde también se lleva a cabo producción agrícola (MGAP 2015, Figura 1).

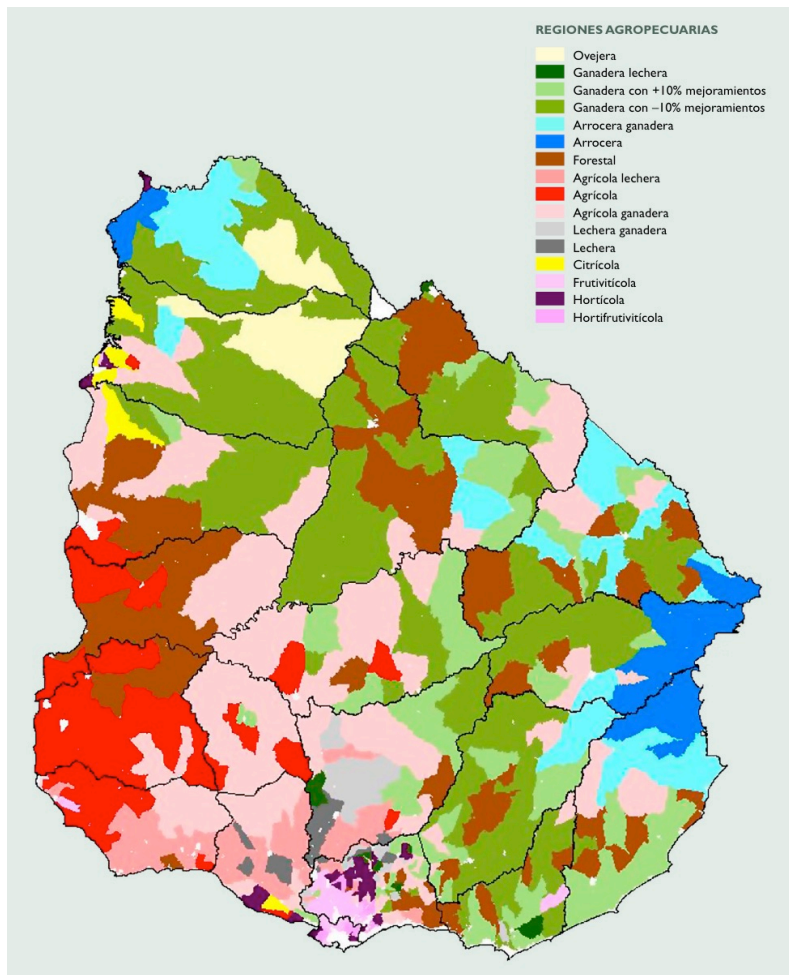


Figura 1. Regiones agropecuarias en Uruguay en el año 2011, elaborado por MGAP-DIEA con base Censo General Agropecuario 2011. La zona de estudio de esta tesis en la cuenca del Río Negro corresponde a regiones ganaderas (verde) y agrícolas ganaderas (rosa). Tomado de MGAP 2015.

El Río Negro es el principal sistema acuático del interior de Uruguay y su cuenca ocupa un 37,5 % del territorio nacional (64.000 km²). Cuenta con 3 embalses formados artificialmente para generación de energía eléctrica, estos son: Bonete (1070 km²) construido en 1945, Baygorria (100 km²) en 1960 y Palmar (320 km²) en 1982. Según los antecedentes, el embalse de Bonete se ha clasificado como mesotrófico (84 µgL⁻¹ PT, promedios anuales 2009 - 2011), y Baygorria (97 µgL⁻¹ PT) y Palmar (116 µgL⁻¹ PT) como eutróficos (Conde et al., 2002, Chalar et al., 2014). Los embalses con estos niveles tróficos propician el desarrollo de floraciones que se aglomeran en las playas (“espuma”) siendo potencialmente perjudiciales para los animales debido a la alta carga de cianotoxinas que presentan. En los embalses del Río Negro se han detectado concentraciones muy altas de microcistina-LR asociados a “espuma” de cianobacterias

(2662 μgL^{-1} en Palmar, 551 μgL^{-1} en Baygorria y 2109 μgL^{-1} en Bonete) (González-Piana et al, 2011).

El valor máximo de microcistinas totales registrado en el país ocurrió en “espuma” del embalse de Baygorria y fue de 38 mgL^{-1} (Bonilla et al., 2015). Datos del período 2009 – 2015 muestran registros constantes de presencia de cianobacterias en la zona de los embalses del Río Negro, categorizándose los mismos en riesgo moderado y alto según los niveles guías de la OMS para aguas de recreación (Chalar et al., 2012, Chalar et al., 2015). Esto implica un riesgo potencial para la salud del ganado que abreva agua en estos embalses.

Para el país existen muy pocos antecedentes de casos asociados a intoxicación de ganado por beber agua contaminada con cianobacterias. En 2009 se registró en Canelones un caso 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 (Alonzo et al., 2009). En febrero del 2013, se detectó 35 mgL^{-1} de microcistina-LR en el agua de abrevadero con acumulaciones de *Microcystis* spp., de una muestra proveniente de un establecimiento ganadero manifestando pérdida de peso en ganado que abrevaba en Baygorria (datos no publicados, Sección Limnología).

En los últimos años han aumentado las consultas de productores rurales y profesionales veterinarios a científicos (Sección Limnología), por la afectación de ganado que bebe agua contaminada con cianobacterias. Sin embargo, existe falta de conocimiento sobre la peligrosidad de las cianobacterias en aguas de abrevadero. Este es el primer estudio que se llevó adelante en el país sobre esta temática, por tanto los resultados podrán constituir insumos clave para estimar pérdidas económicas en el principal rubro de exportación del país y para contribuir a establecer planes de mitigación a nivel nacional. La aproximación metodológica utilizada en esta tesis se describe esquemáticamente en la Figura 2.

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 generar insumos para desarrollar un protocolo de acciones preventivas.

Objetivos específicos

1. Determinar la biomasa de cianobacterias y la presencia de microcistinas totales en el agua de abrevaderos de la cuenca del Río Negro, y establecer su potencial tóxico.
2. Determinar la ocurrencia de ganado potencialmente afectado por la ingesta de microcistinas presentes en el agua de abrevadero.
3. Poner a punto un método para la detección de microcistinas en suero animal y evaluar si los animales que beben agua contaminada con microcistinas presentan valores detectables de esta toxina en suero.

Hipótesis

- El ganado es afectado negativamente por el consumo de microcistinas presentes en abrevaderos de la cuenca del Río Negro, Uruguay.

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 relacionan con la presencia de cianobacterias o microcistinas 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 el suero de animales afectados?

5. ¿Cuál es el estado de conocimiento de los productores sobre la temática.

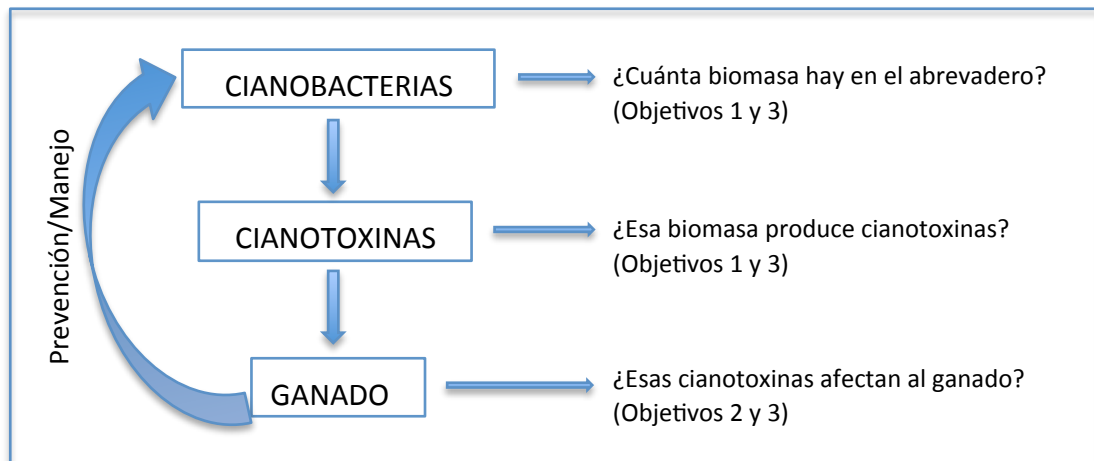


Figura 2. Aproximación metodológica de la tesis a la problemática indicando los objetivos involucrados en cada etapa.

Capítulo 1

Objetivo 1

Determinar la biomasa de cianobacterias y la presencia de microcistinas totales en el agua de abrevaderos de la cuenca del Río Negro, y establecer su potencial tóxico.

Materiales y Métodos

Selección de sitios y análisis en agua

Se seleccionaron 4 establecimientos ganaderos (E1 a E4) ubicados en la zona del embalse de Baygorria en el Río Negro. Se muestreó un sitio de abrevadero de los animales para cada establecimiento en 3 instancias (11/2014, 02/2015 y 03/2015), para las últimas 2 fechas se adicionó un segundo punto de muestreo dentro del establecimiento 2 (E2P2), alcanzando un total de 14 muestras de agua. En los establecimientos E1 y E2 se recolectó agua de una lengua del embalse en donde abrevaban los animales. En el establecimiento E3 se muestreó un riachuelo que comenzaba en este campo y desembocaba en el embalse. Para el establecimiento E4 se muestreó un tajamar que había presentado floraciones de cianobacterias en el pasado con afectación de ganado.

Se determinaron *in situ* las siguientes variables: fluorescencia de clorofila *a* y ficocianina *in vivo* con fluorómetro de mano (Turner, modelo Aquafluor), así como temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad con sensores de campo (sonda multiparámetro HORIBA modelo U52). Las mediciones de la fluorescencia relativa se corrigieron según los valores de calibración con estándar sólido y el valor del blanco (agua destilada), para estandarizar los datos y obtener fluorescencia bruta (en unidades de fluorescencia relativa: UFR).

Se tomaron muestras de agua para realizar identificación taxonómica (300 mL) y recuento de células de cianobacterias al microscopio (100 mL, muestra fijada en el momento con solución lugol). Se tomaron muestras adicionales para la determinación de microcistinas totales (15 mL) y para medir la concentración de clorofila *a* (1 L). Las muestras fueron conservadas refrigeradas (4 °C) y en oscuridad hasta su llegada al

laboratorio. Una vez allí, se filtraron las muestras para Clo *a* en filtros de fibra de vidrio tipo GF/C, y junto con las muestras destinadas al análisis de microcistinas, fueron almacenadas a -20 °C en oscuridad hasta su posterior análisis. Los análisis al microscopio y la determinación de clorofila *a* por el método de etanol caliente de ISO 1992 modificado (Bonilla, 2009) se realizaron en la Sección Limnología, del IECA, Facultad de Ciencias. El análisis de microcistinas totales en agua utilizando kits nacionales de inmunoensayos ELISA (límite de detección 0,3 µg L⁻¹) (desarrollado en la Facultad de Química, Pirez et al., 2013) se llevó a cabo en la Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química (Instituto de Higiene). El ensayo, basado en un anticuerpo policlonal de conejo, es sensible y de amplia especificidad ya que reconoce a la mayoría de las variantes con muy buena reactividad cruzada (Pírez et al., 2013). La intercomparación de resultados de este ELISA con HPLC-MS/MS (variantes LR; RR; YR y LA) presentó excelente correlación para un set de 30 muestras ambientales de agua de embalses y del Río de la Plata (Brena, BM, comunicación personal).

Se observaron las muestras frescas de fitoplancton bajo lupa binocular y luego en microscopio para determinar los géneros de cianobacterias presentes en la muestra, realizando la identificación a nivel de especies cuando se trataba del género *Microcystis*. Para el recuento de las cianobacterias en microscopio se utilizaron cámaras de conteo de 1 y 3 mL en microscopio Olympus invertido a 200 aumentos en campos al azar. Se calculó el biovolumen de las colonias siguiendo aproximaciones geométricas (Hillebrand et al., 1999). Para aquellas muestras de agua con espuma de cianobacterias muy densas, se midió la biomasa fresca y se calculó el biovolumen asumiendo que el material presentaba una densidad igual a la del agua (Wetzel & Likens, 2000). Para esto se pesó la muestra, se centrifugó a 4000 rpm para eliminar el agua y por diferencia de peso se obtuvo la biomasa del material celular.

Además, se analizaron otras muestras de agua (8) de abrevaderos potencialmente contaminados con cianobacterias provenientes de Palmar y Rincón del Bonete durante el verano 2014 - 2015. No se realizaron análisis *in situ* para estas muestras (excepto para 3 muestras del embalse de Rincón del Bonete, salida de campo 27/03/15) ya que

las mismas fueron enviadas a la Facultad de Ciencias directamente por productores rurales de la zona de estudio. En estas muestras se analizó la composición de cianobacterias y se realizó el recuento, análisis de clorofila *a* y de microcistinas con los métodos detallados anteriormente.

En este trabajo se consideró el nivel guía II de la OMS (Tabla III, pág. 8) como indicador de peligrosidad alta para los animales que abreven en aguas con niveles superiores a estos umbrales.

Bioensayos

Se realizaron bioensayos agudos (48 horas) con cladóceros de la especie *Daphnia magna* con el objetivo de evaluar esta herramienta bioanalítica para determinar la toxicidad de las floraciones. A los efectos de poner a punto la técnica se hicieron 5 bioensayos piloto. En estos experimentos se determinó la especie de *Daphnia* a utilizar (*D. magna* o *D. pullex*), el solvente control, el procedimiento de ruptura de las células de cianobacterias y el número de neonatos por poza. Las muestras utilizadas para llevar a cabo los ensayos finales se obtuvieron del establecimiento E2 (25/04/2014 y 27/11/14) sobre una lengua del embalse de Baygorria con presencia de floración de *Microcystis* sp. con concentraciones de microcistinas totales de 24.000 μgL^{-1} y 3401 μgL^{-1} , respectivamente. Se utilizaron placas de 6 pocillos de 10 mL cada uno donde se colocó por duplicado: control (agua mineral Nativa), y dos tratamientos, con células enteras de cianobacterias y con células rotas. La muestra de este último tratamiento se preparó mediante 3 ciclos congelado-descongelado para provocar la liberación de la toxina. Siguiendo protocolos estandarizados (UNE-EN ISO 6341:2013), se utilizaron 5 neonatos de *D. magna* de 24 horas de vida por pocillo y se incubaron en sala de cultivo en oscuridad y a temperatura controlada (20 °C) durante 48 horas. Se controló el estado de los cladóceros cada 24 horas con observación en lupa binocular, según estuvieran nadando, inmóviles (sin nadar pero con actividad del músculo cardíaco) o muertos. Los experimentos se realizaron en la Sección Limnología, Facultad de Ciencias y en el Laboratorio de Bioensayos del Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental de la Intendencia de Montevideo.

Análisis de datos

Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar la asociación entre todas las variables bióticas y abióticas estudiadas. Debido a que las variables biovolumen, microcistinas y clorofila *a* no cumplían con una distribución normal se realizaron transformaciones logarítmicas ($\ln x+1$). Se determinó la existencia de diferencias significativas mediante un ANOVA de una vía para cada variable (biovolumen, microcistinas y clorofila *a*) tanto en el tiempo (11/2014, 02/2015 y 03/2015) como entre los establecimientos de Baygorria (E1 a E4). Se ajustaron modelos de regresión lineal entre los indicadores cuantitativos de cianobacterias y la concentración de microcistinas con un intervalo de confianza de 95%. Se verificó la significancia de cada modelo mediante un ANOVA sobre la regresión (se presentan los resultados de los modelos que fueron significativos). Para los bioensayos se compararon los resultados de ambos tratamientos (células enteras y células rotas) contra los resultados del control para evaluar el porcentaje de sobrevivencia de los animales. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SigmaPlot 11.

Resultados

Variables bióticas y abióticas

Se registró presencia de color verde y olor característico de cianobacterias en el agua de los abrevaderos estudiados. Se observaron cianobacterias en el 78% de las 18 muestras analizadas. Se detectó la presencia de colonias del género *Microcystis* en todas ellas. La especie más frecuente fue *M. aeruginosa*, seguida de *M. novacekii* y por último *M. panniformis*. Filamentos del género *Dolichospermum* también se encontraron en muestras provenientes de los 3 embalses. Durante el recuento celular se observó que casi todas las muestras (10) presentaban cianobacterias coloniales y filamentosas, con predominancia de organismos coloniales en la mayoría de los casos (8). Los indicadores cuantitativos de cianobacterias y la concentración de microcistinas presentaron gran variabilidad en los datos registrándose valores tan altos como 320 mm^3L^{-1} de biovolumen de cianobacterias, 42 mgL^{-1} de clorofila *a* y 3,7 mgL^{-1} de microcistinas (MC) (Tabla IV). Los parámetros físico-químicos (T, pH, O_2 y K) medidos en establecimientos de la zona del embalse de Baygorria (diversas fuentes de agua:

embalse, arroyo y tajamar) presentaron una variabilidad mayor que aquellos medidos en Rincón del Bonete (Tabla IV), donde se muestreó directamente agua del embalse.

Tabla IV. Mediana y rango (Mín. – Máx.) y número de datos (n) de las variables estudiadas en el total de las muestras de agua de los 3 embalses de la cuenca del Río Negro. ND: no hay datos. UFR: unidad de fluorescencia relativa.

Variables	BAYGORRIA	n	RINCON DEL BONETE	n	PALMAR	n
<i>Clorofila a in vivo</i> (UFR)	0,49 (0,17 - 4,23)	14	0,12 (0,10 - 0,14)	3	ND	-
<i>Ficocianina in vivo</i> (UFR)	0,39 (0,08 - 146,23)	14	0,05 (0,03 - 0,06)	3	ND	-
<i>T (°C)</i>	27 (22 - 30)	14	24 (25 - 25)	3	ND	-
<i>pH</i>	8 (7 - 12)	14	8 (7 - 8)	3	ND	-
<i>O₂ (mgL⁻¹)</i>	7 (3 - 18)	14	10 (9 - 10,1)	3	ND	-
<i>K (μScm⁻¹)</i>	213 (80 - 437)	14	76 (75 - 77)	3	ND	-
<i>Biovolumen de cianobacterias (mm³L⁻¹)</i>	510 (0 - 15284)	12	16 (1 - 125300)	5	317278	1
<i>Clorofila a (μgL⁻¹)</i>	60 (7 - 4351)	14	24 (2 - 41810)	6	849 (119 - 1579)	2
<i>Microcistinas totales (μgL⁻¹)</i>	16 (0 - 3670)	13	6 (0 - 1251)	6	1738 (39 - 3436)	2

Correlaciones y modelos de ajuste

Se observó una correlación positiva entre la fluorescencia de la Clo *a*, medida *in vivo*, y la concentración de la Clo *a* (Tabla V). A su vez, ambas variables presentaron una asociación positiva significativa con la ficocianina *in vivo*. Tanto la Clo *a* (por extracción e *in vivo*) como la ficocianina *in vivo* presentaron una correlación positiva con el biovolumen total de cianobacterias y las microcistinas totales (Tabla V, Figura 3). A su vez, también se observó una asociación positiva significativa entre estas dos últimas variables (Tabla V, Figura 3). El pH y el oxígeno son las únicas variables abióticas que evidencian una relación positiva significativa con la Clo *a* y la ficocianina *in vivo*.

Además, el pH presenta una correlación positiva con la microcistina. La temperatura y la conductividad no mostraron asociación significativa con ninguna variable biótica (Tabla V). A partir de estas correlaciones exploratorias se ajustaron 3 modelos lineales significativos que explican las variables clorofila *a*, microcistinas y biovolumen (Figura 3). Interpolando el valor superior de microcistina del nivel guía II de la OMS (20 µgL⁻¹) en nuestros modelos se obtiene un valor calculado de 75 µgL⁻¹ para clorofila *a* y de 200 mm³L⁻¹ para biovolumen.

Tabla V. Coeficiente de correlación de Pearson entre las variables bióticas y entre las variables abióticas y bióticas, en el total de muestras de agua. CLO: clorofila *a* por extracción. MC: microcistinas. K: conductividad. Clo a: clorofila *a in vivo*. Fico: ficocianina, UFR: unidad de fluorescencia relativa. Se indica para cada caso: coeficiente de correlación (r), valor de p y número de muestras. Asociación significativa marcada en negrita: p < 0,050.

	T (°C)	pH	O ₂ (mgL ⁻¹)	K (µScm ⁻¹)	Fico (UFR)	Biovolumen (mm ³ L ⁻¹)	CLO (µgL ⁻¹)	MC (µgL ⁻¹)
Clo a (UFR)	-0,174	0,690	0,488	-0,149	0,962	0,539	0,755	0,746
	0,503	0,002	0,047	0,568	<0,001	0,038	<0,001	<0,001
	17	17	17	17	17	15	17	16
Fico (UFR)	-0,144	0,725	0,527	-0,244		0,568	0,715	0,783
	0,581	<0,001	0,030	0,344		0,027	0,001	<0,001
	17	17	17	17		15	17	16
Biovolumen (mm³L⁻¹)	-0,239	0,468	0,307	-0,098			0,875	0,943
	0,392	0,079	0,265	0,729			<0,001	<0,001
	15	15	15	15			18	18
CLO (µgL⁻¹)	-0,172	0,505	0,330	0,052				0,916
	0,510	0,039	0,196	0,844				<0,001
	17	17	17	17				21
MC (µgL⁻¹)	-0,094	0,671	0,496	-0,227				
	0,729	0,004	0,051	0,398				
	16	16	16	16				

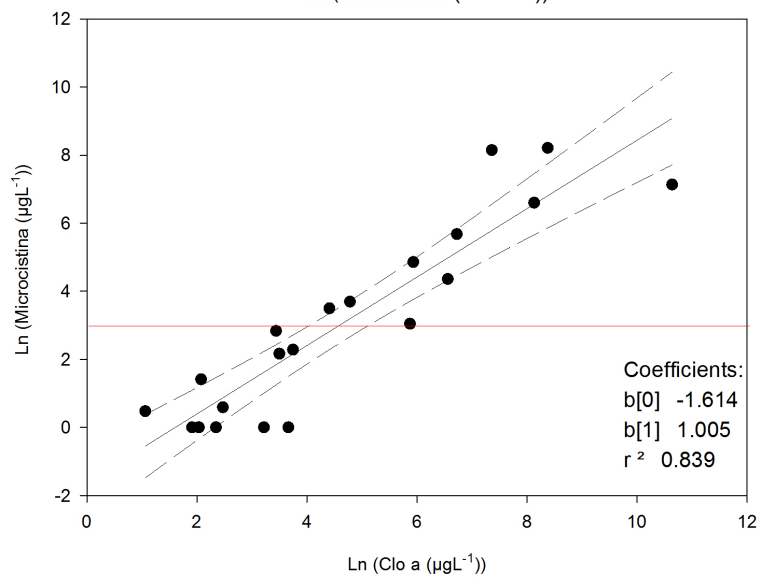
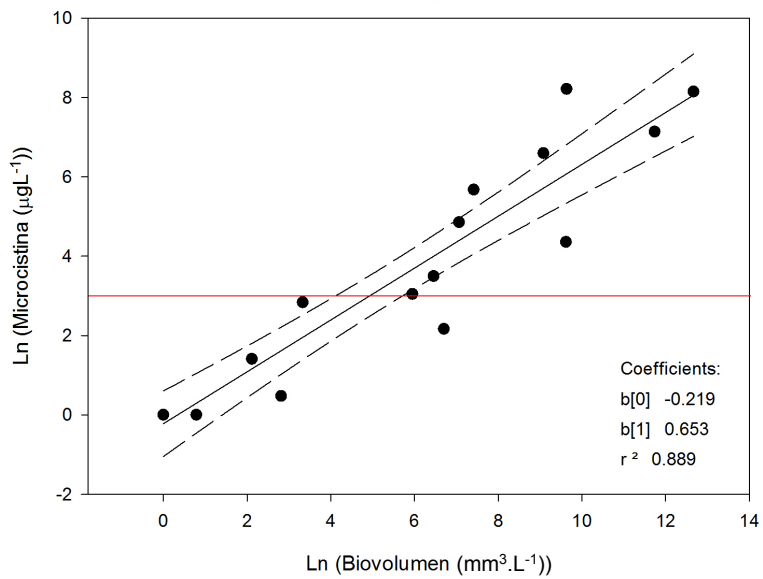
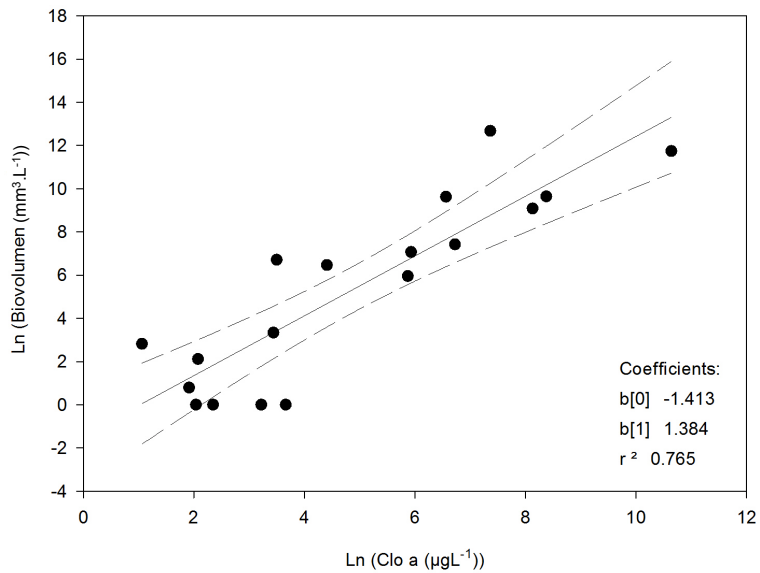


Figura 3. Distribución logarítmica de: biovolumen vs Clo α , MC vs biovolumen y MC vs Clo α . La regresión lineal está dada por la línea continua, se indican los parámetros y el r^2 de ajuste. En

línea punteada se marca el intervalo de confianza del 95 %. La línea roja representa el valor superior de microcistinas ($20 \mu\text{gL}^{-1}$) del nivel guía II de la OMS para aguas de recreación.

Se obtuvo una regresión lineal significativa entre la concentración de microcistinas y la ficocianina medida por fluorescencia *in vivo* (Figura 4). Interpolando el valor superior del nivel guía II de la OMS para agua de recreación ($20 \mu\text{gL}^{-1}$) en dicho modelo se obtiene un valor calculado de ficocianina de 3,44 UFR.

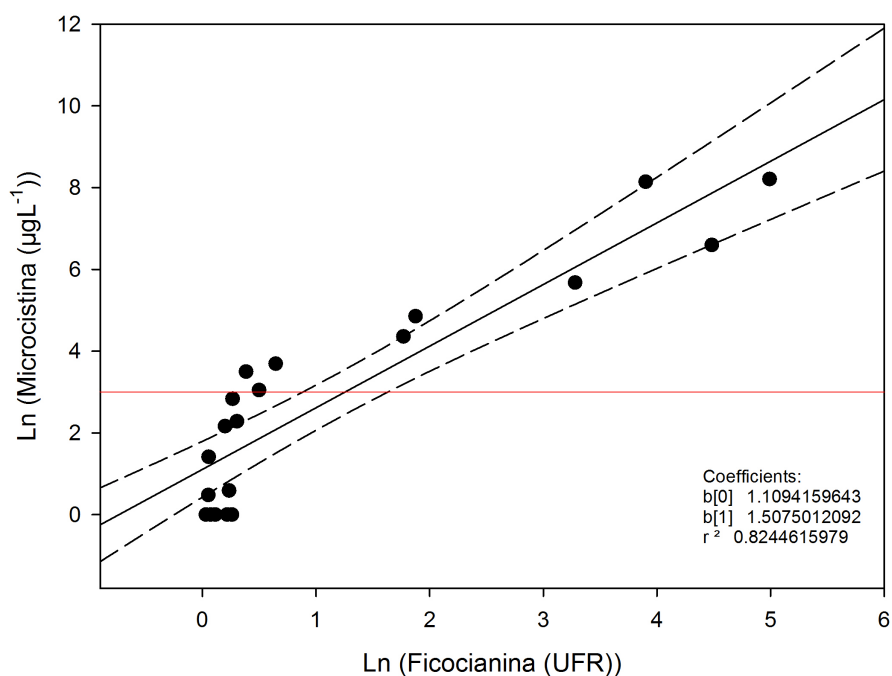


Figura 4. Distribución de microcistinas totales vs ficocianina *in vivo*. La regresión lineal esta dada por la línea continua, se indican los parámetros y el r^2 de ajuste. En línea punteada se marca el intervalo de confianza del 95 %.

Situación en Baygorria

En la Figura 5 se observa la evolución de las variables BV, CLO y MC para los establecimientos ubicados en el embalse de Baygorria. En términos generales, los valores más altos de las variables estudiadas se evidencian en el tiempo 1 (11/14) para los establecimientos E1 y E2, los valores descienden para los tiempos 2 (02/15) y 3 (03/15), en los cuales el punto 2 del establecimiento 2 (E2P2) presenta los mayores valores para las 3 variables. No se registraron cianobacterias ni se detectaron microcistinas en el agua de los establecimientos 3 y 4 (excepto E3 tiempo 1, donde no se obtuvo muestra para BV), por lo tanto, la presencia de clorofila indica la existencia de otro tipo de fitoplancton allí presente (Figura 5). No se observan diferencias

significativas en el tiempo para cada variable en ninguno de los establecimientos estudiados ($p > 0,05$). Tampoco se observaron diferencias significativas entre establecimientos para las distintas variables estudiadas ($p > 0,05$).

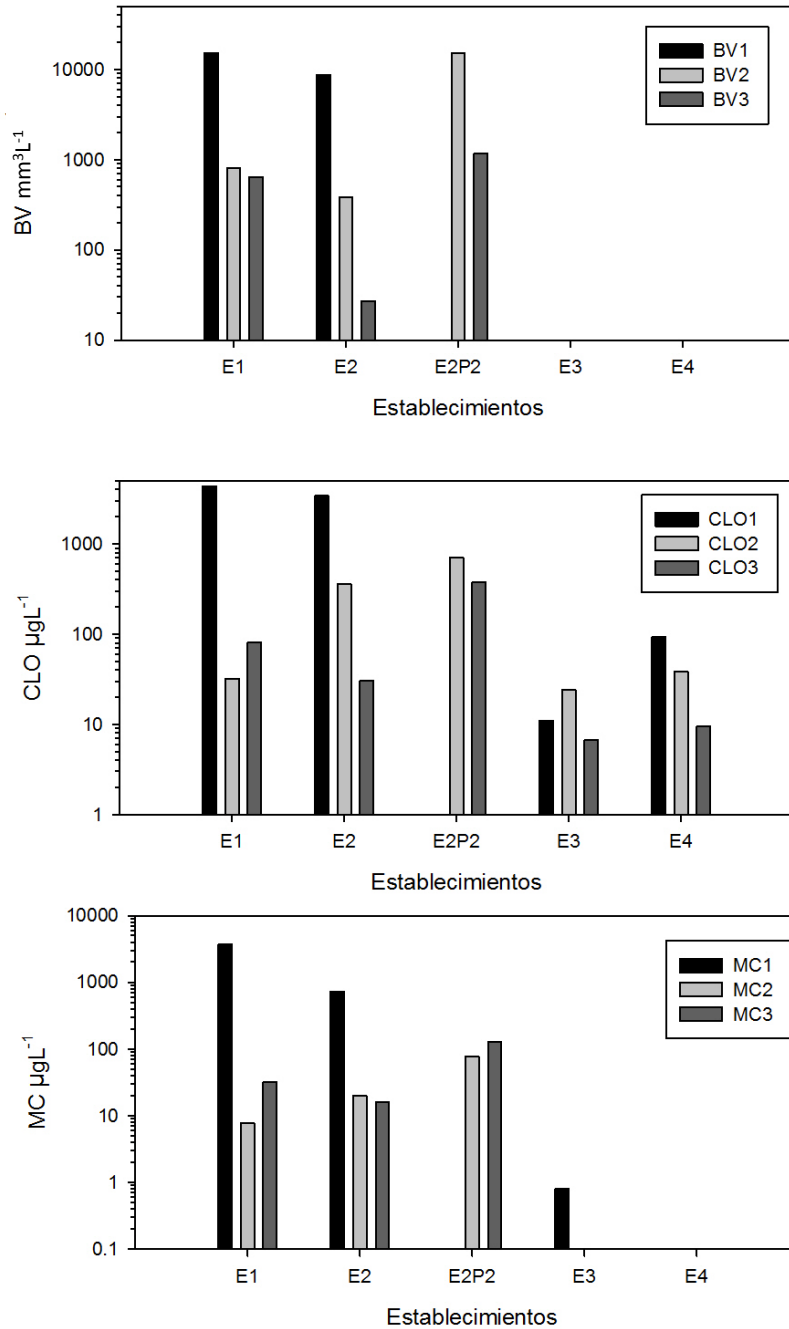


Figura 5. Distribución de las variables: biovolumen total de cianobacterias (BV), concentración de clorofila *a* (CLO) y microcistinas (MC) cuantificados para cada establecimiento (E1, E2, E2P2, E3 y E4) a tiempos 1 (barra negra, fecha: 11/2014), 2 (barra gris clara, fecha: 02/0215) y 3 (barra oscura, fecha: 03/2015). E2P2 corresponde a un segundo punto de muestreo en el

establecimiento 2 para el cual se recolectó muestra en tiempos 2 y 3. En E3 tiempo 1 no se recolectó muestra para BV.

Situación para todos los establecimientos estudiados

Utilizando el nivel guía II de la OMS (Tabla III, pág. 8), todos los establecimientos estudiados (excepto E3 y E4) sobrepasaron este límite en al menos uno de los muestreos realizados (Tabla IV, pág. 18). Se detectaron valores hasta 180 veces mayores al nivel superior de referencia II de la OMS para microcistinas (valor de referencia: $20 \mu\text{gL}^{-1}$), 800 veces mayores para clorofila *a* (valor de referencia: $50 \mu\text{gL}^{-1}$) y 31.000 veces mayores para biovolumen ($10 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$). A su vez, hay muestras que no sobrepasaron el nivel guía II pero igualmente la mayoría presenta resultados de microcistinas positivos, clasificándose en el nivel guía I o II de la OMS (Tabla III, pág. 8) asociado a baja y moderada probabilidad de riesgos adversos para la salud, respectivamente.

Bioensayos

Los resultados de ambos bioensayos mostraron un 100 % de cladóceros vivos y nadado a las 48 horas, tanto en el control como en los tratamientos (con células enteras y con células rotas). Esto indica que los cladóceros utilizados en este ensayo no se vieron afectados por la concentración de microcistinas de la muestra. A su vez, se evidenciaron rastros de células de cianobacterias en el tracto digestivo de algunos cladóceros en ambos tratamientos, lo que indica que las células fueron ingeridas durante el experimento.

Discusión

Indicadores cuantitativos y microcistinas

Los indicadores cuantitativos de cianobacterias se correlacionaron significativamente con la concentración de microcistinas totales en agua, siendo indicadores robustos para estimar la potencialidad tóxica de una fuente de agua para el ganado. Esta correlación positiva entre la clorofila, la fluorescencia y la biomasa con la microcistina también se registró en un trabajo realizado en lagos de Uganda, donde uno de los

predictores más fuertes de la concentración de microcistinas fue la biomasa de *Microcystis* spp. (Poste et al., 2013).

Las concentraciones registradas de clorofila *a* y microcistinas de este trabajo superan en algunos casos los valores reportados anteriormente en distintas cuencas del Uruguay (De León et al., 2001, Brena et al., 2006, González-Piana et al., 2011, Pérez et al., 2103). La mayoría de las muestras analizadas en este trabajo presentaron altos contenidos de células de cianobacterias de los géneros *Microcystis* spp. y *Dolichospermum* spp., que son los más frecuentes descritos para el embalse del Río Negro y otras cuencas en el país (Chalar et al., 2012, Chalar et al., 2015, Haakonsson et al., en preparación). La mayoría de datos de biovolumen registrados en nuestro trabajo se encuentran en el rango de aquellos descritos previamente para floraciones halladas en el país ($8,4 \text{ mm}^3\text{L}^{-1} \pm 20,8 \text{ mm}^3\text{L}^{-1}$), (Bonilla et al., 2015), a excepción de las muestras de espuma que alcanzaron valores aún más elevados ($317,3 \text{ cm}^3\text{L}^{-1}$). Por lo tanto, el monitoreo visual regular en busca de espuma y color en las fuentes de agua donde abreva el ganado es la herramienta más sencilla para reducir el riesgo de intoxicación del mismo.

Diversos estudios indican muerte de animales salvajes o de ganado por ingerir agua con microcistinas en un amplio rango de concentraciones. Se han reportado casos de muertes de aves que bebían agua con concentraciones de microcistinas desde $0,23 \mu\text{gL}^{-1}$ (en Argentina), hasta casos con concentraciones de $135 \times 10^5 \mu\text{gL}^{-1}$ (en España) (Costas et al., 2007; Mancini et al., 2010). Otro estudio registró la muerte de 3 bovinos expuestos a una concentración de toxina de $24.000 \mu\text{gL}^{-1}$ en Michigan, Estados Unidos (Fitzgerald et al., 1993).

El modelo obtenido con nuestros datos para clorofila es concordante con el modelo obtenido por la OMS a partir del cual se generan los niveles guías. Por su parte, el valor obtenido de biovolumen en nuestro modelo es 20 veces superior a lo esperado por la OMS para una concentración de microcistinas de $20 \mu\text{gL}^{-1}$ en agua. La ficocianina *in vivo* resultó ser un buen indicador cuantitativo que puede suplir a la clorofila *a* y al biovolumen para un análisis exploratorio rápido. El método de clorofila por extracción,

el cálculo de biovolumen total de cianobacterias y la determinación de la concentración de microcistinas totales requieren de material específico de laboratorio, equipamiento y personal calificado para realizar estos análisis. Un método más rápido y sencillo es la medición de fluorescencia *in vivo*, tanto la clorofila como la ficocianina mostraron correlación significativa con la microcistina, pero la ventaja de medir ficocianina es que se relaciona directamente a la presencia de cianobacterias en el agua. Cualquier productor puede realizar una medida rápida de estos parámetros teniendo el equipo adecuado, que le permite tomar una decisión mas informada en cuestión de minutos y mover el ganado a una fuente de agua alternativa de ser necesario.

Existe un riesgo potencial para los animales que abreven en aguas derivadas de los embalses estudiados ya que la mayor parte de los valores registrados de biovolumen, clorofila *a* y microcistinas superan ampliamente el nivel de alerta II de la OMS (Tabla III, pág. 8) a partir del cual se recomienda tomar precauciones, como restringir las actividades en el agua o su uso.

Bioensayos

En nuestro caso no se observaron efectos adversos en *D. magna* a pesar de la exposición a altas concentraciones de microcistinas. Los resultados obtenidos son únicamente asociables a *D. magna*, ya que los mecanismos de toxicidad no sólo dependen del tipo de cianobacteria presente en la muestra sino también de la especie expuesta e incluso la cepa utilizada. Entre especies del mismo género, como ocurre en *Daphnia*, los resultados pueden ser significativamente diferentes (Asselman et al., 2014). Por lo cual, la utilidad de los bioensayos se ve condicionada por el género y especie de zooplancton seleccionado para el análisis.

Diversos estudios reportan resultados contradictorios sobre los efectos de las cianobacterias tóxicas en el crecimiento, reproducción, sobrevivencia y alimentación de *Daphnia*. Por ejemplo, efectos nocivos sobre el crecimiento y la supervivencia de *D. magna* se encontraron cuando el cladóceros se expuso a células de una cepa de *Microcystis* productora de microcistinas y a la misma cepa mutada (no productora de

microcistinas) (Lürling, 2003). De todas formas, los efectos eran mayores cuando se trataba de la cepa salvaje de *Microcystis* (productora de microcistinas), indicando que los efectos nocivos son generados no sólo por la presencia de microcistinas en el agua sino también por otros metabolitos presentes en la muestra. (Lürling, 2003). Por el contrario, otros estudios encuentran que estos efectos negativos en exposiciones agudas no dependen de la concentración de microcistinas en la muestra, ya que los mayores efectos tóxicos se asociaron a muestras con concentraciones indetectables de dicha toxina (Pineda-Mendoza, 2012, Smutná et al., 2014). Los autores concuerdan en que los efectos adversos sobre cladóceros no pueden ser explicados por la sola presencia de microcistinas sino que otros metabolitos podrían jugar un papel crucial en la toxicidad. Las cianobacterias producen numerosos metabolitos con acción desconocida y se supone que existen otros metabolitos que no han sido identificados aún (Otten et al., 2015). Por lo tanto, se descarta el uso de este bioensayo con *D. magna* como herramienta sencilla para determinar la peligrosidad potencial de floraciones de cianobacterias productoras de microcistinas en muestras ambientales.

Capítulo 2

Objetivo 2

Determinar la ocurrencia de ganado potencialmente afectado por la ingesta de microcistinas presentes en el agua de abrevadero.

Materiales y Métodos

Relevamiento de casos históricos en el país

Se recopiló información histórica de posibles casos de ganado en el país afectado por microcistinas, especialmente en la cuenca del Río Negro. Se utilizaron distintas aproximaciones para recolectar esta información. En primer lugar se llevó a cabo una revisión bibliográfica de las publicaciones realizadas en Uruguay a través de Google Académico. En segundo lugar se solicitó información en diferentes instituciones nacionales como INIA, MGAP, Regional Norte de la UDELAR, Facultad de Ciencias y de Veterinaria. En tercer lugar, se llevó a cabo una encuesta a productores rurales con preguntas sencillas, con opciones de respuesta categórica tipo SI o NO, de múltiple opción y con rangos de frecuencia (tiempo de evolución: horas, días, semanas y meses, frecuencia de floraciones en 1 año) para responder sobre las condiciones del agua de abrevadero y el ganado afectado (Ver Anexo 1).

Como parte de la estrategia para difundir la encuesta se realizó una conferencia informativa en Paso de los Toros (17/12/2014), y se diseñó y distribuyó un folleto informativo sobre la problemática, ambos orientados a productores y técnicos rurales. Se repartieron un total de 74 folletos en diversos lugares e instancias como la rural del Prado (2014), así como en la conferencia de Paso de los Toros, y a través de correo electrónico a distintos contactos y asociaciones relacionados con la ganadería. Las encuestas fueron distribuidas mediante correo electrónico (25 encuestas), en la conferencia brindada en Paso de los Toros y entregadas en los 4 establecimientos mencionados en el Capítulo 1. Se obtuvo respuesta de 10 encuestas en total.

La información obtenida permitió elaborar una matriz con las siguientes variables: ubicación geográfica del campo, hectáreas, actividad productiva, tipo de ganado, tipo

de alimentación y fuente de agua de los animales, presencia de color, olor y turbidez en el agua, presencia y frecuencia de floraciones en años anteriores, episodios en 1 año, número y tipo de ganado afectado o muerto, tiempo de evolución (tiempo de resolución de la situación del animal, ya sea muerte o recuperación) y sintomatología clínica.

Análisis de datos

Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la relación entre las hectáreas y el número de ganado de los establecimientos; el número de ganado muerto *versus* las hectáreas de campo, las fuentes de abrevadero y los síntomas clínicos reportados. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa SigmaPlot 11.

Resultados

Relevamiento de casos históricos en el país

Se relevaron un total de 10 casos de posible afectación o muerte de ganado por consumo de agua de abrevadero con presencia de floraciones de cianobacterias productoras de microcistinas, distribuidos en 7 establecimientos. Los mismos se encuentran en los departamentos de Río Negro, Tacuarembó, Durazno y Canelones, donde los primeros 3 forman parte de la Cuenca del Río Negro (Tabla VI).

Tabla VI. Casos históricos de ganado potencialmente afectado por toxicidad de floraciones de cianobacterias en Uruguay. Se indica variable, el porcentaje del total (%) o el promedio (\bar{x}) y el rango (Mín. – Máx.) según corresponda, unidades y número de establecimientos (n establecimientos).

<i>Variable</i>	<i>Valor</i>	<i>Unidades</i>	<i>n establecimientos</i>
Establecimientos			
Hectáreas	687,3(42-2600)	Ha	6
Rubros			
Ganadero	72	%	7
Ganadero + Agrícola	14	%	7
Ganadero + Agrícola + Forestal	14	%	7
Ganado			
Vacas	29	%	7
Ovejas	14	%	7
Vacas + Ovejas	57	%	7
Número de cabezas de ganado	879 (220-2900)	Promedio (Mín.-Máx.)	6
Alimentación			
Pastura natural	43	%	7
Pastura natural + otro	57	%	7
Fuente de abrevadero			
Embalse	14	%	7
Tajamar	14	%	7
Embalse o tajamar + otro	72	%	7

Se observó una gran variabilidad en el tamaño de los establecimientos donde la mayoría de ellos realizan únicamente actividades ganaderas (Tabla VI). Aquellos que declararon más de una actividad combinan la ganadería con la producción agrícola y/o forestal (Tabla VI). En cuanto al tipo de ganado predominaron los establecimientos mixtos, es decir, aquellos que crían vacas y ovejas. El número de cabezas de ganado también fue muy variable y en general dependió significativamente de las hectáreas disponibles para la cría animal ($r = 0,988$, $p = 0,012$) (Figura 6).

La alimentación de los animales fue similar entre establecimientos. Todos los productores usaban pastura natural y la mitad combinaban pasturas naturales con otro tipo de alimentos como ración mixta, mejoramiento y fardos de alfalfa (Tabla VI). Las fuentes de abrevadero fueron variables. La minoría de los productores (28 %) utiliza una sola fuente de agua, por el contrario, la mayoría cuenta con varias fuentes de abrevadero como agua de pozo, tajamar y ríos o arroyos (Tabla VI).

Tabla VII. Características de los abrevaderos y afectación del ganado en los casos nacionales relevados. Se indica la variable en porcentaje con respecto al total de casos, el número de establecimientos, tipo de problema (afectación y/o muerte) y el tiempo de evolución en los casos de mortalidad de ganado.

<i>Variable</i>	<i>%</i>	<i>n establecimientos</i>
Alteraciones del aspecto del agua del abrevadero		
Presencia de mancha verde	100	7
Presencia de olor	100	6
Turbidez	100	5
Mancha verde en años anteriores	100	5
Problemas encontrados en el ganado según el total de establecimientos		
Afectación	14	7
Muerte	43	7
Afectación + muerte	43	7
Tiempo de evolución de muerte		
	<i>Tiempo</i>	<i>n establecimientos</i>
Ovejas	Semanas – Meses	3
Vacas	Horas – Días	3

Todos los establecimientos reportaron presencia de mancha verde en el agua, acompañada generalmente de olor, color y turbidez en la misma (Tabla VII). Dentro de los problemas encontrados en el ganado, predominan en igual proporción los casos de muerte de ganado y “afectación + muerte”, y en menor medida únicamente afectación (Tabla VII). El número de ganado muerto fue independiente del tamaño del establecimiento ($r = -0,0613$, $p = 0,939$), aunque proporcionalmente los establecimientos con menor número de ganado fueron más afectados (Figura 6). De todas formas, no se observa una correlación negativa significativa entre el tamaño del establecimiento y la proporción de animales muertos en cada establecimiento ($p > 0,05$). El número de ganado muerto y la variedad de fuentes de agua no estuvieron significativamente correlacionados ($p = 0,05$).

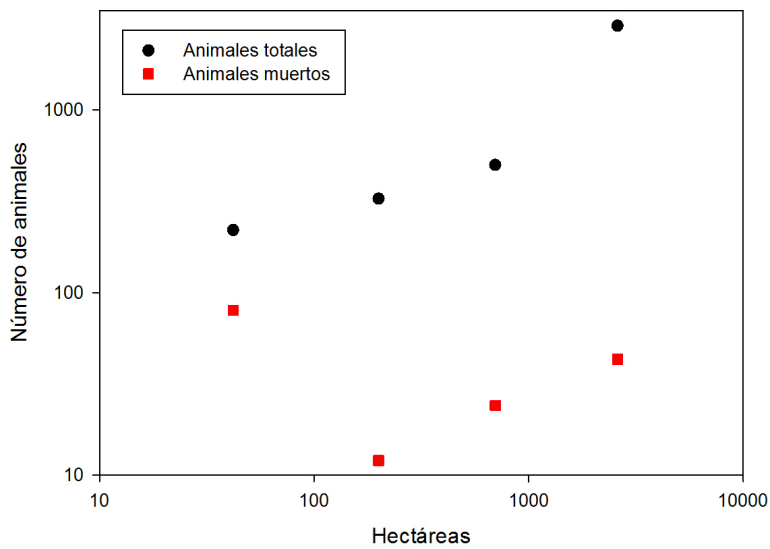


Figura 6. Relación en el tamaño de los establecimientos (hectáreas) y la cantidad de cabezas de ganado y el número de ganado muerto. Se incluyen únicamente los establecimientos para los que se tiene información para estas variables (n = 4).

Diversos síntomas clínicos fueron reportados para los animales afectados en 6 de los 7 establecimientos estudiados. El más frecuente fue el de astenia (debilitamiento general) apareciendo en un 85 % de los establecimientos, seguido por letargo, pérdida de apetito, pérdida de peso y contracciones musculares involuntarias, presentes cada uno en un 50 % (Figura 7). En 33 % de los establecimientos los animales sufrieron dificultad para respirar, y sólo 17 % presentaron síntomas de fotofobia y fotosensibilización (Figura 7).

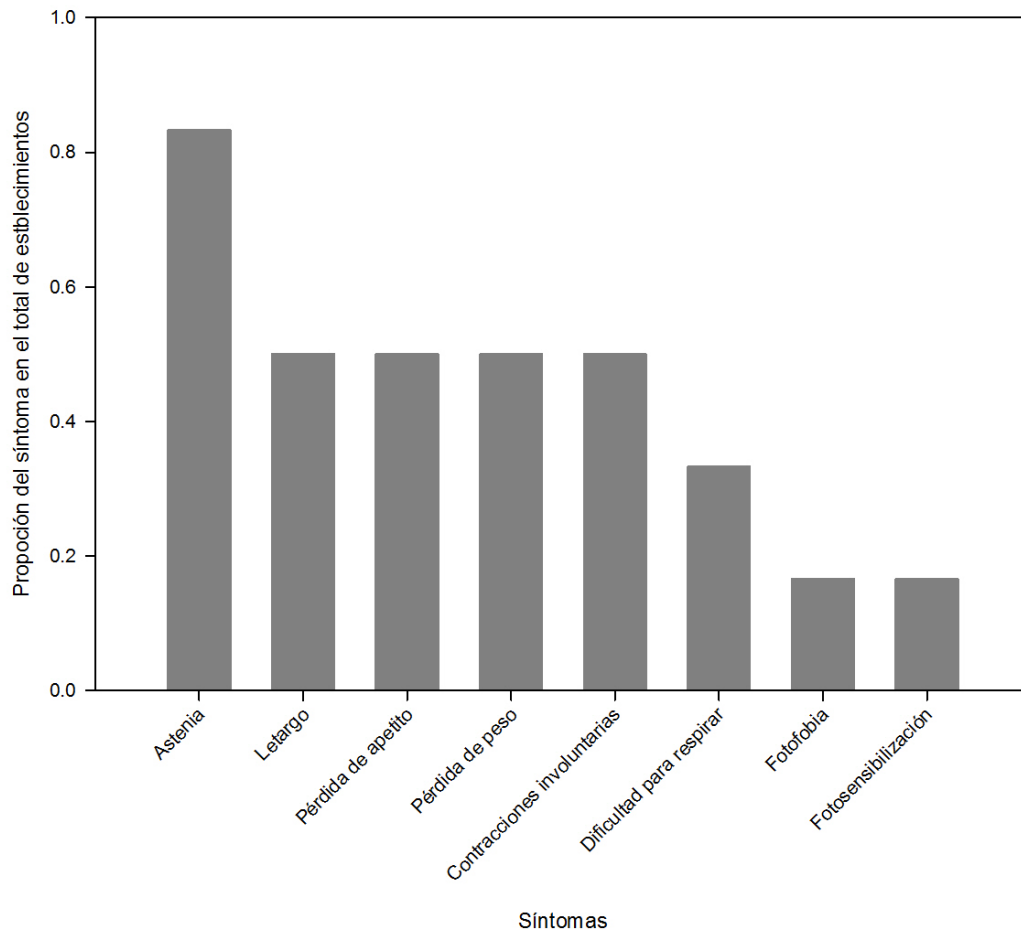


Figura 7. Proporción de cada síntoma en el total de establecimientos para todos los tipos de casos (afectación, muerte y “afectación + muerte”).

Los casos de muerte de ganado que evidenciaron sintomatología en los animales (3 casos) registraron entre 3 y 6 síntomas simultáneamente. La astenia es el único síntoma que se repite en los 3 casos de muerte, el resto de los síntomas corresponden a combinaciones diferentes de todos los detallados en la Figura 7. El número de ganado muerto en estos casos fue de 12 ovejas, 38 vacas y 80 ovejas, reportándose 3, 4 y 6 síntomas respectivamente. Se evidenció una relación significativa entre el número de ganado muerto y el número de síntomas reportados ($r = 0,998$, $p = 0,035$). Se dispone de información sintomatológica solamente para un caso de afectación, en el que se detectó únicamente pérdida de peso como síntoma aparente.

Discusión

Por primera vez para el país se realizó una recopilación de casos de ganado probablemente afectado por fuentes de agua contaminada con cianobacterias. A partir de las diversas instancias de interacción con productores y técnicos antes mencionadas, se desprende que esta es una problemática escasamente comprendida pero potencialmente grave ya que puede afectar directamente la producción ganadera provocando pérdidas económicas significativas.

Floraciones de cianobacterias en fuentes de agua

En Uruguay existen registros de ocurrencia de floraciones en diversas fuentes de agua: ríos, embalses, lagos, estuarios y lagunas (Codd et al., 2005; Bonilla et al., 2015), lo cual se corresponde con lo observado en los casos relevados para el país, donde se encontraron floraciones en tajamares, embalses y arroyos. Si bien no existen registros de análisis de agua para estos casos, durante este trabajo, *Microcystis* fue la cianobacteria detectada con mayor frecuencia en los abrevaderos de la cuenca del Río Negro (Capítulo 1), siendo uno de los géneros más frecuentes en la región (Conde et al., 2002, Chalar et al., 2012, Chalar et al., 2015) y en el país (Haakonsson et al., en preparación). Esto implica que *Microcystis* sp. puede estar asociada a la muerte o afectación de los animales en cuestión. Nuestros resultados concuerdan con la mayoría de los reportes mundiales sobre casos de animales afectados por hepatotoxinas, pues hacen referencia a la presencia de *Microcystis spp*, y en menor medida a *Nodularia sp.* y *Planktothrix sp.* en aguas superficiales (Main et al., 1977, Wood et al., 2010). Por otro lado, los animales no evitarían beber agua con cianobacterias ya que otros estudios experimentales demostraron que ratones prefieren consumir agua contaminada con cultivos densos de *M. aeruginosa* en lugar de agua con cultivos de baja densidad o agua limpia (López-Rodas y Costas, 1999).

Tiempo de evolución del animal intoxicado

En nuestro estudio, la mortalidad de ganado se registró en períodos de tiempo entre horas y meses, siendo generalmente plazos más largos a los reportados en la literatura. En general, los casos agudos en la literatura describen tiempos de muerte menores, en su mayoría inferiores a las 120 horas, a pesar de tratarse de animales diferentes, ya sea salvajes (Nonga et al., 2011) o domésticos (Main et al., 1977, Frazier

et al., 1998, Lurling et al., 2013), y de distintos tamaños. El tiempo de evolución va a depender de la concentración de microcistina en el agua de abrevadero (Konst et al., 1965, Fawell et al., 1994). Por lo tanto, en nuestro estudio, las diferencias en el tiempo de muerte podrían estar relacionadas con exposiciones a diferentes concentraciones de microcistinas presentes en el agua. En el Capítulo 1 se registró una gran variabilidad de los valores de la toxina en el agua, aún en puntos de muestreo cercanos (menores a 50 metros), lo que tendría consecuencias diferentes sobre los animales según donde abreen. La presencia de una fuente de agua alternativa limpia podría aumentar los tiempos de evolución, o sea, retrasar los tiempos de muerte, ya que el animal estaría reduciendo la cantidad de cianotoxina consumida por día y por ende, la afectación hepática sería menor.

Factores determinantes de la afectación del ganado

La dosis de microcistinas consumida determina el tipo de efecto observado en el animal, cuanto mayor sea la misma más graves serán los efectos hasta alcanzar la muerte. Estudios controlados demuestran que hay una relación inversa entre la concentración de microcistinas consumidas y el tiempo de muerte, y que a mayor tamaño del animal más alta debe ser la dosis para inducir la muerte (Konst et al., 1965). Basándonos en antecedentes bibliográficos observamos que bovinos expuestos en condiciones no controladas a $0,4 \mu\text{gL}^{-1}$ de microcistinas totales no murieron (Manubolu et al., 2014) mientras que todos los expuestos a $24.000 \mu\text{gL}^{-1}$ murieron en un lapso de 24 horas (Fitzgerald et al., 1993). Si bien la concentración de microcistinas es crucial al momento de determinar el efecto sobre los animales, se debe considerar también el tiempo de exposición a la toxina. De acuerdo a la DL_{50} oral calculada en ratones ($5000 \mu\text{gkg}^{-1}$ peso), un bovino para carne de peso promedio (300 kg, según fuente GTM) debería consumir 1500 mg de microcistinas para alcanzar la muerte. Dada la cantidad de agua que consumen estos animales ($26 - 70 \text{ Ld}^{-1}$) es posible alcanzar esta dosis en tan solo un día (Fitzgerald et al., 1993). Sin embargo, no se debe descartar el riesgo de muerte a valores menores de microcistinas debido a que la exposición continua a la toxina genera un daño acumulativo en el hígado pudiendo culminar en una fatalidad. A su vez, existen otros factores que deben tomarse en cuenta como el estado fisiológico del animal y la sinergia de las microcistinas con otras

toxinas u otros compuestos químicos de la floración. Distintos trabajos con bioensayos demuestran mayores efectos tóxicos utilizando directamente la biomasa de floraciones, aún conteniendo bajas concentraciones de microcistinas, que los efectos producidos por microcistinas administradas aisladamente (Lürling, 2003, Smutná et al., 2014), esto implica que la sinergia de la microcistinas con otros compuestos presentes en la floración de cianobacterias aumenta el riesgo de muerte del animal.

Sintomatología de los animales intoxicados

Debido a que las toxinas pueden causar la muerte de animales en tan solo horas (Chorus & Bartram, 1999), muchas veces los animales son encontrados cuando ya están muertos (Soll et al., 1985, Costas et al., 2006, Miller et al., 2010) lo cual dificulta el establecimiento de la causalidad. Otras veces no se observa sintomatología alguna durante la exposición a cianotoxinas (Halderen et al., 1995). El síntoma más comúnmente descrito en la literatura fue el de debilidad general e incluso puede ser el único síntoma manifiesto (Main et al., 1977, Frazier et al., 1998). Esto concuerda con lo encontrado en los casos de Uruguay, donde astenia fue el síntoma más destacado por los productores (en 85 % de los establecimientos). En nuestro trabajo, la pérdida de apetito y las contracciones musculares involuntarias aparecieron en segundo lugar, en acuerdo con antecedentes encontrados en la literatura (Carbis et al., 1995, Puschner et al., 1998, Alonzo et al., 2009). Los resultados de nuestro estudio muestran que los casos de muerte presentaron una sintomatología más variada que los casos de afectación donde aparecen pocos o ningún síntoma, como ha sido registrado en otros trabajos (DeVries et al., 1993, Mc Barron et al., 1966, Van der Merwe et al., 2012, Manubolu et al., 2014). Sin embargo, analizando los casos históricos de la literatura no se encuentran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la cantidad de síntomas presentes en los caso de muerte y en los de afectación. Por lo tanto, la sintomatología no es un buen indicador de la gravedad de la intoxicación del animal.

Casos de animales afectados sin muerte

En la literatura es frecuente encontrar solamente casos de muerte de animales adjudicados a intoxicación por cianobacterias (Briand et al., 2003 y Stewart et al., 2008). Los casos de afectación sin muerte tienen baja repercusión y comúnmente

pasan desapercibidos ya que los síntomas de los animales son generales e inespecíficos (letargo, pérdida de peso, etc.), y pueden asociarse a la presencia de parásitos como la *Fasciola hepatica* (Mussart et al., 2009) o a una intoxicación por consumo de la planta *Lantana camara* (Rivero et al., 2011). Existen pocas publicaciones donde se registran animales afectados sin muerte y en general involucran animales domésticos (Harding et al., 1995, Sebbag et al., 2013, Manubolu et al., 2014).

La mayoría de los registros internacionales corresponden a casos de intoxicación de ganado (Tabla II, pág. 6), igual a los relevados en el país, probablemente debido a la cercanía de estos animales con el ser humano y a su importancia económica. Existen pocos antecedentes que realicen la medición de microcistinas en tejidos como hígado (Miller et al., 2010, Van der Mewer et al., 2012) o riñón, pulmón y corazón (Nonga et al., 2011), pero aquellos que miden la toxina en sangre son aún más escasos (Manubolu et al., 2014). No existen registros a nivel mundial sobre la acumulación de microcistinas en el tejido muscular de mamíferos, aunque si se han detectado microcistinas en músculos de tortugas y peces que se encuentran en presencia de esta hepatotoxina (Freitas de Magalhães et al., 2001, Nasri et al., 2008). Debido a que nuestro país exporta tanto ganado en pie así como diversos cortes de carne, es importante controlar los casos de afectación sin muerte ya que pueden comprometer la calidad de nuestro producto.

Capítulo 3

Objetivo 3

Poner a punto un método para la detección de microcistinas en suero animal y evaluar si los animales que beben agua contaminada con microcistinas presentan valores detectables de esta toxina en suero.

Materiales y Métodos

Obtención y análisis de muestras

Utilizando suero animal, se buscó determinar la concentración de microcistinas totales, como indicador de intoxicación, y la concentración de tres enzimas hepáticas, transaminasa glutámico oxalacética (GOT), γ -glutamyltransferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (FAS), como indicadores de alteración del funcionamiento hepático cuando se registran a valores elevados. Se seleccionaron estas enzimas ya que valores superiores a los de referencia para la transaminasa GOT indica daño hepatocelular, mientras que las alteraciones de GGT y FAS se asocian a colestasis (obstrucción/disfunción biliar) (Henry, 2010). Para ello, se trabajó con muestras de sangre de ganado potencialmente afectado por beber agua contaminada con cianobacterias. Se seleccionaron 3 establecimientos sobre la cuenca del Río Negro (Baygorria (A), Palmar (B) y Rincón del Bonete (C)) que cumplieran con estas condiciones. A y B son de mediano tamaño con ca. 500 ha ocupadas por ganado bovino (B también tiene cría de ovinos). C es un establecimiento pequeño (42 ha), ubicado en una isla con ganado ovino. El síntoma común a todos los animales afectados fue la pérdida de peso, reportándose diarreas y abortos para el caso A.

Se realizaron un total de 7 muestreos (agua + suero de 5 animales) en distintas fechas: 4 en el establecimiento A (06/05/14, 10/12/14, 05/03/15 y 23/04/15), 1 en el establecimiento B (23/04/15) y 2 en el establecimiento C (04/02/15 y 25/05/15). Por dificultades operativas en el establecimiento A, las fechas de muestreo de sangre animal no coinciden con las fechas de obtención de agua de los abrevaderos. Las muestras de sangre de los animales y de agua de los abrevaderos correspondientes fueron enviadas por los productores a la Sección Limnología de la Facultad de Ciencias.

Para la obtención de las muestras se elaboró para los productores un protocolo sencillo de toma y conservación de muestras. Junto con el protocolo se les envió frascos de 500 mL para recolección de muestras de agua y tubos de 15 mL con aceleradores de la coagulación y separador de suero para las muestras de sangre animal. Las muestras fueron mantenidas en oscuridad y baja temperatura hasta su entrega en la Facultad de Ciencias. En las muestras de agua se realizaron recuentos de células de cianobacterias totales y cálculo del biovolumen en microscopio, se analizaron microcistinas totales en agua mediante ELISA y se cuantificó la concentración de la Clo *a* fitoplanctónica (como se detalla en el Capítulo 1) mediante espectrofotometría. Todas las muestras de agua para los 3 establecimientos seleccionados fueron estudiadas conjuntamente con las muestras de agua del Capítulo 1.

Para el análisis de enzimas hepáticas y la determinación de microcistinas en suero animal, se recolectó en cada muestreo sangre de 5 animales clasificados como “afectados” por beber agua de abrevaderos con floraciones de cianobacterias. Se recolectaron 3 tubos por animal, uno de ellos para analizar las enzimas hepáticas GOT, GGT y FAS. Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria. Los valores normales de referencia de acuerdo al informe del laboratorio de Facultad de Veterinaria fueron para GOT: 25 – 125 UL⁻¹ (unidades internacionales por litro), para GGT: 9 – 23 UL⁻¹ y para FAS: 77 – 215 UL⁻¹.

Los otros dos tubos de sangre se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos para obtener el suero que fue conservado congelado (-20 °C) hasta su análisis de determinación de microcistinas disueltas (no ligadas a proteínas) mediante un kit de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) desarrollado localmente y validado para muestras de agua (Pirez et al., 2013). Como no se contaba con un metodología validada para la determinación de microcistinas en suero, en este trabajo se llevó a cabo la puesta a punto de una técnica tomando como base el procedimiento de ELISA descrito por Heussner et al. (2014a) para suero humano adicionado. El objetivo propuesto fue llegar a detectar concentraciones de microcistinas totales en suero de vaca de aproximadamente 0,1 - 0,3 µgL⁻¹, según lo hallado para suero de

bovinos en la literatura (Manubolu et al., 2014). Esta etapa se realizó en la Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química (Instituto de Higiene). El criterio utilizado para seleccionar los sueros de ganado a estudiar (n = 17) fue la presencia de sintomatología en los animales, dato obtenido a través de los productores, y las fechas de extracción que se correspondían con una mayor concentración de microcistinas en el agua. Estas muestras fueron analizadas por duplicado. Los sueros utilizados como control negativo (sin microcistinas, n = 10) provenían de animales que abrevaban en bebederos con agua de pozo (establecimiento A), así como de animales controlados del Departamento Rumiantes y Suinos, de la Facultad de Veterinaria. La concentración de microcistinas en suero puede disminuir por adsorción en la superficie del material en que se almacena. En nuestro caso, los sueros problema fueron almacenados en tubos de plástico Eppendorf entre 8 y 12 meses hasta su análisis por ELISA. No se encontró en la literatura estudios de almacenamiento por períodos tan prolongados, pero se ha demostrado que no se producen cambios en la concentración de microcistina en suero adicionado almacenado durante 2 meses en recipientes de plástico (Heussner et al., 2014b).

Puesta a punto para la detección de microcistinas en suero por ensayo ELISA

La técnica descrita por Heussner et al. (2014a) comienza con la precipitación de proteínas utilizando metanol 80 % seguido de una extracción con hexano al sobrenadante para eliminar las grasas, repitiendo ambas etapas por duplicado (Figura 8). Se conserva la capa acuosa, se seca con nitrógeno y se retoma posteriormente en ácido acético 5 %, se sonica para favorecer la disolución y se aplica a columnas de fase sólida (SPE) (Figura 8). El eluido se recoge en dos fracciones (E1 y E2), se seca con nitrógeno y se retoma en metanol acuoso para analizar su contenido de microcistinas en el kit de ELISA (Figura 8). Heussner et al. (2014a) utilizaron suero humano adicionado en un rango de concentraciones de microcistina de $1 \mu\text{gL}^{-1}$ a $200 \mu\text{gL}^{-1}$. Los autores reportaron la mejor recuperación (entre 80 y 120 %) con el ensayo basado en suero policlonal.

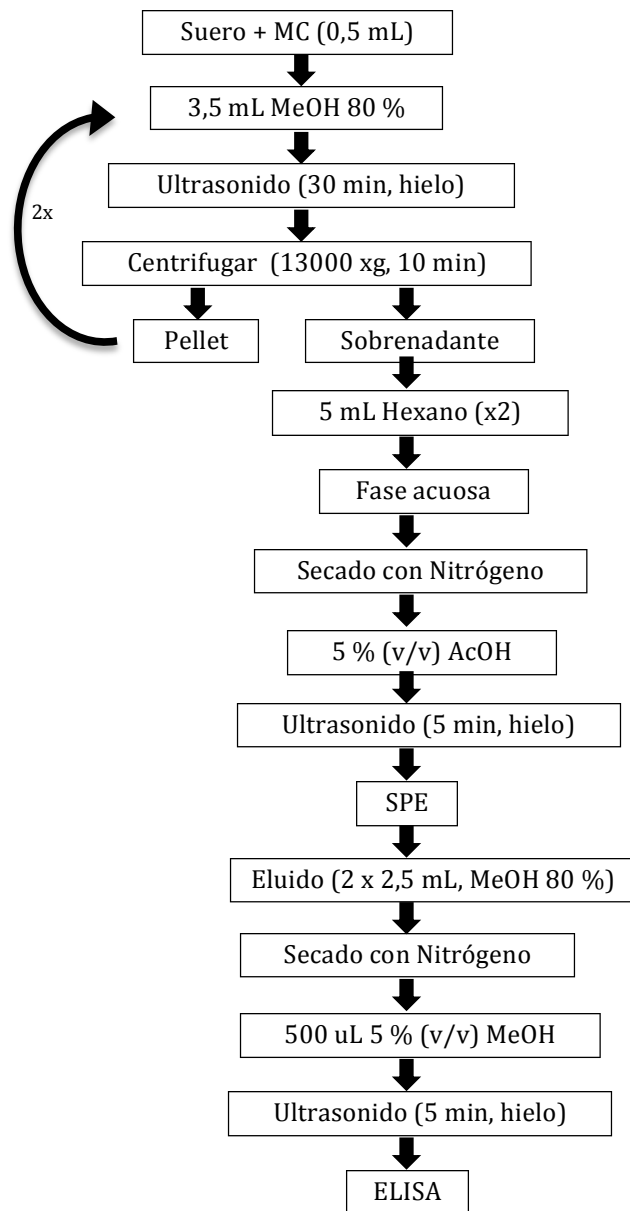


Figura 8. Preparación de la muestra de suero adicionado hasta su medición por ELISA. MC: microcistina, MeOH: metanol, AcOH: ácido acético, SPE: extracción en fase sólida. Tomado de Heussner et al. (2014a).

Partiendo del procedimiento de Heussner et al. (2014a) para sueros humanos, se realizaron una serie de experimentos a los efectos de ajustar el método para su aplicación en suero de ganado. Se inició la puesta a punto con suero humano por ser una matriz similar a la de estudio y de fácil obtención. Se adicionaron distintas concentraciones de microcistina LR (MC-LR) al suero humano para determinar el porcentaje de recuperación y se fue ajustando la metodología de acuerdo a los resultados obtenidos en cada experimento con el fin de optimizar el método y

disminuir el tiempo y los pasos a seguir, ya que el procedimiento es extremadamente largo y complicado. Se realizaron un total de 10 experimentos para ajustar el método, los primeros 5 utilizando suero humano y los restantes 5 utilizando suero animal. Las muestras de los experimentos se corrieron por duplicado y la determinación por ELISA se realizó por triplicado. Los volúmenes inicial y final del método se definieron según el material de laboratorio disponible y los valores de toxina que se podrían llegar a encontrar en sueros de animales problemas según la bibliografía.

Se optó por utilizar el método de ELISA debido a su elevada sensibilidad y su amplia especificidad, lo que facilita la detección en muestras de suero, a la vez que asegura un resultado global (de la mayoría de las variantes de microcistinas). El ELISA es un excelente método de “screening”, y para obtener un resultado confirmatorio se utilizan métodos analíticos estándar. Debido a los bajos valores de concentración detectados y a que se dispone de muy pequeños volúmenes remanentes de los sueros, no fue posible analizar estas muestras por otros métodos.

Análisis de datos

Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la relación entre los valores estandarizados de enzimas hepáticas, y la relación de estos con la microcistina presente en suero animal. A través un box plot se compararon los datos obtenidos de microcistinas en agua y en suero animal. Para las enzimas hepáticas se definió que los resultados de un muestreo reflejaban una alteración de la función hepática cuando la mediana de los datos superaba el valor de referencia máximo para cada enzima. Se utilizó un ANOVA de una vía para determinar si existían diferencias significativas entre los muestreos clasificados como alterados y no alterados según el criterio seleccionado para cada enzima. A su vez, se realizó otro ANOVA de una vía entre los muestreos clasificados como alterados para cada enzima con el fin de determinar si había diferencias significativas entre estos. Se evaluó mediante un ANOVA de una vía diferencias entre las concentraciones de microcistinas del total de animales afectados versus los controles, y estos últimos versus dos grupos de animales afectados de acuerdo a limitantes del método de detección. A su vez se estudió, mediante el test de t, la existencia de diferencias significativas entre la concentración de microcistinas

presentes en vacas y en ovejas que abrevaban bajo la misma concentración de microcistinas. En caso de que los datos no cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SigmaPlot 11.

Resultados

Microcistinas en abrevaderos

En los abrevaderos de todos los establecimientos seleccionados se observó la presencia de cianobacterias, con predominancia del género *Microcystis* como se reportó en el Capítulo 1. Los valores de clorofila *a* para estos establecimientos fueron generalmente superiores a $50 \mu\text{gL}^{-1}$ (límite superior del nivel guía II de la OMS). En todas las muestras analizadas se detectó la presencia de microcistinas totales con una mediana de $29,5 \mu\text{gL}^{-1}$ y un rango de 9 a $730 \mu\text{gL}^{-1}$.

Enzimas hepáticas

En todos los muestreos, los resultados de las tres enzimas hepáticas evidencian valores por encima de los límites de referencia, lo que corresponde con un hígado alterado (Figura 9). Las concentraciones de las enzimas que se encontraron por encima del valor de referencia correspondiente se consideraron casos de animales afectados. La GGT fue la enzima que presentó un mayor porcentaje de muestreos con animales afectados (71%), seguida de la FAS (43 %), y la GOT (29 %). Debe destacarse además que, en ningún muestreo se encontraron resultados promedio correspondientes a valores normales para las tres enzimas hepáticas estudiadas, y en tres muestreos se detectó más de una enzima con valores elevados simultáneamente (A 06/05/14, A 05/03/15 y C 04/02/15).

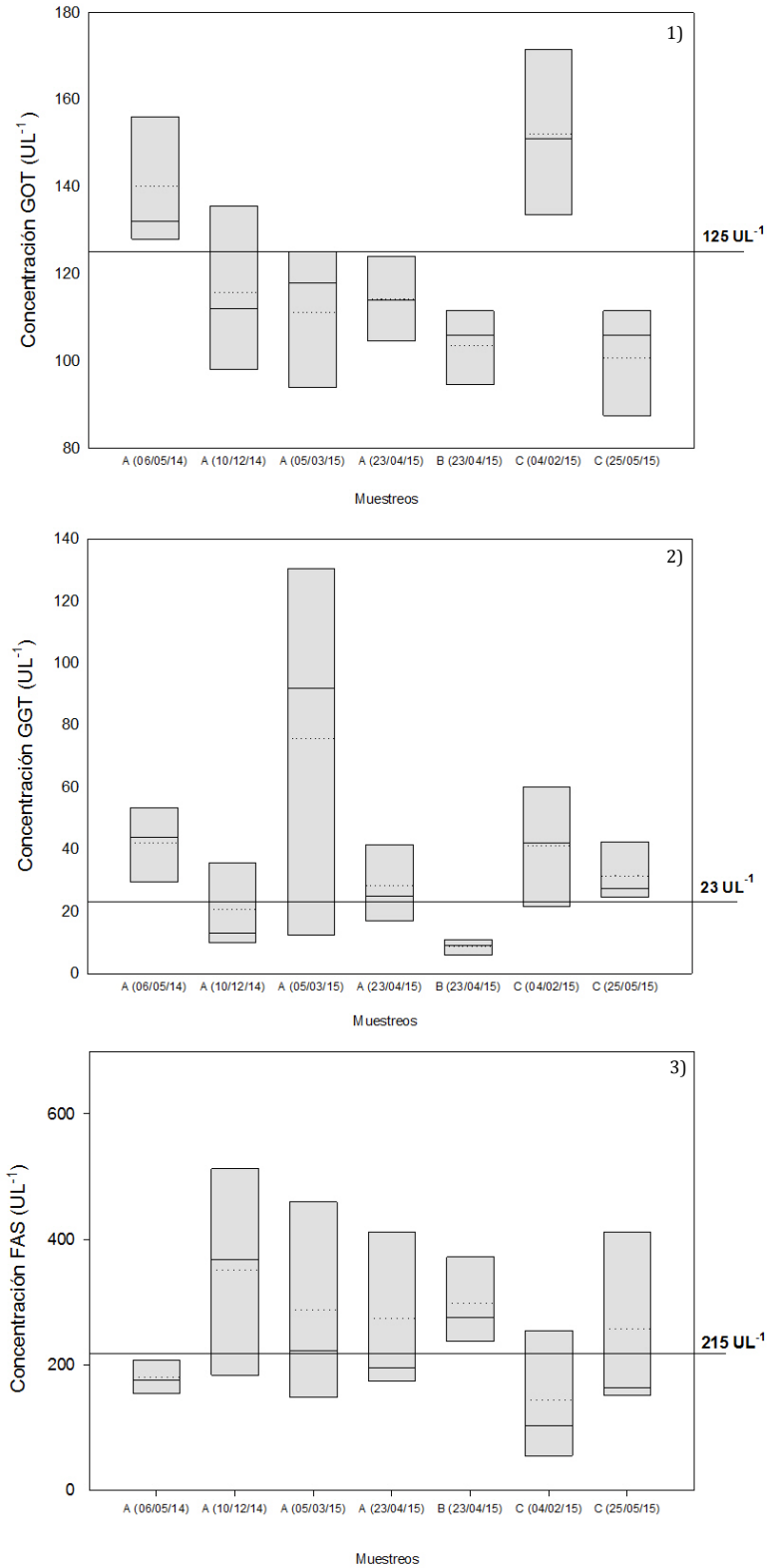


Figura 9. Concentraciones de las enzimas GOT (1), GGT (2) y FAS (3) medidas en suero de animales afectados por establecimiento (A, B y C) y por fecha (indicada para cada establecimiento). Las cajas indican los percentiles 5% y 95%, la línea horizontal continua negra la mediana y la línea horizontal punteada la media. La línea horizontal continua que cruza cada gráfico indica el valor de referencia superior para cada enzima.

La comparación entre los datos de los muestreos de animales con función hepática alterada versus no alterada, según el criterio mencionado previamente, mostró diferencias significativas para todas las enzimas estudiadas (GOT $p < 0,001$, GGT $p = 0,001$, FAS $p = 0,019$, ANOVA). A su vez, la comparación entre muestreos que presentaron enzimas hepáticas alteradas permitió determinar que los daños hepáticos fueron de similar magnitud, ya que no se evidencian diferencias significativas en los resultados para cada enzima (ANOVA, $p > 0,05$).

Puesta a punto para la detección de microcistinas en suero por ensayo ELISA

Se comenzó por reproducir el procedimiento original de la técnica de Heussner et al. (2014a) (precipitación, desgrasado y SPE) con adiciones de altas concentraciones de microcistinas ($10 \mu\text{gL}^{-1}$) en suero humano (Experimento 1 y 2, Tabla VIII). En estos experimentos se obtuvieron porcentajes de recuperación variables (59 - 87 %) y sub-óptimos. Como el objetivo era detectar concentraciones notoriamente menores, se disminuyó la concentración adicionada a 2 y $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ (Experimento 3, Tabla VIII). Se eliminó el paso del segundo eluido (E2), ya que fue no detectable en todos los casos estudiados, y se decidió realizar un único eluido de 3 mL. Para aumentar la concentración del extracto a analizar y facilitar su detección, en el Experimento 3 se incrementó 5 veces el volumen de muestra. Para optimizar la operativa se descartó la repetición de la precipitación con metanol en la extracción inicial y se observó que no afectó el porcentaje de recuperación del analito. Sin embargo, el desgrasado con hexano se debe realizar por duplicado ya que algunas muestras forman una emulsión difícil de separar debido al alto contenido graso de la muestra.

También se probó la eliminación de la extracción en fase sólida (Experimentos 4 y 5). Para esto, inicialmente se adicionaron a soluciones de PBS, distintas concentraciones de microcistina (2 y $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$). Esas muestras fueron tratadas con metanol y hexano, retomando las soluciones evaporadas en distintos solventes (acético 5 % y agua mili Q) para medir por ELISA. Se concluyó que el ácido acético presentaba interferencias positivas. Por tanto, en la etapa previa a la determinación por ELISA, se decidió retomar la muestra en agua mili Q. En los experimentos 4 y 5 se probó con suero adicionado y sin adicionar, pero sin la etapa de extracción en fase sólida. En los

resultados se observan valores medibles en el suero sin adicionar, y además, el suero adicionado dio recuperaciones bastante mayores al 100 % (128-164%, Tabla VIII). Por lo tanto, la extracción en fase sólida es un paso crucial para la determinación de microcistinas en suero mediante ensayos de ELISA policlonales.

Los siguientes experimentos se realizaron con suero vacuno y con concentraciones de microcistinas más bajas (0,3 y 0,5 μgL^{-1} , Experimentos 6 a 8, Tabla VIII). Además, se estandarizó el volumen inicial de muestra en 1 mL para simplificar la operativa, y el volumen final en 250 μL para lograr un factor de concentración adicional. Las recuperaciones de toxina obtenidas en estos experimentos (6 a 8) fueron bajas. En el Experimento 9 se observaron recuperaciones bajas e inconsistentes entre los duplicados (16 - 54 %, Tabla VIII) a 0,5 μgL^{-1} de microcistina. Se analizaron los “pass through” (volumen recogido a la salida de de la columna durante la aplicación de la muestra) y los lavados de SPE para determinar si las bajas recuperaciones se debían a pérdidas en las etapas de adsorción y lavado de las columnas, pero todos los valores fueron no detectables. A partir de esto se decidió utilizar acetonitrilo 90 % como solvente de elución alternativo en lugar de metanol 80 % para facilitar la desorción del analito. Los rendimientos obtenidos fueron más bajos aún (información no presentada) por lo que se volvió al uso de MeOH en una concentración de 90 % y se incluyó 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA). El TFA se utiliza como co-eluyente de la SPE en el método ISO, en la preparación de muestras de agua para la determinación de microcistinas por HPLC (ISO 20179). En los resultados se observó una mejora sustancial en el porcentaje de recuperación de la toxina (Experimento 10, Tabla VIII).

Tabla VIII. Pruebas realizadas durante la puesta a punto de la técnica de ELISA para la detección de microcistinas totales en suero animal. Recup: recuperación, ND: no detectable, Exp: experimento. X = no se realizó, MC-LR: estándar de microcistina variedad LR. E1 y E2: eluidos 1 y 2 respectivamente de la SPE. A-B: identificación de sueros diferentes. Para los sueros vacunos adicionados se trabajó con una mezcla de sueros de distintas vacas, y para la determinación de controles (sueros sin adicionar) se utilizaron sueros individuales. *¹muestras sin duplicado *²eluyente utilizado: MEOH 90%, 0,1% TFA.

	Exp	MC-LR añadida (μgL^{-1})	Volumen muestra (mL)	Volumen final del extracto analizado (mL)	SPE	Recuperación Suero adicionado (%)	Resultado Suero Control (%)
Suero humano	1	10	0,5	0,5 E1 - 0,5 E2	si	87* ¹	ND* ¹
	2	10	0,5	0,5 E1 - 0,2 E2	si	59 A* ¹ - 63 B* ¹	x
	3	2	2,5	0,5 E1 - 0,2 E2	si	95	ND* ¹
	3	0,5	2,5	0,5 E1 - 0,2 E2	si	75	ND* ¹
	4	0,5	1	0,5	no	164	40
Suero vacuno	5	0,5	1	0,5	no	128	25
	6	0,5	1	0,25	si	46	ND
	7	0,3	1	0,25	si	40	ND
	8	0,3	1	0,25	si	53	ND* ¹
	9	0,5	1	0,25	si	16 - 54	x
	10* ²	0,3	1	0,25	si	82	x

Finalmente, el método se estableció utilizando un volumen de 1 mL de muestra de suero, seguido de precipitación de proteínas con MeOH 80 % y de un desgrasado doble con hexano (Figura 10). La etapa de extracción en fase sólida es indispensable y como solvente de elución se utilizan 3 mL de MeOH 90 % con 0,1 % de TFA. Luego, se evapora el solvente y se retoma en 0,25 mL de agua mili Q para realizar la determinación de microcistinas por ELISA (Figura 10). El método de extracción modificado lleva aproximadamente 30 horas (Figura 10). Para la estimación del límite de detección y de cuantificación del método se estudió la desviación estándar de los resultados para 10 sueros control. El límite de detección (promedio + 3SD) en suero fue de $0,036 \mu\text{gL}^{-1}$ y el de cuantificación (promedio + 10SD) de $0,07 \mu\text{gL}^{-1}$.

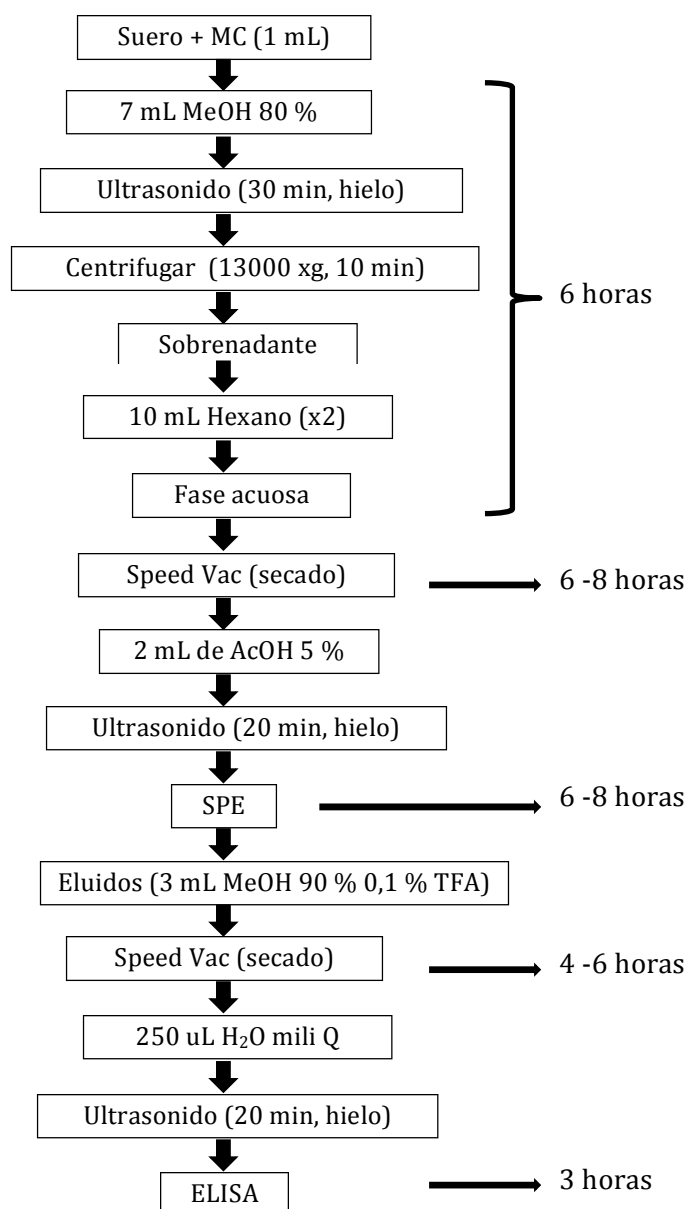


Figura 10. Esquema del protocolo desarrollado en esta tesis para la preparación de la muestra de suero animal para la determinación de microcistinas por ELISA, modificado de Heussner et al. (2014a). MC: microcistina, MeOH: metanol, AcOH: ácido acético, SPE: extracción en fase sólida, H₂O: agua. TFA: ácido trifluoroacético.

Microcistinas en suero

Utilizando el protocolo desarrollado (Figura 10) se analizaron las muestras de sangre de animales afectados (Tabla IX), reportando valores de MC en ovejas ($0,061 \pm 0,028 \mu\text{gL}^{-1}$) y en vacas ($0,050 \pm 0,017 \mu\text{gL}^{-1}$). Utilizando el límite de detección y cuantificación del método, 59 % de las muestras de sangre de animales expuestos (sueros problema) dieron valores detectables, 29 % fueron cuantificables y únicamente un 12 % resultaron por debajo del límite de detección (Tabla IX).

Tabla IX. Resultados de la determinación de microcistinas (MC) en suero de animales expuestos a fuentes de agua con presencia de floraciones. I.D.: establecimiento, fecha de obtención de la muestra y tipo de animal.

I.D.	MC (μgL^{-1}) en el extracto analizado por ELISA	MC (μgL^{-1}) en suero
C 04/02/15 S1 (oveja)	0,385	0,096
C 04/02/15 S2 (oveja)	0,445	0,111
C 04/02/15 S3 (oveja)	0,365	0,091
C 04/02/15 S4 (oveja)	0,175	0,044
C 04/02/15 S5 (oveja)	0,210	0,053
A 10/12/14 SC (vaca)	0,280	0,070
A 10/12/14 SD (vaca)	0,245	0,061
A 10/12/14 SE (vaca)	0,285	0,071
B 23/04/15 S1 (vaca)	0,150	0,038
B 23/04/15 S3 (vaca)	0,155	0,039
B 23/04/15 S4 (vaca)	0,105	0,026
B 23/04/15 S5 (vaca)	0,185	0,046
B 23/04/15 S1 (oveja)	0,150	0,038
B 23/04/15 S2 (oveja)	0,120	0,030
B 23/04/15 S3 (oveja)	0,180	0,045
B 23/04/15 S4 (oveja)	0,180	0,045
B 23/04/15 S5 (oveja)	0,240	0,060

Si bien el límite de detección para el método desarrollado fue definido en base al promedio de los sueros controles y su desviación estándar, este criterio no toma en cuenta el rango de trabajo del ensayo cuyo mínimo valor de la curva de calibración es $0,2 \mu\text{gL}^{-1}$ (correspondiente a $0,05 \mu\text{gL}^{-1}$ en suero). Por lo tanto, para el estudio estadístico de los datos se decide tomar este valor más conservador de $0,05 \mu\text{gL}^{-1}$ como límite de detección en suero. Se dividieron los resultados del análisis de las

muestras problema (Tabla IX) en 2 grupos según el resultado del extracto analizado por ELISA fuese inferior a $0,2 \mu\text{gL}^{-1}$ ($0,05 \mu\text{gL}^{-1}$ en suero, G1) o superior a este valor (G2). El análisis estadístico demostró diferencias significativas entre los 3 grupos estudiados (sueros control $n = 10$, G1 $n = 9$, G2 $n = 8$, Kruskal-Wallis, $P < 0,001$, Figura 11).

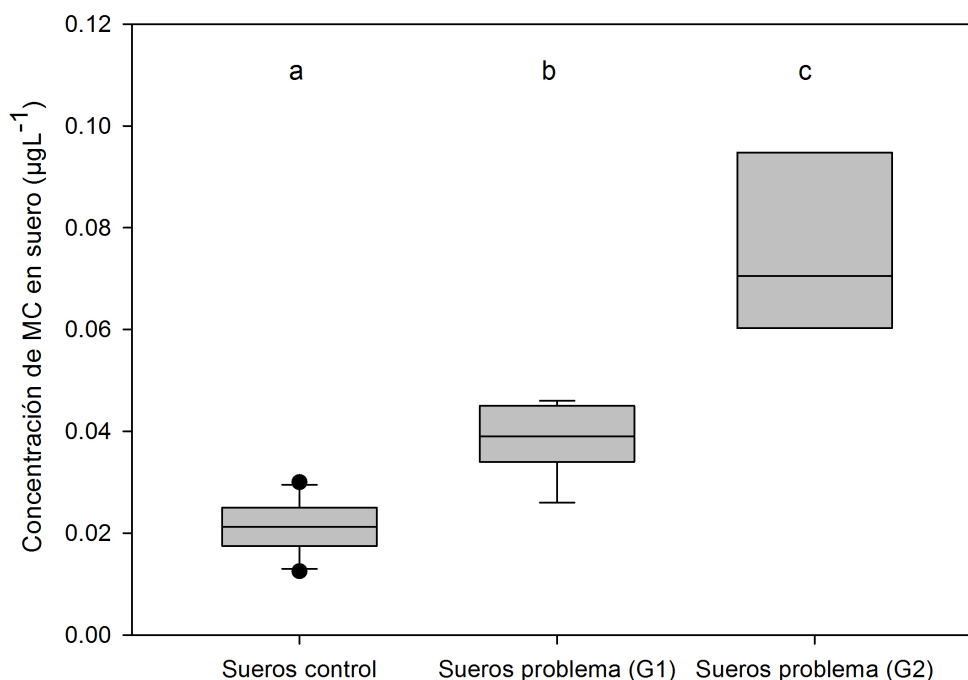


Figura 11. Box-plot de las concentraciones de MC detectadas por ELISA en suero de animales control y animales expuestos a floraciones de cianobacterias. Las cajas indican los percentiles 5% y 95%, la línea horizontal continua negra la mediana. Se indican las diferencias significativas entre grupos con letras diferentes. G1: MC en suero $< 0,05 \mu\text{gL}^{-1}$; G2: MC en suero $\geq 0,05 \mu\text{gL}^{-1}$.

Análisis conjunto de las variables estudiadas

El establecimiento C, ubicado en Rincón del Bonete, que registró los mayores resultados de microcistinas en suero (Tabla IX), presentó una mancha verde en el agua en febrero del 2015. Se detectó la presencia de *M. aeruginosa* con valores de biovolumen y clorofila *a* de 1664 mgL^{-1} y $834 \mu\text{gL}^{-1}$, respectivamente. En este sitio, la concentración de microcistinas totales en agua fue de $290 \mu\text{gL}^{-1}$. A su vez, se encontraron valores por encima de los límites superiores de referencia para las enzimas hepáticas GOT y GGT.

El análisis conjunto de nuestros datos mostró que las enzimas GOT y GGT presentaron una correlación positiva entre ellas ($r = 0,826$, $p = 0,002$). GGT fue la única enzima que

se correlacionó positivamente con la concentración de microcistinas en suero ($r = 0,619$, $p = 0,042$). Por el contrario, la concentración de la enzima FAS no se asoció a ninguna de las variables. El análisis de las concentraciones de microcistinas en suero animal y en agua muestra que, para los casos estudiados, existen diferencias significativas entre las concentraciones de microcistinas en suero de los animales que abrevan en aguas con diferentes niveles de microcistinas (Figura 12).

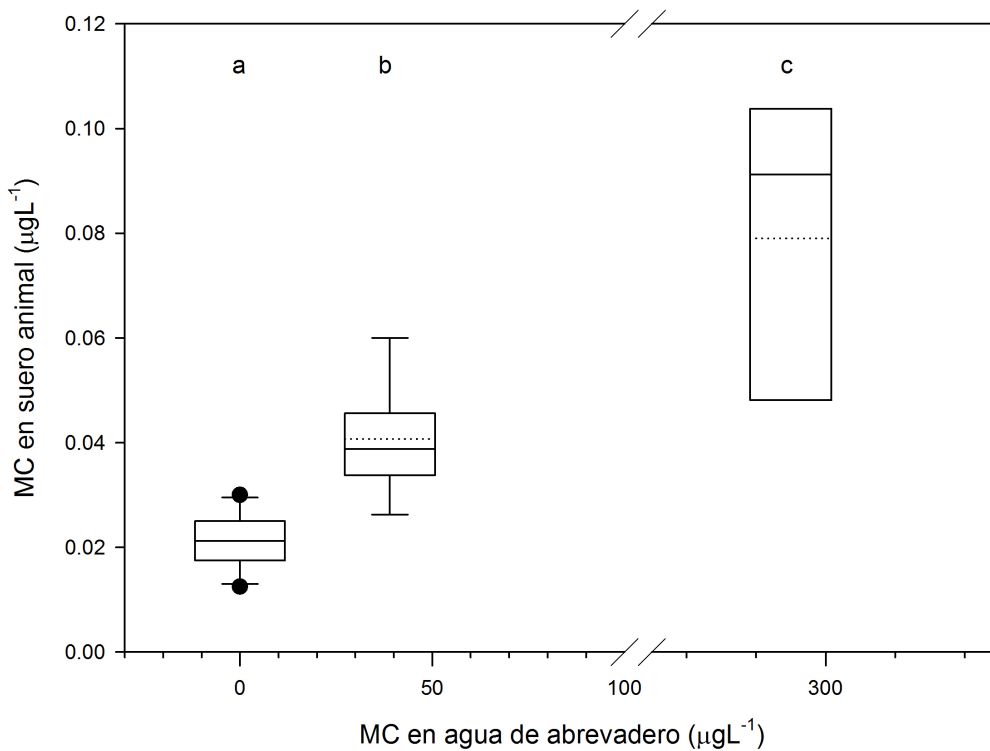


Figura 12. Box-plot de las concentraciones de MC en suero en relación a la MC en agua. Las cajas indican los percentiles 5% y 95%, la línea horizontal continua negra la mediana y la línea horizontal punteada la media. Se indican las diferencias significativas entre grupos con letras diferentes.

En la Figura 13 se observan valores de enzimas hepáticas superiores al valor de máximo de referencia aún para valores bajos de microcistinas en suero. A valores mayores de MC en suero ($0,08 \mu\text{gL}^{-1}$) todas las medidas de GOT y GGT aparecen por encima del valor superior de referencia, indicando afectación hepática.

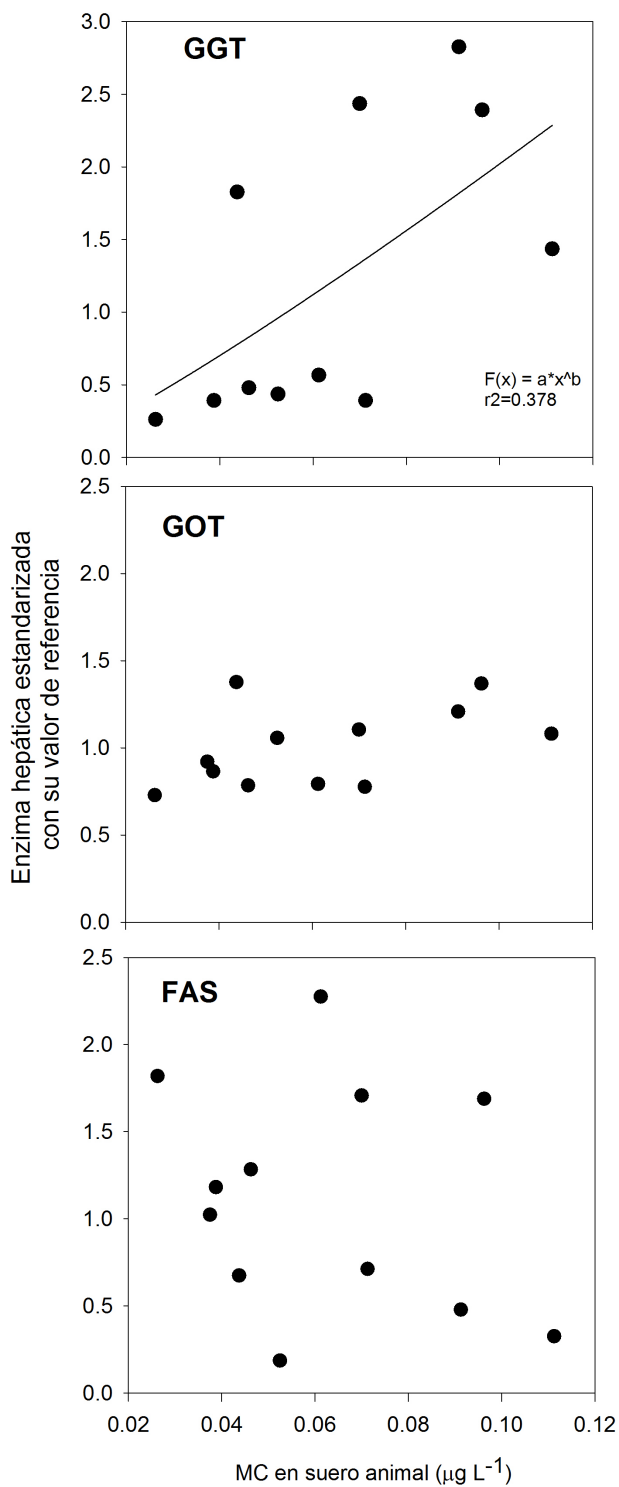


Figura 13. Concentración de enzimas GGT (arriba), GOT (medio) y FAS (abajo) estandarizadas con sus respectivos valores de referencia versus la concentración de microcistinas en suero. Los valores de enzimas por encima de 1 indican alteración hepática. Se indica el modelo de ajuste para GGT (función potencial).

A pesar de las diferencias en el consumo de agua y en el tamaño de los animales, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de microcistinas en

suero de ovejas y vacas que abrevaban en la misma fuente de agua, y que por lo tanto, consumían la misma concentración de toxinas ($p = 0,378$).

Discusión

En este estudio se pudo detectar microcistina en sangre animal, siendo resultados pioneros para el país. Se encontró que aquellos animales que bebían agua en zonas con floraciones de cianobacterias, donde se registraron concentraciones de microcistinas por encima del nivel de guía II de la OMS, presentaron niveles detectables de la toxina en sangre y fueron frecuentes los valores de enzimas hepáticas superiores a los de referencia. Esto implica que las floraciones de cianobacterias tóxicas afectan la salud del ganado que abreva en estas fuentes de agua pudiendo ocasionar impactos negativos en la producción ganadera.

La sintomatología de los animales que abrevaban en estas aguas fue escasa, presentando únicamente pérdida de peso como síntoma aparente. En la literatura se registran casos de animales con anorexia, y consecuentemente pérdida de peso, por beber agua con floraciones de cianobacterias (Galey et al., 1987, Fitzgerald et al., 1993, Puschner et al., 1998). Sólo en el establecimiento A se registraron episodios de aborto, lo que concuerda con lo observado en ovejas expuestas crónicamente a floraciones de *M. aeruginosa* (Carbis et al., 1995). Una sintomatología poco clara y poco específica hace más difícil el seguimiento de esta problemática y dificulta el diagnóstico por parte del productor o el veterinario. Diversos factores u enfermedades del ganado (como infecciones o trastornos metabólicos) pueden provocar pérdida de peso.

Enzimas hepáticas

A pesar de que algunos abrevaderos registraron valores de microcistinas que no superan el nivel de alerta II de la OMS ($20 \mu\text{gL}^{-1}$, microcistina-LR), para todos los muestreos se encontraron una o más enzimas hepáticas alteradas. La mayoría de casos en la literatura que llevaron a cabo análisis de enzimas hepáticas registraron alteraciones en al menos una de las enzimas estudiadas (DeVries et al., 1993, Frazier et al., 1998, Sebbag et al., 2013), implicando que las enzimas hepáticas pueden ser

indicadores de alteraciones asociadas a la presencia de microcistinas en el agua del ganado.

Los resultados encontrados en este estudio son esperables para casos de exposición crónica ya que no se observaron valores extremadamente altos de las enzimas hepáticas (como GOT > 23.000 UL⁻¹ (De Vries et al., 1993)), y además, no se reportaron casos de muerte. Durante una exposición crónica no necesariamente debe encontrarse una alteración hepática marcada, esto va a depender de la concentración de microcistina consumida, del estado fisiológico del organismo que ingiere la toxina, del período de exposición, entre otros (Fawell et al., 1994). Cuando los animales afectados crónicamente se mueven a potreros con fuentes de agua limpia las enzimas hepáticas deberían descender a valores normales en un periodo de 1 a 3 semanas (Carbis et al., 1995).

Las enzimas hepáticas son marcadores inespecíficos, por lo tanto diversas causas pueden inducir su alteración (Henry, 2010). Para nuestro estudio, se deben descartar dos factores capaces de generar una hepatopatía con sintomatología similar a la de una intoxicación por cianobacterias, éstos son la presencia de parásitos en el organismo del animal, como la *Fasciola hepática* (Mussart et al., 2009, Rodríguez et al., 2015), y la presencia de la planta *Lantana camara* en los predios donde se encuentra el ganado (Rivero et al., 2011). Los productores de los establecimientos estudiados declaran que la planta no se encontraba en el lugar donde estaban los animales afectados, y únicamente el establecimiento A realizó el análisis para *Fasciola hepática*, el cual dio negativo. Las enzimas hepáticas se pueden cuantificar mediante un análisis rápido y de bajo costo que pueden servir como una orientación para determinar si los animales se encuentran frente a una posible intoxicación por cianobacterias. Debido a su baja especificidad deben ir acompañados de otros análisis que descarten otras causas de alteración hepática. Por otra parte, que los valores de las enzimas hepáticas estén dentro del rango de referencia no implica que los animales no consuman hepatotoxinas en los abrevaderos. Por lo tanto, se destaca que a pesar de haber estudiado casos que se podrían clasificar como de exposición crónica, fue posible detectar cambios en las enzimas hepáticas, sugiriendo que es una variable a tener en

cuenta a la hora de realizar un seguimiento del animal.

Puesta a punto para la detección de microcistinas en suero por ensayo ELISA

Por primera vez en el país se realizó la puesta a punto de una técnica modificada para optimizar la extracción de microcistinas y su posterior detección por ELISA en suero de animales. Existen diversas ventajas al utilizar el suero como material de partida, ya que es una matriz de fácil obtención y poco invasiva para el animal. A su vez, permite acceder a un pronóstico temprano de la evolución del animal (48 horas de análisis) y brinda la posibilidad de tomar medidas de manejo antes de que ocurra una fatalidad. En contraparte, el suero comprende una matriz muy compleja que requiere sucesivas etapas de extracción y preparación de la muestra previo al análisis, lo cual puede comprometer la recuperación de microcistinas en esta matriz. A esto se le suma la baja concentración de microcistinas detectadas en suero por distintos grupos de investigación hasta la fecha (Soares et al., 2006, Hilborn et al., 2013, Manubolu et al., 2014), que podría explicarse por mecanismos de detoxificación y eliminación que se desencadenan en el organismo una vez ingerida la toxina (Ferrão-Filho et al., 2011).

Existen pocos antecedentes sobre determinación de microcistinas en suero humano o animal. En la tragedia ocurrida en Caruaru (Brasil), se analizaron sueros humanos utilizando distintas preparaciones de muestra y distintos métodos (ELISA, LC-MS, GC-MS) (Heussner et al., 2014a), registrando valores promedio de $2,2 \mu\text{gL}^{-1}$ de microcistinas en el suero de los pacientes (Carmichael et al., 2001). Concentraciones de $0,16$ a $0,96 \mu\text{gL}^{-1}$ fueron medidas en el suero de pacientes de hemodiálisis durante una exposición subletal a microcistinas en Río de Janeiro, Brasil (Soares et al., 2006, Hilborn et al., 2013). Existe un único trabajo científico, realizado en vacas en Finlandia, que detecta y cuantifica microcistinas en suero ($0,12$ a $0,32 \mu\text{gL}^{-1}$) por la técnica de ELISA (Manubolu et al., 2014). Es más común encontrar en la literatura casos que miden concentración de microcistinas en tejidos animales como hígado y/o riñones (Nasri et al., 2008, Nonga et al., 2011, Doster et al., 2014) debido a la presencia de transportadores de membrana de la familia OATp (polipéptidos transportadores de ácidos orgánicos) en estos y otros órganos. Esto hace que la concentración de la toxina en la sangre disminuya rápidamente y aumente en los tejidos, donde una vez en el

interior de las células, la microcistina se une covalentemente a proteínas del citosol resultando en la retención de la misma en el tejido (EPA, 2015). A pesar de la baja concentración de la toxina en sangre, el método desarrollado en este estudio es capaz de detectar la microcistina en suero de animales afectados, utilizando poco volumen de muestra y a un bajo costo. La posibilidad de detectar la toxina en sangre, utilizada por un solo trabajo en la literatura (Manubolu et al., 2014), es una herramienta útil para determinar causalidad frente a deterioros en la salud animal por exposición a cianobacterias hepatotóxicas, y además, nos permite controlar la salud animal de una manera no invasiva.

Microcistinas en suero

Del total de muestras analizadas, el 47 % presentaron concentraciones de microcistinas en la sangre del animal mayores que $0,05 \mu\text{gL}^{-1}$, siendo el primer registro de detección de la toxina en sangre en nuestro país. Las concentraciones de microcistinas detectadas (entre $0,053 - 0,111 \mu\text{gL}^{-1}$) en nuestro trabajo se asemejan a otros resultados encontrados en bovinos de Finlandia (Manubolu et al., 2014), a pesar de que las concentraciones de microcistinas detectadas en nuestras aguas son de uno o dos órdenes de magnitud mayores que las halladas en ese estudio ($7,5 \mu\text{gL}^{-1}$ de MC, Manubolu et al., 2014). Aunque la vía de exposición para el ganado en nuestro trabajo es la oral, no se puede descartar la posibilidad de que las microcistinas detectadas en sangre también correspondan a períodos previos de mayor exposición y se trate de una liberación de microcistinas unidas previamente a proteínas en el hígado. Un estudio realizado en pacientes de diálisis, registró concentraciones detectables de microcistinas en el suero hasta 57 días luego de la última exposición a la toxina, probablemente proveniente de su liberación desde el hígado (Soares et al., 2006). Por lo tanto, deben realizarse análisis conjuntos de microcistinas en agua y en suero para poder determinar si la causa de la afectación animal es el consumo de microcistinas presentes en el agua de abrevadero.

Análisis conjunto de las variables estudiadas

Los resultados de este estudio son pioneros y no se han encontrado equivalentes en la literatura internacional. Por lo tanto, nuestros resultados revelan una problemática

desconocida para el país desde una perspectiva innovadora integrando diversas técnicas de análisis en agua y en los animales. Analizando nuestros datos se evidenció que a mayor concentración de microcistinas en agua, mayor es la concentración de la toxina en suero del animal intoxicado, lo que concuerda con lo registrado en el estudio de ganado bovino en Finlandia (Manubolu et al., 2014). La enzima GGT fue la única que presentó una asociación positiva significativa con la concentración de microcistinas en sangre, si bien en la literatura no se describen correlaciones de este tipo, los dos casos bibliográficos que miden esta enzima encuentran valores superiores al nivel de referencia máximo (Galey et al., 1987, Carbis et al., 1995). El único caso en la literatura que estudia concentración de microcistinas en suero y enzimas hepáticas no realizó análisis de correlación ni encontró enzimas hepáticas significativamente elevadas a pesar de detectar la hepatotoxina en suero (Manubolu et al., 2014).

En este estudio no se detectaron diferencias significativas en la concentración de microcistinas presentes en suero de para animales diferentes (vacas y ovejas) que abrevaban en la misma fuente de agua, independientemente del tamaño del animal y la cantidad de agua que consumían. Sin embargo, según experimentos en condiciones controladas de dosificación de toxina, los animales de mayor tamaño necesitan mayores concentraciones de microcistinas para morir (Konst et al., 1965). Por lo tanto, podría existir un umbral de saturación de los mecanismos de detoxificación (Ferrão-Filho et al., 2011), que dependa del tamaño del animal y sea determinante en la supervivencia a la intoxicación.

Discusión general

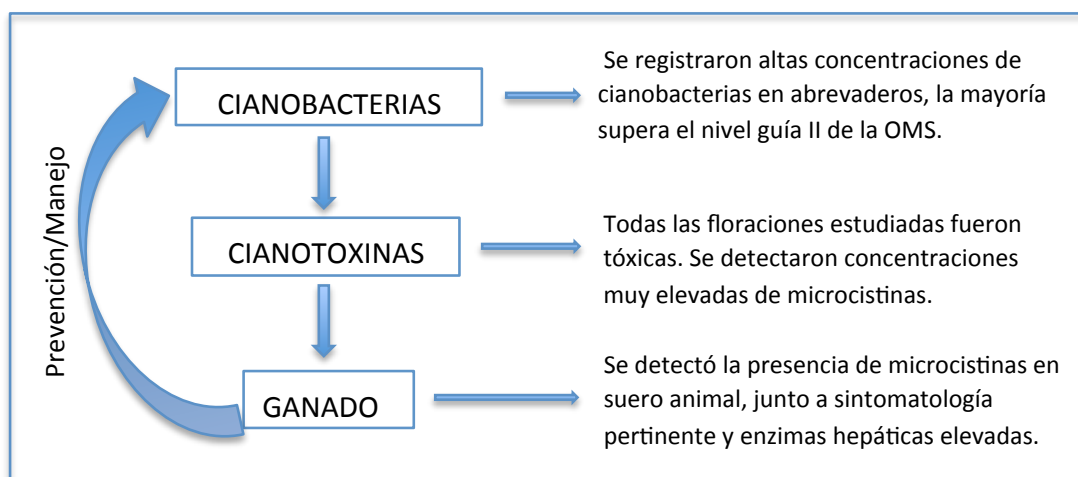


Figura 14. Aproximación metodológica de la tesis a la problemática indicando los resultados encontrados en cada etapa.

En el esquema general de la Figura 14 se resume lo hallado en esta tesis sobre la problemática de estudio para la cuenca del Río Negro. Debido a la frecuencia de la presencia de cianobacterias productoras de cianotoxinas en el agua de los embalses del Río Negro (Capítulo 1), es conveniente realizar actividades de monitoreo para alertar a la población y prevenir riesgos a la salud humana y animal. Si bien se descartó en este estudio el uso de los bioensayos como herramienta rápida de detección de toxicidad en el agua, los indicadores cuantitativos de cianobacterias sí son de utilidad para determinar la peligrosidad potencial de estas floraciones. Las muestras analizadas reportaron valores de abundancia, biomasa y de microcistinas que superaron en algunos casos, en varios órdenes de magnitud, el nivel guía II de la OMS para dichas variables, señalando a estos sitios como de alta peligrosidad para ser utilizados como agua de abrevadero. Las floraciones de cianobacterias tóxicas en los embalses del Río Negro son un fenómeno frecuente que denota condiciones de eutrofización de difícil resolución. Se detectó la presencia de microcistinas en el suero de animales que bebían agua proveniente de los embalses contaminados con cianobacterias tóxicas, conjuntamente con valores alterados de enzimas hepáticas (Capítulo 3). La puesta a punto de un método de detección de MC en sangre rápido, de bajos costos y de tipo “screening” puede ser útil a la hora de complementar el seguimiento de otros síntomas del ganado afectado. La asociación entre la MC en agua

de abrevadero y las alteraciones de las enzimas hepáticas, sintomatología general y MC en suero animal, develan que las floraciones de cianobacterias son una problemática real en el Uruguay para la ganadería. Esto es corroborado por los casos históricos recabados para el país de muerte de ganado asociados a intoxicación por cianobacterias productoras de toxinas (Capítulo 2). Esta es una problemática escasamente comprendida pero potencialmente grave ya que puede afectar directamente la producción ganadera provocando pérdidas económicas significativas. Los resultados de esta tesis son insumos claves para tomar medidas necesarias para prevenir el impacto negativo en este rubro de exportación.

Consideraciones y recomendaciones sobre la problemática para la producción del país

Durante la ejecución de la tesis, y en particular del Capítulo 2, se evidenció desconocimiento de la temática a nivel de productores rurales, técnicos, asociaciones rurales y organismos gubernamentales. Debido a la falta de conocimiento sobre este tema, seguramente existan casos de intoxicación que pasan desapercibidos o se confunden con enfermedades parasitarias (Fasciolosis) o intoxicaciones con plantas.

De acuerdo a los registros de floraciones a nivel país (Bonilla et al., 2015) y el mapa de regiones de actividades productivas (Figura 1, pág. 9), se pueden evidenciar zonas de mayores riesgos para la salud animal. Estas zonas comprenderían la región del Río Negro, el litoral oeste al norte (Salto y Paysandú) y el litoral oeste al sur (Colonia y San José). Las zonas de riesgo también se deben definir según el tipo de fuente de agua que se utiliza. En aquellos casos en que se recurra al Río Negro o a embalses eutrofizados, la presencia de altas concentraciones de toxina es un peligro potencial. Si bien puede ser una problemática generalizada en zonas ganaderas a nivel país, la muerte o pérdida de productividad (ejemplo: bajo peso, abortos, debilidad) de animales debido a intoxicaciones con hepatotoxinas probablemente no afecten de manera significativa la economía del país pero sí la del productor, ya que éste no solo pierde el animal en caso de muerte sino también toda la inversión realizada durante el proceso de cría. Los animales pequeños son más vulnerables a verse afectados o a morir por exposición a toxinas. Los terneros de carne < 140 kg tienen un valor en el mercado mayor que los novillos > 360 kg (2,13 y 1,46 dólares americanos para

terneros y novillos respectivamente, fuente: ACG), y por lo tanto puede afectar económicamente al productor justamente en el animal de mayor valor por kilo. Otro problema asociado es el efecto de la exposición crónica de los animales a las floraciones ya que, como se mencionó en el Capítulo 2 y 3, distintos tejidos (hígado, riñón, ente otros) pueden acumular microcistinas a lo largo del tiempo sin causar la muerte del animal. Sin embargo, aún no existen estudios en el país que hayan explorado la presencia de microcistinas en estos tejidos. Se dispone de un procedimiento validado por HPLC para la determinación de microcistinas en músculo de pez (Simoens, 2015), cuya adaptación a músculo o/y otros tejidos de ganado podría ser útil para la evaluar la calidad de los cortes de carne para exportación. Una disminución de la calidad de nuestro producto a nivel mundial pondrían al país en dificultades para expandirse a nuevos mercados y mantener las relaciones existentes con los mercados actuales.

Para evitar esta situación es necesario incorporar un plan de monitoreo que alerte al productor para que retire el ganado del acceso a aguas de abrevadero contaminadas con cianobacterias tóxicas. Un protocolo de acción puede estar basado en una serie de medidas preventivas simples, de bajos costos, bien interconectadas y complementarias que redunden en una mejora del manejo del ganado. Además, se debería contrarrestar la falta de información con capacitaciones dirigidas al personal técnico del sector agropecuario, con talleres informativos para productores y personal de los establecimientos, con la participación de medios de difusión (revistas agropecuarias), y fundamentalmente, con instancias de intercambio entre la comunidad científica, las organizaciones rurales y las organizaciones gubernamentales relacionadas con la temática. Estas últimas son las encargadas de establecer políticas adecuadas para la prevención y mitigación de la situación, además de promover campañas de concientización y gestionar el manejo de la información y brindar atención a la población involucrada.

A la hora de establecer un árbol de decisión dirigido a productores rurales para el manejo del ganado frente a una floración de cianobacterias, a partir de los resultados de esta tesis, nosotros sugerimos trabajar en 3 niveles de complejidad creciente

(Figura 15). El primer nivel surge de las observaciones que el productor y el personal puedan efectuar en el agua de abrevadero (observación visual simple) y en el ganado del establecimiento. Se sugiere controlar la aparición de sintomatología del animal como debilitamiento sin causa aparente (Figura 15). El segundo nivel se basa en la utilización de un equipo sencillo (fluorómetro) para medir fluorescencia *in vivo* de pigmentos (en particular la ficocianina que indica la presencia de cianobacterias) en el agua de abrevadero. La determinación de enzimas hepáticas (GOT y GGT) en el ganado también se sugiere en este nivel, para lo cual existen diversos laboratorios veterinarios disponibles para realizar los análisis. Se debe observar el terreno para descartar la presencia de plantas tóxicas y acompañar el seguimiento con otra información veterinaria como la presencia de parásitos. El tercer nivel involucra análisis más complejos y costosos, donde los resultados no son inmediatos, y además, requieren de personal especializado para su ejecución (Figura 15), pero permitirían detectar la toxina en la sangre de los animales.

		AGUA	GANADO
+ Nivel de complejidad	1er Nivel	<ul style="list-style-type: none"> • Color • Turbidez • Olor • Mancha verde 	<ul style="list-style-type: none"> • Perdida de Peso • Letargo • Astenia • Inapetencia • Dificultad para respirar
	2do Nivel	<ul style="list-style-type: none"> • Clorofila • Ficocianina (medidos <i>in vivo</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas hepáticas
	3er Nivel	<ul style="list-style-type: none"> • Clorofila <i>a</i> por extracción • Recuento de células • <u>Biovolumen</u> • Microcistinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Microcistinas

Figura 15. Variables sugeridas a medir en un protocolo de prevención, separados según nivel de complejidad que pueden ser insumos para establecer un árbol de decisión dirigido a productores rurales para el manejo del ganado frente a una floración de cianobacterias.

Productos de esta tesis:

- Font E. 2014. Cianotoxinas en abrevaderos: peligrosidad y efectos negativos

para el ganado. Jornadas Interdisciplinarias de Biodiversidad y Ecología. Rocha, Uruguay.

- Font E. 2015. Cianobacterias en abrevaderos y su posible efecto sobre el ganado. Primeras jornadas sobre eutrofización y floraciones algales nocivas (FAN) en el Río Uruguay. Colón, Argentina.
- Font E. Muerte de vacunos por cianotoxinas: La única cura sigue siendo la prevención. Revista Comunicación CREA 46: 77-9. (ISSN: 1688-8839).
- Los otros resultados de la tesis se utilizarán como insumo para una publicación en revista científica internacional indexada.

Conclusiones

1. Los indicadores cuantitativos de cianobacterias son buenos predictores de la toxicidad de una floración, por lo tanto son elementos fundamentales a tener en cuenta a la hora de establecer planes de manejo.
2. Valores similares de los indicadores cuantitativos de cianobacterias se han registrado en otras cuencas del país, por lo tanto, estamos frente a una problemática de carácter nacional.
3. Existe una alta probabilidad de que los casos de intoxicación animal por microcistinas estén siendo subestimados debido al desconocimiento general sobre la temática.
4. Las enzimas hepáticas son útiles para evaluar una intoxicación por microcistinas pero no suficientes para establecer causalidad, ya que son inespecíficas y se ven alteradas por otros factores que afecten al hígado.
5. Fue posible poner a punto una metodología nueva para el país, simple, de bajos costos y sensible que permite la cuantificación de microcistinas en suero animal por ELISA, siendo útil para determinar exposición oral de un animal al tóxico.
6. La concentración de microcistinas en suero del animal fue mayor a mayor concentración de la toxina en el agua de abrevadero.
7. La muerte o afectación de ganado por beber agua con floraciones tóxicas puede generar pérdidas económicas para productores y para el país.

8. Debido al desconocimiento de la problemática la primer línea de acción a nivel país debería enfocarse hacia una mayor divulgación de información, interacción y capacitación de todos los sectores involucrados.
9. Para prevenir la muerte o afectación de los animales se sugieren medidas en tres niveles de complejidad para crear un protocolo de acción dirigido a productores rurales.

Bibliografía

- ACG (Asignación de Consignatarios de Ganado) <http://www.acg.com.uy/facebook/index.php> (último acceso: 21/05/2016).
- Alonzo P, Collazo S, De León L, Paullier C. 2009. Diagnóstico de intoxicación por algas verde-azuladas (cianobacterias) en Uruguay. En: Jornadas Uruguayas de Buiatría, 37. Paysandú (Uruguay): Centro Médico Veterinario de Paysandú. p. 142-3.
- Asselman J, Hochmuth J, De Schampheleere K. 2014. A comparison of the sensitivities of *Daphnia magna* and *Daphnia pulex* to six different cyanobacteria. *Harmful Algae* 39: 1-7.
- Azevedo S, Carmichael W, Jochimsen E, Rinehart K, Lau S, Shaw G, Eaglesham G. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181-182: 441-6.
- Beamud S, Vico P, Haakonsson A, Martínez de la Escalera G, Piccini C, Brena B, Pírez M, Bonilla S. 2016. Influence of UV-B radiation on the fitness and toxin expression of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia* 763: 161-72.
- Beattie K, Kaya K, Sano T, Codd G. 1998. Three dehydrobutyrine-containing microcystins from *Nostoc*. *Phytochemistry* 47: 1289-92.
- Blom J, Robinson J, Juttner F. 2001. High grazer toxicity of [D-Asp(3)(E)Dhb(7)]microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon* 39: 1923-32.
- Bonilla S. 2009. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de monitoreo. Montevideo: UNESCO. PHI-VII (Documento técnico 16).
- Bonilla S, Haakonsson S, Somma A, Gravier A, Britos A, Vidal L, De León L, Brena B, Pírez M, Piccini C, Martínez de la Escalera G, Chalar G, González-Piana M, Martigani F, Aubriot L. 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *Innotec* 10: 9-22.
- Brena B, Díaz L, Sierra D, Ferrari G, Ferraz N, Hellman U, Gonzalez-Sapienza G, Last J. 2006. ITREOH building of regional capacity to monitor recreational water:

development of a non-commercial microcystin ELISA and its impact on public health policy. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 12(4): 377-85.

- Briand J, Jacquet S, Bernard C, Humbert J. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34: 361-77.
- Carbis C, Waldron D, Mitchell G, Anderson J, McCauley I. 1995. Recovery of hepatic function and latent mortalities in sheep exposed to the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary Record* 137: 12-5.
- Carmichael W, Azevedo S, An J, Molica R, Jochimsen E, Lau S, Rinehart K, Shaw G, Eaglesham G. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109(7): 663-8.
- Chalar G, Fabian D, Gonzalez-Piana M, Delbene L. 2012. Caracterización limnológica de los embalses del Río Negro durante el período Setiembre 2009 – Junio 2011. Convenio UTE-Facultad de Ciencias. <http://limno.fcien.edu.uy> (último acceso 26/06/2016).
- Chalar G, Gerhard M, Gonzalez-Piana M, Fabian D. 2014. Hidroquímica y eutrofización en tres embalses subtropicales en cadena. En: Marcovecchio J, Botté S, Freije R (Eds.), *Procesos geoquímicos superficiales en Sudamérica*. Salamanca: Nueva Graficesa. p. 121-48.
- Chalar G, Fabian D, Gonzalez-Piana M, Piccardo A. 2015. Estado y evolución de la calidad de agua de los tres embalses del Río Negro. Período Setiembre 2011 – Marzo 2015. Convenio UTE-Facultad de Ciencias. <http://limno.fcien.edu.uy> (último acceso 26/06/2016).
- Chorus, I. 2012. *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Dessau-Roßlau: Federal Environment Agency.
- Chorus I, Bartram J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health Consequences, monitoring and Management*. Londres: E & FN Spon.
- Claro R, Noste J, D'Esposito R. 2010. Intoxicación por algas verdeazuladas (*Microcystis* spp.) en bovinos del Departamento gral. Ortiz de Ocampo, de la zona

de los Llanos Riojanos. Sitio Argentino de Producción Animal. http://www.produccion-animal.com.ar/agua_bebida/00-agua_bebida.htm, Nº 93, (último acceso 18/05/2016).

- Codd G, Azevedo S, Bagchi S, Burch M, Carmichael W, Harding W, Kaya K, Utkilen H. 2005. CYANONET. A global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management. Paris: UNESCO. IHP-VI. (Documento técnico 76).
- Conde D, Paradiso M, Gorga J, Brugnoli E, De León L, Mandiá M. 2002. Problemática de la calidad de agua en el sistema de grandes embalses del Río Negro (Uruguay). CIER 39: 51-68.
- Costas E, López Rodas V. 2006. Cianobacterias tóxicas y mortandades masivas en el Parque Nacional de Doñana: Red de alerta temprana y estrategias de gestión. En: Proyectos de investigación parques nacionales: 2003-2006. p. 67-75. <http://www.magrama.gob.es/es/parques-nacionales-oapn/programa-investigacion/2003-2006.aspx> (último acceso 18/05/2016)
- De León L, Yunes J. 2001. First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River, South America. Environmental Toxicology and Water Quality 16(1): 110-2.
- DeVries S, Galey F, Namikoshi M, Woo J. 1993. Clinical and pathological findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a dog. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 5(3): 403-8.
- Dietrich D, Hoeger S. 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? Toxicology and applied pharmacology 203(3): 273-89.
- Dietrich D, Fischer A, Michel C, Hoeger S. 2008. Toxin mixture in cyanobacterial blooms — a critical comparison of reality with current procedures employed in human health risk assessment. Chapter 39. En Hudnel H (Ed.), Cyanobacterial harmful algal blooms: state of science and research needs. New York: Springer. p 885-913.
- Dörr F, Pinto E, Soares R, Azevedo S. 2010. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. Toxicon 56(7): 1247-56.

- Doster E, Chislock M, Roberts J, Kottwitz J, Wilson A. 2014. Recognition of an important water quality issue at zoos: prevalence and potential threat of toxic cyanobacteria. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 45(1): 165-8.
- Duarte, E. 2011. Uso del agua en establecimientos agropecuarios. Sistema de abrevadero. *Revista Plan Agropecuario* 139: 52-5.
- Environmental Protection Agency (EPA) 2015. Health effects support document for the cyanobacterial toxin microcystins. Washington: U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water, Health and Ecological Criteria Division (4304T).
- Falconer I, Jackson R, Langley J, Runnegar M. 1981. Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Australian Journal of Biological Sciences* 34(2): 179–88.
- Fawell J, James C, James H. 1994. Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. Report No. FR 0359/2/DOE 3358/2 Foundation for Water Research, Marlow, UK. p. 1-46.
- Ferrão-Filho A, Kozłowsky-Suzuki B. 2011. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Marine Drugs* 9(12): 2729-72.
- Fitzgerald S, Poppenga R. 1993. Toxicosis due to microcystin hepatotoxins in three Holstein heifers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5(4): 651-3.
- Frazier K, Colvin B, Styer E, Hullinger G, Garcia R. 1998. Microcystin toxicosis in cattle due to overgrowth of blue-green algae. *Veterinary and Human Toxicology*. 40(1): 23-4.
- Freitas de Magalhães V, Soares R, Azevedo S. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39(7): 1077-85.
- Galey F, Beasley V, Carmichael W, Kleppe G, Hooser S, Haschek W. 1987. Blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) hepatotoxicosis in dairy cows. 48(9): 1415-20.
- González-Piana M, Fabian D, Delbene L, Chalar G. 2011. Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Río Negro reservoirs, Uruguay. *Harmful algae news* 43: 16-7.

- GTM. Ganadería Tres Millones. <http://www.gtm.org.uy/tablapesosfictos.html>, último acceso 03/05/2016.
- Halderen A, Harding W, Wessels J, Schneider D, Heine E, Van der Merwe J, Fourie J. 1995. Cyanobacterial (blue-green algae) poisoning of livestock in the western cape province of South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 66(4): 260-4.
- Hallegraef G. 1992. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Marine Pollution Bulletin* 25: 186-90.
- Handeland K, Østensvik Ø. 2010. Microcystin poisoning in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Toxicon* 56(6): 1076-8.
- Harding W, Rowe N, Wessels J, Beattie K, Codd G. 1995. Death of a dog attributed to the cyanobacterial (blue-green algal) hepatotoxin nodularin in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 66(4): 256-9.
- Henry J. 2010. *El laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. Madrid: Marbán
- Heussner A, Winter I, Altaner S, Kamp L, Rubio F, Dietrich D. 2014a. Comparison of two ELISA-based methods for the detection of microcystins in blood serum. *Chemico-Biological Interactions* 223: 10-7.
- Heussner A, Altaner S, Kamp L, Rubio F, Dietrich D. 2014b. Pitfalls in microcystin extraction and recovery from human blood serum. *Chemico-Biological Interactions* 223: 87-94.
- Hilborn E, Soares R, Servaites J, Delgado A, Magalhães V, Carmichael W, Azevedo S. 2013. Sublethal microcystin exposure and biochemical outcomes among hemodialysis patients. *PLOS ONE* 8(7): 1-9.
- Hillebrand H, Dürselen C, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403-24.
- ISO 20179:2005. Water quality. Determination of microcystins. Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection.
- James K, Sherlock I, Stack M. 1997. Anatoxin-a in Irish freshwaters and cyanobacteria, determined using a new fluorometric liquid chromatographic method. *Toxicon* 35: 963-71.

- Kaebernick M, Neilan B. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 1-9.
- Kerr L, McCoy C, Eaves D. 1987. Blue-green algae toxicosis in five dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191(7): 829-30.
- Konst H, McKercher P, Gorham P, Robertson A, Howell J. 1965. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science* 29(9): 221-8.
- 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. 2012. Avian high-dose toxicity of cyanobacterial biomass. *Neuroendocrinology Letters* 33: 161-5.
- Krienitz L, Ballot A, Kotut K, Wiegand C, Pütz S, Metcalf J, Codd G, Pflugmacher S. 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology* 43(2): 141-8.
- Lagos N, Onodera H, Zagatto P, Andrinolo D, Azevedo A, Oshima Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-73.
- Lampert W, Sommers U. 2007. *Limnoecology*. Second edition. The ecology of lakes and streams. New York: Oxford University Press Inc.
- Lang-Yona N, Lehahan Y, Herut B, Burshtein N, Rudich Y. 2014. Marine aerosol as a possible source for endotoxins in coastal areas. *Science of the Total Environment* 499: 311-8.
- Li R, Carmichael W, Brittain S, Eaglesham G, Shaw G, Liu Y, Watanabe M. 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37: 1121-6.
- López-rodas V, Costas E. 1999. Preference of mice to consume *Microcystis aeruginosa* (toxin-producing cyanobacteria): A possible explanation for numerous fatalities of livestock and wildlife. *Research in Veterinary Science* 67(1): 107-10.

- Lüring M. 2003. Daphnia growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography* 48(6): 2214-20.
- Lüring M, Faassen E. 2013. Dog Poisonings Associated with a *Microcystis aeruginosa* Bloom in the Netherlands. *Toxins* 5(3): 556-67.
- Main D, Berry P, Peet R, Robertson J. 1977. Sheep mortalities associated with the blue Green alga *Nodularia spumigena*. *Australian Veterinary Journal* 53: 578-81.
- Mancini M, Rodríguez C, Bagnis G, Liendo A, Prospero C, Bonansea M, Tundisi J. 2010. Cyanobacterial bloom and animal mass mortality in a reservoir from Central Argentina. *Brazilian Journal of Biology* 70(3): 841-5.
- Manubolu M, Eklund S, Dutta P, Malmjöf K. 2014. Variable exposure and responses to cyanotoxins in cattle grazing on pastures in the coastal zone of the Baltic Sea: a field study. *International Journal of Environmental Research* 8(3): 733-40.
- Matsunaga H, Farada K, Senma M, Ito Y, Yasuda N, Ushida S, Kimura Y. 1999. Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond Nishinomiya, Japan: sudden appearance of toxic cyanobacteria. *Natural Toxins* 7: 81–84.
- Mc Barron E, May V. 1966. Poisoning of sheep in New South Wales by the blue-green alga *Anacystis cyanea* (Kuetz.) Dr. and Dail. *Australian Veterinary Journal* 42(12): 449-53.
- MGAP. 2013. Uruguay Rural en cifras (DIEA). <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,86,O,S,0,MNU;E;2;16;10;8;MNU> (último acceso 18/05/2016).
- MGAP. 2015. Regiones agropecuarias del Uruguay (DIEA). <http://www.mgap.gub.uy/dieaanterior/regiones/Regiones2015.pdf> (último acceso 18/05/2016).
- Miller M, Kudela R, Mekebri A, Crane D, Oates S, Tinker M, Staedler M, Miller W, Toy-Choutka S, Dominik C, Hardin D, Langlois G, Murray M, Ward K, Jessup D. 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLOS ONE* 5(9): 1-11.

- Mussart N, Coppo J. 2009. Indicadores sanguíneos de daño hepático en novillos cruza cebú parasitados por *Fasciola hepatica*. Revista Veterinaria 20(2): 81-5.
- Nascimento S, De Oliveira F, Azevedo S. 1999. Changes in cellular components in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. salina) subjected to different N/P ratios - an ecophysiological study. Environmental Toxicology 14: 37-44.
- Nasri H, El Herry S, Bouaïcha N. 2008. First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira, Algeria. Ecotoxicology and Environmental Safety 71(2): 535-44.
- Nonga H, Sandvik M, Miles C, Lie E, Mdegela R, Mwamengele G, Semuguruka W, Skaare J. 2011. Possible involvement of microcystins in the unexplained mass mortalities of Lesser Flamingo (*Phoeniconaias minor* Geoffroy) at Lake Manyara in Tanzania. Hydrobiologia 678(1): 167-78.
- Odriozola E, Ballabene N, Salamano A. 1984. Poisoning of cattle by blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*). Revista Argentina de Microbiología 16(4): 219-24.
- Otten T, Paerl H. 2015. Health effects of toxic cyanobacteria in U.S. drinking and recreational waters: our current understanding and proposed direction. Current Environmental Health Reports 2(1): 75-84.
- Oudra B, Loudiki M, Sbiyyaa B, Martins R, Vasconcelos V, Namikoshi N. 2001. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco). Toxicon 39: 1375-81.
- Paerl H. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. American Society of Limnology and Oceanography 3: 823-47.
- Paerl H. 1996. Microscale physiological and ecological studies of aquatic cyanobacteria: macroscale implications. Microscopy Research and Technique 33(1): 47-72.
- Piccini C, Aubriot L, Fabre A, Amarala V, González-Piana M, Giani A, Figueredo C, Vidal L, Kruk C, Bonilla S. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. Harmful Algae 10(6): 644-53.

- Pineda-Mendoza R, Olvera-Ramírez R, Martínez-Jerónimo F. 2012. Microcystins produced by filamentous cyanobacteria in urban lakes. A case study in Mexico City. *Hidrobiológica* 22(3): 290-8.
- Pirez M, Gonzalez-Sapienza G, Sienna D, Ferrari G, Last M, Last J, Brena B. 2013. 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* 114: 63-71.
- Poste A, Hecky R, Guildford S. 2013. Phosphorus enrichment and carbon depletion contribute to high *Microcystis* biomass and microcystin concentrations in Ugandan lakes. *Limnology and Oceanography* 58(3): 1075-88.
- Puschner B, Galey F, Johnson B, Dickie C, Vondy M, Francis T, Holstege D. 1998. Blue-green algae toxicosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213(11): 1605-7.
- Quesada A, Sanchis D, Carrasco D. 2004. Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? *Limnetica* 23(1-2): 109-18.
- Rivero R, Giannechini E, Matto C, Gil J. 2011. Intoxicación por *Lantana camara* en bovinos y ovinos en Uruguay. *Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay* 47(181): 29-34.
- Rodríguez J, Barrios-Arpi M, Lopez-Torres B, Lucas J, Arana C, González-Gustavson E, Espinoza J, Casas E, Ceferino H. 2015. Cambios en el perfil bioquímico hepático de alpacas positivas a huevos de *Fasciola hepatica*. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 9(1): 10-21.
- Saker M, Neilan B. 2001. Variable diazotrophies, morphologies and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoophyceae) from Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1839-945.
- Sebbag L, Smee N, van der Merwe D, Schmid D. 2013. Liver failure in a dog following suspected ingestion of blue-green algae (*Microcystis* spp.): a case report and review of the toxin. *Journal of the American Animal Hospital Association* 49(5): 342-6.

- Simoens M. 2015. Bioacumulación de Microcistina-LR en tarariras (*Hoplias sp.*) de un embalse eutrófico (Rincón del Bonete, Uruguay) y su riesgo potencial para la salud humana. Tesis de maestría, programa MACA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- Smayda T. 1997. Bloom dynamics: physiology, behavior, trophic effects. *Limnology and Oceanography* 42(5, part 2): 1132-6.
- Smutná M, Babica P, Jarque S, Hilscherová K, Marsálek B, Haeba M, Bláha L. 2014. Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. *Toxicon* 79: 11-8.
- Soares R, Yuan M, Servaites J, Delgado A, Magalhães V, Hilborn E, Carmichael W, Azevedo S. 2006. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Toxicology* 21(2): 95-103.
- Soll M, Williams M. 1985. Mortality of a white rhinoceros (*Ceratotherium Simum*) suspected to be associated with the blue-green alga *Microcystis Aeruginosa*, *Journal of the South African Veterinary Association* 56: 49-51.
- Stewart I, Schluter P, Shaw G. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environmental health: a global access science source* 5: 7.
- Stewart I, Seawright A, Shaw G. 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds - an overview. *Advances in experimental medicine and biology* 619: 613-37.
- Stolte W, Karlsson C, Carlsson P, Graneli E. 2002. Modelling the increase of nodularin content in Baltic Sea *Nodularia spumigena* during stationary phase in phosphorus-limited batch cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 41: 211-20.
- Thomas A, Saker M, Norton J, Olsen R. 1998. Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland. *Australian Veterinary Journal* 76(9): 592-4.
- UNE-EN ISO 6341:2013. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test.

- Utkilen H, Gjolme N. 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Applied and Environmental Microbiology* 58(4): 1321-5.
- Van der Mewer D, Sebbag L, Nietfeld J, Aubel M, Foss A, Carney E. 2012. Investigation of a *Microcystis aeruginosa* cyanobacterial freshwater harmful algal bloom associated with acute microcystin toxicosis in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(4): 679-87.
- Vezie C, Rapala J, Vaitoma A, Seitsonen J, Sivonen K. 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology* 43: 443-54.
- Walker S, Lund J, Schumacher D, Brakhage P, McManus B, Miller J, Augustine M, Carney J, Holland R, Hoagland K, Holz J, Barrow T, Rundquist D, Gitelson A. 2008. Nebraska Experience. Chapter 6. En: Hudnell H (Ed.), *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer. p. 139-52.
- Welker M, Von Döhren H. 2006. Cyanobacterial peptides – Nature’s own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30(4): 530-63.
- Wetzel R, Likens G. 2000. *Limnological Analyses*, third ed. New York: Springer-Verlag New York Inc.
- Whitton B. 2012. *The Ecology of Cyanobacteria II. Their diversity in space and time*. Netherlands: Springer.
- WHO. 2011. *Guidelines for drinking-water quality*, 4th edition. Malta: Gutenberg.
- Wood S, Heath M, Holland P, Munday R, McGregor G, Ryan K. 2010. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon* 55(4): 897-903.

Anexo 1

Encuesta productores

Fecha:

Esta encuesta tiene fines meramente académicos, se realiza con el fin de recabar información acerca de la situación en zonas de embalses del Río Negro con respecto a la posible afectación de ganado por las cianobacterias (conocidas como “algas verdeazuladas”) presentes en el agua de abrevaderos. Por consultas escribir a efont@fcien.edu.uy. Muchas gracias por su colaboración.

Localidad:

Rubro					
Hectáreas					
Tipo de ganado					
Cabezas de ganado					
	Pastura natural	Pastura artificial	Ración mixta	Otro (especifique)	
Alimentación del ganado					
Comentarios sobre alimentación					
	Tajamar	Embalse	Río/arroyo	Pozo	Otra (especifique)
Fuente de agua					

	SI	NO
¿El agua del abrevadero presentó coloración, olor y/o aspecto turbio alguna vez?		
¿Observó manchas verdes, “verdín” o grumos en el agua en años anteriores?		
¿En qué años?		

	1	2	3	4	5	Otro (especifique)
Frecuencias de “ verdín ” en 1 año						

	SI	NO
¿Sospecha que ha tenido algún episodio de muerte de ganado por consumo de agua con cianobacterias?		

Cuantos episodios en 1 año	
Cuanto ganado muerto	
Tipo de ganado	
Edad del animal	

	SI	NO		HORAS	DIAS	SEMANAS	MESES
Evolución rápida			Indique con una cruz				

	SI	NO
¿Piensa que su ganado ha sido afectado por consumo de agua con cianobacterias?		

Cuantos episodios en 1 año	
Cuanto ganado afectado	
Tipo de ganado	
Edad del animal	

Sintomas:	SI	NO
Letargo (somnolencia)		
Astenia (fatiga/cansancio)		
Dificultad para respirar		
Pérdida de apetito		
Pérdida de peso		
Contracciones involuntarias		
Fotofobia		
Fotosensibilización		

	SI	NO
¿Existen otras causas que pudieron haber afectado al ganado?		
Yuyos		
Fumigaciones aéreas		
Parásitos		
Otros (especifique abajo)		

Otros comentarios

Nombre (OPCIONAL):
Contacto (OPCIONAL):