



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

**Cianobacterias y cianotoxinas presentes en la planta de
tratamiento de aguas residuales de la población de Mochima,
estado Sucre**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela, por el **Br. César Enrique Rivera
Aguilar**, como requisito parcial para optar al título
de Licenciada en Biología.

Tutores:

Dr. Rubén Torres Parra

Lic. Eliaira Rodríguez

Caracas, Venezuela

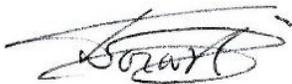
Mayo – 2018

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

ACTA

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. César Enrique Rivera Aguilar, C.I. 19.331.932, titulado "**Cianobacterias y cianotoxinas presentes en la planta de tratamiento de aguas residuales de la población de Mochima, estado Sucre**", para optar al título de Licenciado en Biología; Considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos: **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas a los ventidos días del mes de mayo del año 2018, dejando constancia que el Dr. Rubén Torres y la Lic. Eliaira Rodríguez actuaron como coordinadores del jurado examinador.



Dra. Nora Malaver

(Jurado)



Dra. Beatriz Alvez

(Jurado)



Dr. Rubén Torres

(Tutor)



Lic. Eliaira Rodríguez

(Tutor)

Agradecimientos

A mis tutores Rubén y Eliaira, a la Prof. Zoppi, a mis padres por su comprensión y apoyo, mi hermana que a su extraña y dramática manera siempre me apoya y alienta, a mi familia y mis amigos, a la Fundación IDEA (Energía y Ambiente) y a todas las chicas que me acompañaron en el laboratorio.

Agradezco también la confianza y el apoyo brindado por parte de mi madre, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

Y gracias a todos los que brindaron su apoyo y ayuda en este proyecto.

Resumen

La bahía de Mochima es una de las regiones marinas costeras más importantes de Venezuela, posee una gran diversidad biológica y atractivo turístico. La situación económica de los pueblos en nuestro país no siempre es buena, sus sistemas sanitarios y servicios de agua pueden tampoco encontrarse en las mejores condiciones, por lo que en algunos casos se opta por plantas de tratamiento para las aguas residuales. En las afueras del pueblo de Mochima se encuentra una planta de tratamiento de aguas residuales que recibe sus efluentes y descarga en la bahía. La falta de mantenimiento de dicha planta ha hecho que su funcionamiento desmejore, no logrando su objetivo original, por lo que generan olores desagradables y contaminación en la bahía, haciendo necesario un estudio de la eficiencia de la planta. Con este propósito se estudió la comunidad fitoplanctónica del sistema de lagunas de oxidación, con énfasis en las especies de cianobacterias presentes y su carga de cianotoxinas. Se tomaron muestras de fitoplancton en cada una de las lagunas para dos meses de 2016. La composición del fitoplancton corresponde con la de un sistema eutrofizado, principalmente compuesto por cianobacterias en una gran abundancia para el mes de marzo y de euglenofitas para el mes de diciembre. La cianobacteria más abundante es *Microcystis aeruginosa*, productora de la hepatotoxina microcistina. El funcionamiento observado en planta no es el adecuado y se expresa en que la concentración de *M. aeruginosa* es más elevado de lo reglamentario, así como la concentración de sus toxinas liberadas en la bahía que es zona recreativa y de pesca, lo que aumenta el riesgo de exposición tanto para personas como comunidades marinas.

Índice

INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	27
OBJETIVOS	29
ÁREA DE ESTUDIO	30
Descripción del Sistema de Tratamiento de Aguas Residuales de Mochima	31
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Métodos de campo	33
Métodos de laboratorio	34
Análisis de resultados	38
RESULTADOS	40
Identificación y cuantificación de cianobacterias	43
Análisis estadístico	50
DISCUSIONES	52
Análisis ecológico y sanitario	52
Análisis microbiológicos y moleculares	59
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÉNDICE 1	73
APÉNDICE 2	77
APÉNDICE 3	78

INTRODUCCIÓN

Cianobacterias: aspectos generales

Las cianobacterias (anteriormente conocidas como algas verde-azules) son microorganismos fitoplanctónicos que constituyen un filo del Dominio Eubacteria. Se trata de los seres fotoautótrofos más antiguos del planeta (existen restos fósiles de más de 3500 millones de años), los cuales presentan una fotosíntesis particular dentro de las bacterias por su clorofila *a*, que los diferencia de otras bacterias fotosintéticas. La fotosíntesis de las cianobacterias libera oxígeno, mientras que en la fotosíntesis bacteriana otros gases se encuentran presentes como productos metabólicos (Bold & Wynne, 1985).

En la actualidad, las cianobacterias presentan una distribución geográfica muy amplia, encontrándose en ambientes muy variados: terrestres, dulceacuícolas, estuarinos y marítimos, e incluso extremos como lagos de soda y aguas termales. En general, las cianobacterias suelen encontrarse en hábitats de pH neutros o ligeramente alcalinos, aunque algunas especies se han encontrado en aguas con pH 4 y 12. Brock (1973) reportó que las cianobacterias están ausentes en aguas cuyo pH es menor a 4 ó 5. Estos microorganismos también pueden habitar en superficies expuestas e interior de rocas y tienen simbiosis con hongos (líquenes), protozoos y plantas. Algunas especies son portadoras de bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella* sp.

Las cianobacterias son procariotas (sus únicos orgánulos son los ribosomas), haploides y con ADN circular libre en el citoplasma, de organización unicelular, colonial y filamentosa. Existe movilidad por deslizamiento y vesículas

de gas, las que brindan a las formas pelágicas de flotabilidad y desplazamiento vertical en la columna de agua. Las especies más comunes son unicelulares cocoides (esferoidales), las cuales con frecuencia forman colonias muy densas y agregadas en una cápsula mucilaginosa o asociadas en filamentos. Otros tipos morfológicos poseen células tabulares, rectangulares o en forma de tablillas, siempre formando filamentos. Las especies del Orden Nostocales presentan el nivel de organización más complejo o avanzado, puesto que hay diferenciaciones morfológicas celulares que cumplen funciones específicas, estructuras denominadas heterocistos (o heteroquistes) y acinetos. Su forma de reproducción es vegetativa o asexual, los mecanismos son variados: fisión binaria, gemación, hormogonios (en el caso de especies filamentosas), esporas latentes (acinetos) y fisión múltiple, entre otros.

Entran dentro del grupo de las bacterias Gram-negativas, así que sus envolturas están constituidas por una membrana plasmática y una membrana externa, situándose entre ellas una capa de murina (peptidoglucano). Las paredes celulares envuelven a su vez a estas membranas, generalmente constituidas de mucopolisacáridos (cuatro capas de mucopéptidos: ácido murámico, glucosamina, galactosamina, alanina, ácido glutámico y ácido diaminopimélico). No obstante, se ha descubierto recientemente que las paredes celulares de los heterocistos poseen celulosa (Herrero y Flores, 2008).

El aparato fotosintético de las cianobacterias consta de membranas internas libres en el citoplasma llamadas laminillas fotosintetizadoras, las cuales se encuentran dispuestas en un complejo multilaminar homologable a los tilacoides de los cloroplastos de células eucariotas, que son los responsables de realizar el

metabolismo fotosintético. (Talón & Azcón, 2000) Solo poseen clorofila *a* y pigmentos antena boliproteicos ubicados en estructuras denominadas ficobilisomas; entre estos pigmentos destacan las ficobilinas, específicamente las ficocianinas (*c*-ficocianina y aloficocianina) responsables de su coloración azulada. La fijación de CO₂ se hace a través del ciclo de Calvin para producir carbohidratos, su fuente principal de energía, con tasas y eficiencias fotosintéticas muy altas.

Otra actividad metabólica relevante de las cianobacterias es el hecho de que muchas de sus especies son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (N₂) y reducirlo a amonio (NH₄⁺), la cual realizan en condiciones de anaerobiosis. Como se ha mencionado, las cianobacterias Nostocales presentan estructuras especializadas denominadas heterocistos o heteroquistes para la fijación de N₂, que son células con paredes celulares engrosadas que impiden la entrada de oxígeno. De este modo, la enzima nitrogenasa, que cataliza la reacción, puede tener actividad biológica permanente.

En forma alternativa, estos organismos pueden vivir heterotróficamente como descomponedores o con metabolismo mixto (mixotróficos). Algunas especies son altamente tóxicas, como por ejemplo *Anabaena circinalis*, y otras son inocuas de gran importancia en la industria de alimentos, como especies de los géneros *Arthrospira* y *Spirulina*. Los mecanismos de intoxicación son variados: venenos citotóxicos que atacan las células, los hepatotóxicos que atacan el hígado y neurotóxicos que lo hacen con el sistema nervioso.

Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica está basada esencialmente en la morfología (hábito del individuo, morfología de la célula y de la vaina mucilaginosa). Es

importante la línea de evolución del talo: cocoide aislado de vida libre, cocoide aislado de vida fija, cocoide colonial, filamento simple, filamento pseudoramificado y filamento ramificado.

El sistema de clasificación, con nomenclatura botánica, es el propuesto por Cavalier-Smith (2002) y está conformado por las siguientes categorías:

REINO BACTERIA

SUBREINO Negibacteria

INFREINO Glycobacteria

DIVISIÓN Cyanobacteria

SUBDIVISIÓN Gleobacteria

CLASE Gleobacteria

ORDEN Gleobacteriales

SUBDIVISIÓN Phycobacteria

CLASE Chroobacteria

ORDEN Chroococcales (*Chroococcus*, *Microcystis*, *Merismopedia*)

ORDEN Pleurocapsales

ORDEN Oscillatoriales (*Oscillatoria*, *Spirulina*)

CLASE Hormogoneae

ORDEN Nostocales (*Nostoc*, *Anabaena*)

ORDEN Stigonematales

En modificaciones realizadas a la clasificación antes mencionada, el Reino es ahora denominado con el mismo nombre del Dominio: Eubacteria. Por otro lado, se ha hecho una uniformización o adaptación a la nomenclatura zoológica, y

las categorías División y Subdivisión han pasado a denominarse Phylum y Subphylum, respectivamente.

Importancia ecológica e impacto de las cianobacterias

Las cianobacterias tienen una gran importancia ecológica y evolutiva, la cual radica en la capacidad de generar gran parte del oxígeno de la atmósfera y materia orgánica para nutrir a otros organismos en tramas tróficas complejas, principalmente acuáticas. Así mismo, fueron los organismos que en los episodios primigenios de la vida lograron transformar la atmósfera primitiva reductora a la actual oxidante, lo que repercutió en la radiación de formas de vida más complejas: células eucariotas, multicelularidad y sexo. Debido a sus tasas y eficiencias fotosintéticas tan elevadas contribuyen de manera importante a la productividad primaria global de la Tierra. Ciertas cianobacterias representan los mayores fijadores de nitrógeno en amplias zonas oceánicas, las cuales son ambientes oligotróficos, al igual que en cuerpos de agua dulce, contribuyendo de forma importante a la cantidad total de nitrógeno fijado en vida libre o en algunos casos fuente única del mismo.

En el caso particular de ecosistemas acuáticos lénticos, incluidos ecosistemas contruidos como embalses y lagunas de oxidación, la red trófica está compuesta por un conjunto de productores y consumidores que canalizan los flujos de materia y energía a través de dos vías principales: la cadena trófica clásica y la red trófica microbiana (Cotner y Biddanda, 2002). Estas dos vías están constituidas en su base por el fitoplancton y el bacterioplancton, respectivamente. Por su parte, el zooplancton transfiere la energía de ambas vías hacia los niveles tróficos superiores (Havens y col., 2000).

En ecosistemas lénticos oligotróficos suele predominar la biomasa bacteriana sobre la fitoplanctónica (Gasol y col., 1997; Cotner, 2000; Biddanda y col., 2001). Por su parte, en eventos de contaminación ambiental originados por exceso de nutrientes provenientes de actividades agrícolas y desechos vertidos a cuerpos de agua, principalmente cargados de nitrógeno y fósforo (eutrofización), las cianobacterias predominan ampliamente en la comunidad fitoplanctónica y algunas especies se agregan dando lugar a grandes floraciones (en inglés “blooms”), que describen aumentos significativamente mayores al promedio en la biomasa del fitoplancton y generalmente resultan altamente tóxicas o nocivas para la biota acuática (Roset y col., 2001). Estas superpoblaciones de cianobacterias además generan anoxia y acidosis por impedimento de penetración de luz solar a la columna de agua (efecto de apantallamiento o autosombreo). Los géneros más frecuentes de dichas floraciones son: *Microcystis*, *Anabaena* y *Aphanizomenon* (Ramírez y col., 2004). Etchenique (2006) y Guerrero (2006) mencionan que las especies principales son *Anabaena circinalis* y *Microcystis aeruginosa*, ambas potencialmente tóxicas. La figura 1 muestra un resumen de las fuentes de contaminación que llevan a florecimientos de cianobacterias tóxicas y sus efectos en el ambiente y salud humana.

Cabe mencionar en este aparte, que también existen impactos positivos de actividades económicas productivas con empleo de cianobacterias. Éstas han cobrado gran importancia agroecológica y económica en los últimos tiempos; como ejemplo de esto, se les utiliza en suelos donde se cultiva arroz, ya que incorporan el nitrógeno atmosférico en compuestos utilizables por las plantas, evitándose el uso de fertilizantes, por lo que mejora la calidad del suelo y se

incrementa el rendimiento agrícola (Prosperi, 2000). Como se ha comentado en líneas anteriores, especies de los géneros *Arthrospira* y *Spirulina* son empleadas industrialmente como fuentes complementarias y suplementarias de alimentos, esto debido a su gran contenido de proteínas y vitaminas; también han tenido gran impacto en la industria de los colorantes y cosmética, así como marcadores moleculares en farmacéutica, dados sus pigmentos característicos, las ficocianinas (Ciferri, 1983; Henrikson 1994).

Toxicidad

Las cianotoxinas son consideradas los compuestos más tóxicos y preocupantes en las masas de agua, tanto por la gran extensión que alcanzan como por su toxicidad elevada. Son metabolitos secundarios que se generan y acumulan durante la producción de ftopigmentos (Quesada y Carrasco, 2006). Ante condiciones ambientales desfavorables, las cianobacterias mueren y liberan sus contenidos al medio (Ramírez y col., 2004). La naturaleza química de las toxinas puede ser muy diversa: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos, aunque normalmente se clasifican por los efectos que producen: toxinas irritantes (OMS, 1998), citotoxinas (cilindrospermopsinas) (OMS, 1998; Quesada y Carrasco, 2006), dermatotoxinas (aplisiatoxina y lyngbyatoxina) (Ramírez y col., 2004), neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a (s) y saxitoxina) (OMS, 1998) y hepatotoxinas (microcistinas y nodularinas) (Quesada y Carrasco, 2006; Ramírez y col., 2004).

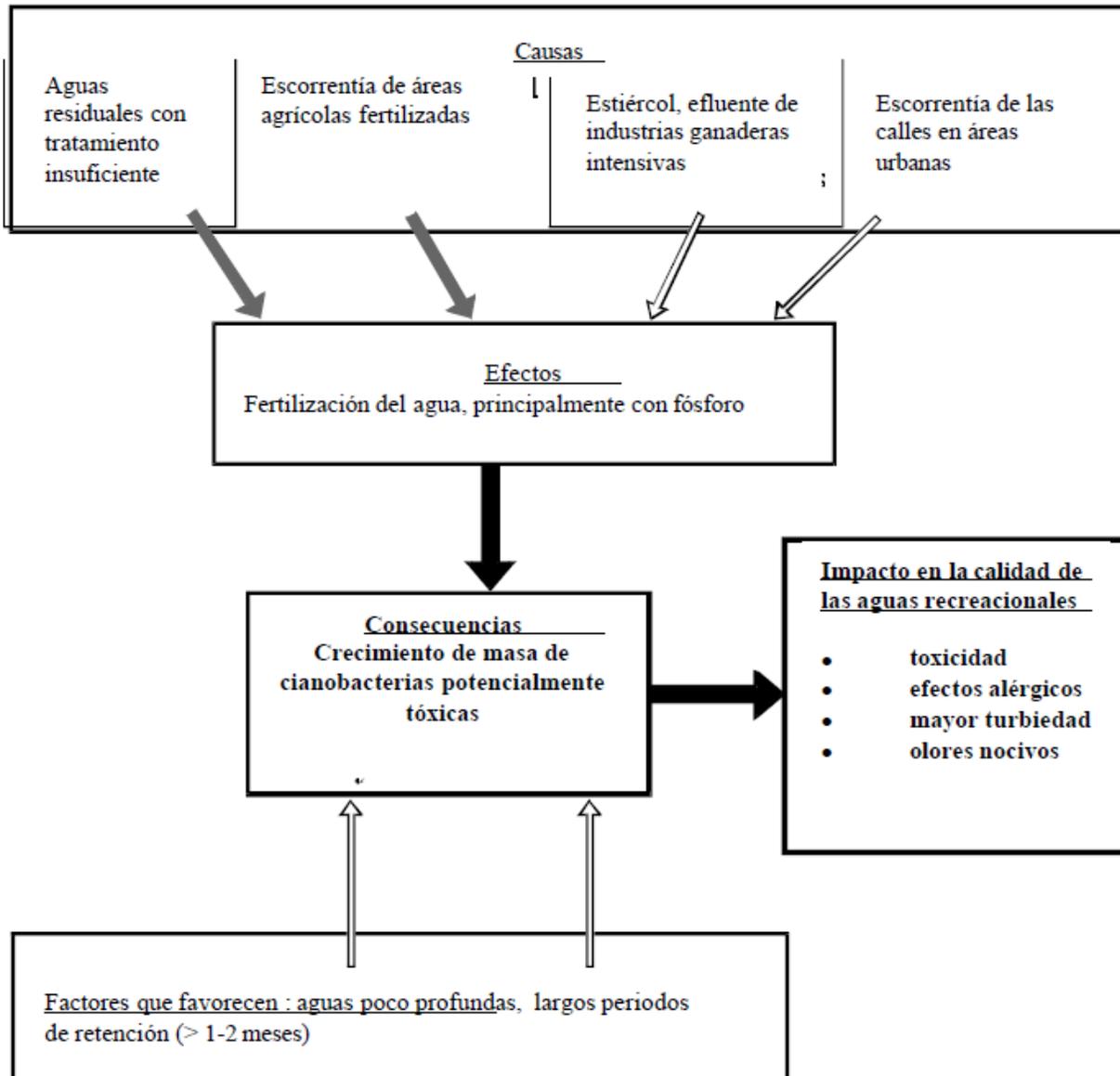


Figura 1. Crecimientos de biomasa de cianobacterias potencialmente tóxicas, factores causantes que favorecen su multiplicación. (Chorus & Bartram, 1999).

Las cianobacterias tóxicas se encuentran en todas las aguas interiores y costeras del mundo, actualmente se conocen 24 géneros y 46 especies en el mundo. Entre las especies dulceacuícolas que causan efectos tóxicos en vertebrados están: *Microcystis* spp., *Oscillatoria rubences* y *O. agardhii*, *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Synechrococcus*

spp., *Gleotrichia* spp., *Lyngbya* spp., *Nostoc* spp., *Schricotrix* spp., *Synechrocystis* spp. En ambientes salobres (estuarios) o marinos la especie principal es *Nodularia spumigena*, aunque estos ambientes también han sido invadidos por especies provenientes de agua dulce, principalmente en periodos lluviosos con aportes grandes de ríos contaminados y descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales. En el Apéndice 1 se muestran descripciones de las especies.

La investigación se expande y existe mayor probabilidad de encontrar otras especies tóxicas, por consiguiente es prudente esperar un potencial tóxico en cualquier población bacteriana. Se desconoce parcialmente la función fisiológica y bioquímica de las toxinas para las cianobacterias, y los factores que conducen al predominio de cepas tóxicas no se comprenden en su totalidad. En todo el mundo el 75% de las muestras investigadas contienen toxinas.

La toxicidad de un único afloramiento puede fluctuar rápidamente en tiempo y espacio. Los crecimientos en masa y especialmente natas superficiales representan grandes riesgos. Es importante entender que las toxinas se encuentran principalmente dentro de las células bacterianas, la liberación en el agua es posible, especialmente cuando las células mueren y se disuelven por lisis, la toxina se diluye rápidamente y posiblemente se degrade. Las concentraciones de toxina peligrosamente altas generalmente son el resultado de la acumulación de material celular como las natas. Para agua potable, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso un valor provisional de referencia para microcistina-LR de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (OMS, 2011), nivel máximo aceptable para el consumo oral diario de microcistina-LR (libre y unida a célula) en aguas de abastecimiento público.

La sintomatología asociada por intoxicación por cianobacterias es: dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarreas, dolor de garganta, tos seca, cefaleas, ampollas en la boca, neumonía atípica, enzimas hepáticas elevadas, mareo, fatiga, fiebre de heno, irritación en piel y ojos.

Los riesgos para la salud humana surgen por tres vías:

- a) Contacto directo de partes expuestas del cuerpo; oídos, ojos, boca y garganta, y áreas cubiertas por el traje de baño o el traje de buceo que pueden acumular material celular.
- b) Ingestión directa del agua.
- c) Ingestión de agua por inhalación o aspiración.

Las cianotoxinas más frecuentes y generalizadas son las microcistinas. Son hepatopéptidos cíclicos que contienen una cadena lateral específica de aminoácidos (ADDA). Existen cerca de 89 análogos estructurales que varían según los grupos metílicos y los dos aminoácidos dentro del anillo (cadena de 7 aminoácidos) bloquean las fosfatasas proteicas (Welker y Von Döhren, 2006). Las más frecuentes son la LR, RR Y YR, las cuales son incoloras. La más común es la LR con leucenina y arginina, respectivamente, la diferencia en los aminoácidos de las microcistinas determina su toxicidad, así como sus propiedades fisicoquímicas. Su producción depende de factores físicos, químicos y biológicos como luz, temperatura, pH, concentración de nitrógeno y dióxido de carbono. Se presume que las cianobacterias las usan como mecanismo de defensa, en el metabolismo del hierro (es un quelante de hierro) y también se ha evaluado su participación en la división celular. La figura 2 muestra su estructura molecular.

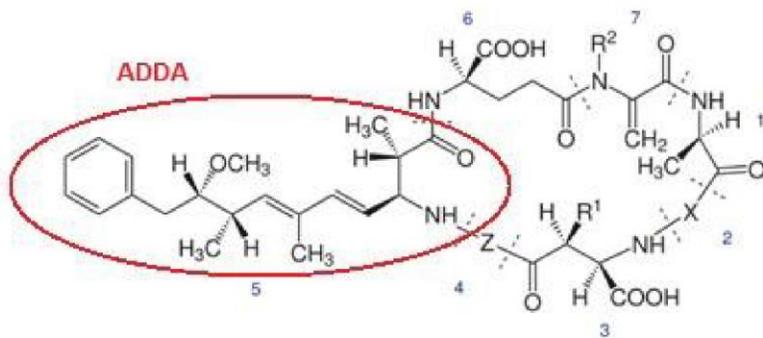


Figura 2. Estructura química de las microcistinas.

Las toxinas son difícilmente eliminables del agua, la intoxicación puede ser grave causando muerte en animales y humanos, se sospecha que su acumulación puede causar daños al hígado y su ingesta aún en bajas dosis puede inducir a la formación de tumores. Mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y espectrometría de masa (MALDITOF) (PSD) se ha determinado en diferentes cuerpos de agua la presencia de microcistinas y otras cianotoxinas. La Tabla 1 resume los tipos de cianotoxinas descritos, sus intervalos de concentraciones, géneros taxonómicos que las presentan y efectos en la salud humana.

Tabla 1. Cianotoxinas y su toxicidad aguda. (Chorus y Bartram 1999).

Cianotoxina	LD 50 (i.p. con ratones) de toxina pura	Género que la produce	Efecto
Bloqueadores de proteína fosfatasa. Péptidos-cíclicos (ADDA)			
Microcistina en general	45->1000 µg/kg	<i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Hapalosiphon</i>	Bloquean las proteínas fosfatasas por enlace covalente y causan hemorragia del hígado; puede ocurrir daño acumulativo
Microcistina LR	60 (25-125)µg/kg		
Microcistina YR	70 µg/kg		
Microcistina RR	300-600 µg/kg		
Nodularina	30-50 µg/kg	<i>Nodularia spumigena</i>	

Tabla 1. Continuación.			
Cianotoxina	LD 50 (i.p. con ratones) de toxina pura	Género que la produce	Efecto
Neurotoxinas			
Anatoxina (a)	250 µg/kg	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermum</i>	Bloquea la despolarización post-sináptica.
Anatoxina a (s)	40 µg/kg	Conocida en dos especies de <i>Anabaena</i>	Bloquea la acetilcolinesterasa
Saxitoxina	10 – 30 µg/kg	<i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i>	Bloquea los canales de sodio
Citotoxinas			
Cilindrospermosina	2100 µg/kg/d 200µg/kg/5-6 d	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	bloquea la síntesis proteica por toxicidad acumulativa

En aguas de recreación, el valor guía propuesto por la OMS para el nivel de riesgo leve o bajo es de 10 µg.L⁻¹ de Chlo-a, lo que corresponde aproximadamente a 20.000 cel.mL⁻¹. A esta densidad de cianobacterias se espera de 2 a 4 µg.L⁻¹ de microcistinas, o incluso hasta 10 µg.L⁻¹ si se trata de floraciones altamente tóxicas (Chorus y Bartram, 1999).

A valores de 100.000 cel/mL o 50 µg/L de Chl-a (aproximadamente 20 µg/L de microcistinas), valores máximos del nivel guía de riesgo moderado por exposición recreativa, se deben restringir las actividades en estas aguas. En casos de presencia de “espuma”, el riesgo de efectos adversos es muy alto, pudiendo detectarse valores de microcistinas de 20.000 µg/L o aún mayores en estas acumulaciones, alcanzando un nivel de riesgo muy alto (Chorus y Bartram, 1999).

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 cel/mL de *Microcystis aeruginosa* (o 2,3 µg/L 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 8 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 cel/mL para distintas especies de ganado.

Aguas residuales

Las aguas residuales son el resultado de la mezcla de aguas servidas o de uso doméstico e industriales. Anteriormente también se las conocían como aguas negras y cloacales. Proviene del sistema de abastecimiento de una población después de haber sido modificadas por diversas utilidades como domésticas, industriales y comunitarias, entre otros. (Mara, 1976)

Resultan de la combinación de líquidos y residuos sólidos transportados por el agua que provienen de residencias, oficinas, edificios comerciales o instituciones, junto con los residuos industriales y por actividad agrícola, así como las aguas subterráneas superficiales o de precipitación que también pueden agregarse eventualmente a las aguas residuales.

La clasificación de las aguas residuales, según su origen (Restrepo y col., 2012), es la siguiente:

- a) Domésticas: Son aquellas utilizadas con fines higiénicos (baños, cocinas, lavanderías, etc. Son residuos humanos que llegan a las redes de alcantarillado por medio de la descarga de instalaciones hidráulicas de la edificación, también en residuos originados por establecimientos comerciales, públicos, etc.
- b) Industriales: Son líquidos generados por los procesos industriales, poseen características específicas en función del tipo de industria.
- c) Infiltración y caudales adicionales: Penetran en el sistema de alcantarillado a través de empalmes de las tuberías, paredes defectuosas de las tuberías, tuberías de inspección o limpieza, etc. Hay también aguas pluviales que son descargadas como canales, drenajes y colectores.
- d) Pluviales: son aguas de lluvia que descargan grandes cantidades de agua sobre el suelo; parte es drenada y otra se escurre por la superficie arrastrando arena, hojas, lodo y otros.

Existen una serie de indicadores que marcan la calidad del agua en zonas recreacionales como el pH, los coliformes totales, turbiedad, DBO, cloro residual, etc. Para medir la concentración de contaminantes orgánicos en las aguas residuales, el indicador más utilizado es la demanda biológica de oxígeno (DBO), lo que se define como la concentración de oxígeno disuelto consumido por los microorganismos presentes en el agua; su valor debe ser menor a 8 mg/L para ser considerada potable. Generalmente en aguas servidas el valor fluctúa entre 200-300 mg/L.

Cada agua residual es única en sus características, aunque el tamaño de la población, el sistema de alcantarillado, el grado de industrialización y la incidencia pluviométrica son rasgos de variación habituales. El tratamiento general comprende procesos químicos, físicos y biológicos (López y Villanueva, 2013):

- Tratamiento preliminar, eliminar residuos fácilmente separables y en algunos casos un proceso de pre-aireación.
- Tratamiento primario, comprende procesos de sedimentación y tamizado.
- Tratamiento secundario, son procesos biológicos aerobios y anaerobios y físico-químicos (floculación) para reducir DBO.
- Tratamiento terciario, reducción total de DBO, metales pesados y/o contaminantes químicos específicos y eliminación de patógenos y parásitos.

Plantas de tratamiento de aguas residuales

Las disposiciones generales de este tipo de instalaciones, las cuales son creadas para ofrecer servicios sanitarios o de tratamiento de aguas contaminadas para su depuración y reutilización, son proteger la salud pública y el medio ambiente. Estas constituyen los objetivos primordiales del tratamiento de aguas residuales, mejorar su calidad para cumplir con normas de sanidad del cuerpo receptor o las normas de reutilización, así como mejorar la condición de los lodos para su disposición final o su aprovechamiento. En el caso de ciudades con sistema de alcantarillado combinado, el diseño del sistema debe estar sujeto a un cuidadoso análisis para justificar el dimensionamiento de los procesos de la planta. (Mendonça, 1987)

La información básica que debe manejarse es la siguiente:

- Levantamiento topográfico detallado de la zona donde se ubicaran las unidades de tratamiento y de la zona de descarga de los afluentes.
- Estudios de desarrollo urbano o agrícola que puedan existir en la zona.
- Datos geológicos y geotécnicos y del nivel freático.
- Datos hidrológicos del cuerpo receptor, incluido el nivel máximo de inundación para posibles obras de protección.
- Datos climáticos de la zona.
- Disponibilidad y confiabilidad del sistema de energía eléctrica.

Documentación:

- Memoria técnica del proyecto.
- Resultados del estudio del cuerpo receptor.
- Resultados de la caracterización de las aguas residuales y de los ensayos de trazabilidad.
- Impacto ambiental.
- Manual de operación y mantenimiento.
- Planimetría (diseños hidráulicos y sanitarios, planos estructurales, mecánicos, eléctricos y arquitectónicos, planos de obras de protección, caminos, laboratorios, caseta de guardia, etc.).
- Memoria descriptiva.
- Especificaciones técnicas.
- Análisis de costos unitarios.
- Métodos y presupuestos.
- Fórmulas de reajustes de precios.

- Documentos de licitación, adjudicación supervisión y otros.

Los datos métricos para la ubicación de sistemas de lagunas de oxidación, las cuales deben estar fuera del alcance de torrentes, avenidas y otros son:

- 500 m mínimos para tratamientos anaeróbicos.
- 200 m para lagunas oxidativas.
- 100 m para lagunas aireadas.
- 100 m para lodos activados y filtros percoladores.

Por su parte, las fases de tratamiento consisten en (SINIA, 2009):

a) Tratamiento preliminar: Instalación de cribas y desarenadores.

- Cribas gruesas: artefacto de barras paralelas de separación uniforme para remover sólidos flotantes de gran tamaño.
- Cribas medias: para remover sólidos flotantes y en suspensión.
- Desarenadores: son obligatorios en plantas que tienen sedimentadores y digestores, preferiblemente manuales.

b) Tratamiento primario: remoción de sólidos orgánicos e inorgánicos sedimentables para disminuir la carga en el tratamiento biológico:

- Tanques Imhoff: sedimentación primaria, se incorpora la digestión de lodos en un comportamiento en la parte inferior.
- Tanques de Sedimentación.
- Tanques de Flotación: para remover partículas finas en suspensión, usando el aire como agente de flotación.

c) Tratamiento Secundario: Procesos biológicos, remoción de DBO soluble mayor a 80%, incluye los sistemas de lagunas de estabilización, lodos activados (incluidas las zanjas de oxidación y otras variantes), filtros biológicos y módulos

rotatorios de contacto. Las lagunas de estabilización comprenden: lagunas anaeróbicas, lagunas aireadas, lagunas facultativas y lagunas de remoción de organismos patógenos. Los lodos activados se remueven en un 75-95% de DBO, el afluente debe tratarse en un sedimentador secundario para separar biomasa proveniente del reactor biológico.

d) Otros tipos de tratamiento: Se hacen sobre el terreno para el reúso agrícola.

- Desinfección: reducción de bacterias solo en caso de que el cuerpo receptor demande alta calidad bacteriológica, puede ser intermitente o continuo. Se debe considerar: la dosis de cloro, temperatura de contacto de la cámara, instalaciones de dosificación, inyección, almacenamiento, etc.
- Tratamiento Terciario: Cuando el grado de tratamiento fijado de acuerdo a las condiciones del cuerpo receptor o de aprovechamiento sea mayor que el que se pueda obtener mediante el tratamiento secundario. Se deberán utilizar técnicas más avanzadas como: osmosis inversa, electrodiálisis, destilación, coagulación, remoción de espuma, filtración, extracción de solvente, intercambio iónico, oxidación química, precipitación, nitrificación y desnitrificación.
- Tratamiento de lodos: se debe realizar un cálculo de la producción de lodo, además cantidades de lodo de fuentes exteriores como tanques sépticos, considerar que los lodos de las zanjas de oxidación no requieran otro proceso. Para este proceso el proyectista debe justificar técnica y económicamente el sistema de almacenamiento, disposición final y utilización de lodos deshidratados.

Las lagunas de oxidación o estabilización constituyen piletas de tierra poco profunda, de 1-2 metros que se utiliza para el tratamiento biológico de diversos afluentes municipales o industriales. Las condiciones del tanque varían de aerobias a facultativas y hasta anaerobias, dependiendo del suministro de aireación complementaria, de la profundidad del tanque y del grado de mezcla natural o inducida. Casi todos los tanques son facultativos, los sólidos sedimentables retenidos sufren descomposición aeróbica en el fondo del estanque, mientras que los residuos orgánicos solubles son transformados en dióxido de carbono y agua para las bacterias aerobias de los niveles superiores. Es difícil eliminar las algas de los estanques de oxidación, ya que tienden a escapar con el afluente, con lo cual provocan que el DBO exceda los límites de la descarga (Mendonça, 1987).

Debido a la situación económica de las poblaciones ribereñas y teniendo en cuenta que las aguas residuales no tratadas se han convertido en un problema para la sociedad y el medio ambiente en general, se hace necesario la implementación de sistemas de depuración que resulten funcionales a un costo bajo de instalación y operación, y que además sean eficientes para el medio ambiente. El tratamiento de las aguas residuales domésticas puede llevarse a cabo mediante diversos métodos. Estos pueden alternarse de diferentes maneras, lo que ofrece como resultado diferentes secuencias de operaciones y procesos. Todos estos mecanismos se basan en fenómenos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, casi todas las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas se conciben con base a procesos biológicos (Rolim, 2000).

Los sistemas de lagunas de oxidación se utilizan generalmente en zonas rurales, para el tratamiento de aguas básicamente provenientes de la comunidad, las cuales son utilizadas por pequeños municipios y también por algunas industrias, debido a la creencia de que funcionan con muy poco mantenimiento. Si bien el mantenimiento no requiere mano de obra intensiva, sí necesita ser controlada adecuadamente la biomasa del mismo, de manera que se pueda lograr el objetivo primordial de sanear el efluente, para ser vertidos a los cuerpos receptores sin contaminar. En Venezuela estos vertidos están normados según el decreto 883 del 11 de octubre de 1995 (Gaceta Oficial Extraordinaria nº 5.021).

Por lo general, estos sistemas están constituidos por tres lagunas: la primera anaeróbica, la segunda facultativa y la tercera aeróbica. En el caso de este trabajo, el mismo se realiza en un sistema de siete lagunas distribuidas de forma seriada. Estos sistemas si no son correctamente mantenidos, transcurrido cierto tiempo de funcionamiento, comienzan a colapsar, provocando sobrenadantes en superficie y emanaciones de olores desagradables (Ferrero, 1974).

En Venezuela, entre los cuerpos de aguas que reciben descargas constantes de aguas residuales tratadas se encuentra la bahía de Mochima, ubicada dentro del Parque Nacional Mochima. La bahía está ubicada en un área de surgencia y, por ende su productividad primaria es elevada, constituyendo un sitio idóneo para el desove de numerosas especies de peces, muchas de las cuales son de interés comercial, como es el caso de las sardinas, el atún y el jurel. Además, presenta una gran diversidad biológica y ecosistemas de fragilidad alta, conformando un panorama de gran valor biológico y turístico para el país, por lo

que se encuentra actualmente dentro de las zonas de mayor prioridad de conservación de las áreas marinas costeras (Martín y col., 1995).

A pesar de existir un sistema de tratamiento para las aguas residuales de la población de Mochima, el mismo carece de una evaluación continua de su funcionamiento y un control oficial del cumplimiento de las normativas legales para las descargas de los efluentes en el medio marino. De esta manera, se hace necesario un estudio de la calidad del agua de dicha planta, con el propósito de estudiar las especies de cianobacterias presentes en la misma, tomando en cuenta su toxicidad, para emprender soluciones a los problemas ambientales y sanitarios de esta importante región del país, especialmente los organismos marinos que reciben dichas descargas y son consumidos por los seres humanos.

ANTECEDENTES

La bahía de Mochima por su atractivo turístico y características ecológicas ha sido atractiva para la realización de diversos estudios científicos. Existen varios trabajos con distintos enfoques y objetos de estudio sobre la bahía, pero de la laguna de oxidación y su efecto muy poco se conoce.

El estudio y caracterización de lagunas de estabilización en Venezuela ha tenido un auge en los últimos 20 años. En Mochima, uno de los primeros trabajos a mencionar sobre la laguna de estabilización es el de Expósito y col. (1997), en el que se hace un estudio del efecto de la descarga de la laguna sobre la calidad del agua de la bahía, en base al plancton que ocupa los primeros niveles tróficos en los procesos de transferencia de energía en las cadenas alimentarias marinas, por lo que se le considera un indicador del estado del ecosistema.

A lo largo del país se han hecho estudios de caracterización de cianobacterias en ambientes contaminados, principalmente embalses, lagos y lagunas. Entre estos trabajos se encuentra el de Infante y Riehl (1984) en el lago de Valencia, quienes estudiaron el efecto de las cianobacterias sobre el zooplancton, cuya abundancia y composición variaron según las de las cianobacterias. Las floraciones periódicas de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* no fueron perjudiciales para el zooplancton, a pesar de que los copépodos, cladóceros y rotíferos consumen pequeñas colonias. Las concentraciones altas de *Lyngbya limnetica* y *Oscillatoria limnetica* en el lago de Valencia resultaron ser inhibitorias para los cladóceros. De igual manera, se tiene el trabajo de González y col. (2003), quienes hacen un estudio de las

características del fitoplancton de cinco localidades en Venezuela, donde encontraron que el grupo más abundante eran las cianobacterias. También González y col. (2004) hacen un primer estudio de las características del fitoplancton del embalse Pao-Cachinche, donde se destacan las cianobacterias como organismos dominantes.

En cuanto a la planta de tratamiento de aguas residuales de la bahía de Mochima, este trabajo es el primer estudio de caracterización del fitoplancton que vive en este sistema, desde un punto de vista microbiológico y molecular, donde se determinaron las abundancias de las cianobacterias, sus contenidos de cianotoxinas y el posible efecto deletéreo de su descarga sobre la biota de la bahía.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar las cianobacterias y sus toxinas en lagunas de oxidación de la planta de tratamiento de aguas residuales de Mochima, estado Sucre.

Objetivos Específicos

- Medir las variables fisicoquímicas de las lagunas de oxidación de la planta de tratamiento.
- Identificar y cuantificar las cianobacterias presentes en las lagunas.
- Determinar la presencia de las cianotoxinas de las especies de cianobacterias presentes.
- Purificar y aislar las cianotoxinas de las especies que presentan mayor abundancia.

ÁREA DE ESTUDIO

La bahía de Mochima se encuentra enmarcada en el Parque Nacional Mochima, región Nororiental de Venezuela, entre las poblaciones de Puerto La Cruz y Cumaná. Sus coordenadas geográficas son $64^{\circ} 19' - 64^{\circ} 22'$ longitud Oeste y $10^{\circ} 20' - 10^{\circ} 24'$ latitud Norte (Kato, 1961; Okuda y col. 1968) (Fig. 3).

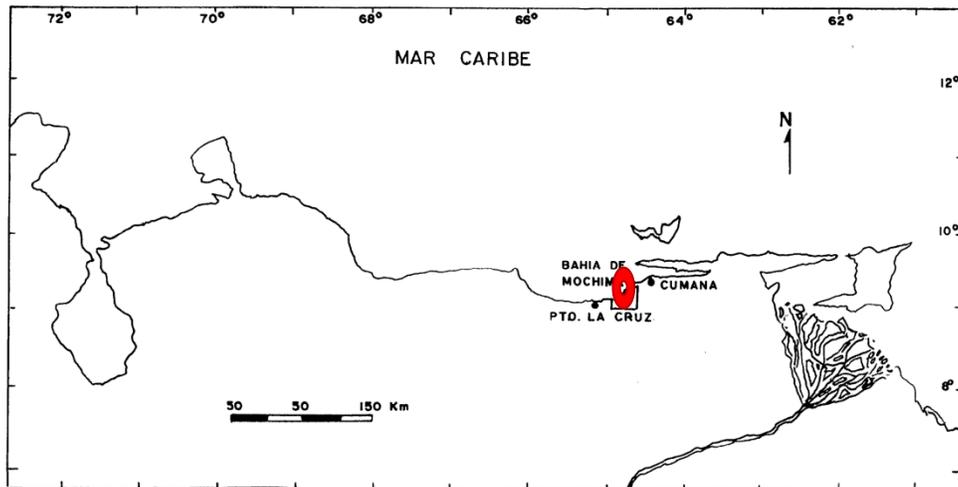


Fig. 3. Localización geográfica de la bahía de Mochima, Edo. Sucre.

El clima de esta zona costera es el típico del litoral venezolano con temperaturas altas, precipitaciones escasas, radiación solar elevada y constante, con influencia de los vientos. La temperatura del aire oscila entre 26 y 28°C , con un promedio anual de $26,6^{\circ}\text{C}$, mientras que la precipitación anual se encuentra entre 250 y 577 mm (Apéndice 3). Toda el área está influenciada por los vientos alisios del NE que disminuyen su intensidad en la noche y durante la estación lluviosa. Presenta un período de lluvias entre mayo y noviembre con temperaturas máximas, siendo los meses de mayor precipitación julio, agosto y noviembre, el

cual se alterna con un período de sequía entre diciembre y abril, siendo marzo el mes de menor precipitación (Dirección de Hidrología y Meteorología del M.A.R.N.R, 1994; Atlas de Venezuela PDVSA, 1994).

Descripción del Sistema de Tratamiento de Aguas Residuales de Mochima

En el extremo sureste de la bahía se encuentra el centro poblado de Mochima con 140 casas y 1.117 habitantes (Parilly, 2000). Al final de la calle principal se encuentra un sistema de tratamiento de aguas residuales que descarga directamente al mar. Este sistema fue diseñado inicialmente en 1982 como una solución para la disposición de las aguas residuales de una población de 520 habitantes, con una capacidad máxima para 1.000 personas (Expósito, 1997).

El sistema está constituido por 2 tanques sépticos con 2 cámaras de 300 m³ y un sistema de lagunas de estabilización u oxidación aireadas (Apéndice 2), conformadas por un total de cinco celdas separadas por muros de bloques (para evitar áreas muertas). La primera laguna actúa como laguna facultativa (donde se oxida la materia orgánica disuelta), mientras que la última funciona como una laguna de maduración (en la cual se eliminan los coliformes).

Existe un colector de descarga de 250 mm de diámetro, que termina en una cámara de rejillas de una estación de bombeo. Desde este colector el caudal es enviado a un tanque séptico. El efluente pasa al sistema de lagunas de estabilización que tienen una superficie de agua de 2477 m² con una profundidad de 1,30 m y un volumen de 2.882 m³, equivalente a un tiempo de retención de 14,4 días a pleno servicio. Parte de los efluentes de este sistema son descargados

continuamente a la bahía a una profundidad de 12 m, mediante una tubería submarina de hierro dúctil de 150 mm de diámetro y 150 m de largo, con una capacidad de 13 L/s (Expósito, 1997). La figura 4 muestra algunas imágenes del sistema de lagunas de oxidación de la planta.

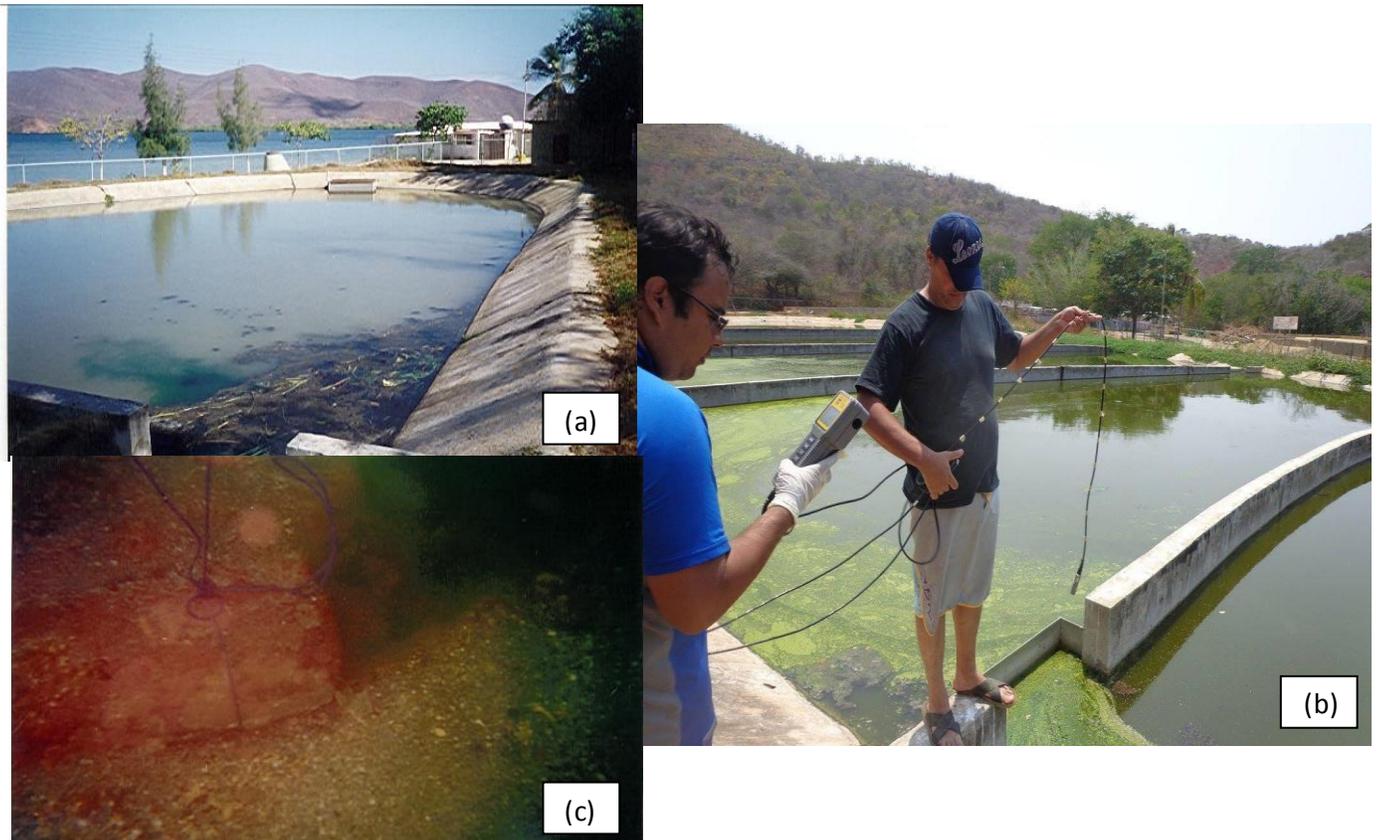


Fig. 4. a) Vista de la laguna final de descarga a la bahía. b) Sistema de lagunas en serie. c) Tubo de descarga a la bahía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos de campo

Se efectuó una visita de reconocimiento a la zona de estudio para ajustar el diseño de muestreo. Luego se realizó una evaluación de los diferentes métodos de diseño para lagunas, con el propósito de desarrollar un análisis del estudio del sistema.

En base a observaciones realizadas en el sitio, se pudo constatar que existen algunos problemas en partes específicas del sistema que impiden y dificultan su adecuado funcionamiento. Uno de los aspectos a destacar es la falla del sistema de bombeo del agua residual cruda al tanque séptico, lo que origina una operación de alimentación deficiente al sistema de tratamiento y por lo tanto la acumulación del agua residual en el pozo de bombeo, generando un cambio en las características del agua residual. Otro de los problemas observados durante la inspección fue la gran acumulación de los sedimentos en los dos tanques sépticos, ocasionando el paso difícil del agua a través de los mismos, generando olores desagradables. Además, en las lagunas disminuyó el volumen de las mismas y por ende el tiempo de retención. Al disminuir dicho tiempo de retención necesario, el agua es vertida sin el tratamiento apropiado.

A partir de lo anterior, se recolectó la información primaria de datos climatológicos e hidrológicos del lugar y aspectos constructivos del sistema. Posteriormente, se procedió con los muestreos de campo y el trabajo de laboratorio.

De acuerdo a la visita de reconocimiento realizada a la zona de estudio, se estableció un diseño 2 x 2 x 6 (que se traduce en 2 meses x 2 muestras x 6 lagunas), lo que determinó la colección de 24 muestras de fitoplancton divididas en dos meses (dos muestras en cada laguna de oxidación de la planta de tratamiento de aguas residuales, 12 por cada periodo de muestreo: marzo y diciembre de 2016). El tipo de muestreo realizado fue conglomerado bietápico (muestras con submuestras). Las muestras se colectaron con una botella Van Dorn de 2 L y fijadas *in situ* con solución de lugol.

En cuanto a las variables fisicoquímicas, se hizo empleo de una sonda YSI-30 para determinar conductividad y temperatura del agua. El pH fue determinado con un pH-metro ORION y la turbidez en un turbidímetro THERMO ORION AQ2010 por el método nefelométrico. Finalmente, en cada laguna se tomaron dos muestras de agua con botellas DBO-DQO para su análisis posterior en laboratorio. Las muestras para determinación de demanda química de oxígeno (DQO) fueron fijadas *in situ* con ácido sulfúrico 98% v/v (2 gotas/100 ml) y las de demanda biológica de oxígeno (DBO5) mantenidas en refrigeración hasta su traslado al laboratorio.

Métodos de laboratorio

En laboratorio, las muestras de fitoplancton fueron sedimentadas en cilindros graduados de 1L por 48 h. Posteriormente se concentraron hasta 100 ml por transporte pasivo (capilaridad + gravedad), y de éstas se tomaron alícuotas de 10 ml en cámaras tubulares Utermöhl para su observación en un microscopio invertido LEICA DMIL y cuantificadas por el conteo por bandas (Utermöhl, 1958).

La densidad poblacional quedó establecida en células por litro (células/L), a partir de la ecuación:

$$D = \frac{S}{l \cdot a \cdot V} N \cdot 1000$$

Donde:

D = densidad poblacional de una especie fitoplanctónica.

S = superficie o área de la base circular de la cámara (πr^2).

l = longitud de la banda contada, la cual corresponde al diámetro de la base de la cámara (2 cm).

a = ancho de la banda, el cual depende del aumento del objetivo donde se observará la muestra.

V = volumen de la cámara (10 ml).

N = número de células contadas en la alícuota de 10 ml.

El ancho de la banda fue medido con una escala de referencia grabada en un portaobjetos. Para cada objetivo se obtuvieron los siguientes valores:

10x: a = 2 mm.

20x: a = 0,99 mm.

40x: a = 0,5 mm.

Por su parte, la identificación taxonómica se realizó con descripciones y claves especializadas en los diferentes taxones (Ortega, 1984; Bold y Wynne, 1985; Dudgeon, 2015), además de ilustraciones y micrografías electrónicas de barrido.

La demanda biológica de oxígeno (DBO5) se determinó con un cultivo de bacterias incubadas por 5 días en botellas DBO a 20°C. Se determinó la

concentración de oxígeno al inicio y final del experimento con una sonda HORIBA U-10 y se estableció el cociente, el cual fue referido a una escala para la caracterización de la calidad de agua. También se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) por el método de titulación con dicromato de potasio (K_2CrO_7), para obtener un punto final.

Para la realización de los cultivos de cianobacterias, con el fin de obtener cantidades grandes de cianotoxinas, se procedió a la toma de alícuotas de cada una de las muestras, para obtener diluciones hasta 10^{-6} . De éstas se cultivaron en medio rico Luria (Luria-Bertani LB) las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} con un volumen de siembra de 0,1 ml.

Se realizó el estudio genómico de las bacterias presentes en las muestras de agua, por la amplificación del gen ribosomal 16S usando los primers para bacteria forward U1 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' y reverse U2 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3' (Urbach y col., 1992). Para la purificación del ADN bacteriano se limpió la muestra con una membrana Millipore y se centrifugó 6 min a 4000 rpm. La muestra fue dejada en buffer TE durante una noche a $-20^{\circ}C$. Al día siguiente, se agregó etanol a una concentración de 75% v/v y se centrifugó 6 min a 4000 rpm, la muestra una vez más fue resuspendida en buffer TE. Posteriormente fueron añadidos 200 μ l de buffer recomendado por Wu y col. (2000) y se procedió a mezclar por pipeteo, para luego colocar en Termomix a $45^{\circ}C$ por 30 min a 300 rpm y centrifugar a 10.000 rpm por 2 minutos. Se tomó el sobrenadante, descartando el pellet. A dicho sobrenadante se le agregó un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (28:25:1), mezclando por inversión para centrifugar a 10.000 rpm por 2 minutos.

Una vez obtenidas las fases, se tomó la fase acuosa y se procedió de nuevo a la mezcla, ahora con solución cloroformo : alcohol isoamílico : agua (24:1:25), para luego centrifugar por 3 min a 15.000 rpm y tomar la fase acuosa, a la cual se le agregó alcohol isoamílico 75% v/v a igual volumen, para dejar toda la noche a -20°C. Al siguiente día se centrifugó por 5 min a 15.000 rpm a 4°C, descartando el sobrenadante y realizando lavados con etanol 75% v/v dos veces. Una vez lavado se secó en un speed vacuum y se le agregaron 20 µl de agua para PCR. La cantidad y eficiencia de ADN extraído se midió con un biofotómetro Eppendorf 6131.

Finalmente, se obtuvieron las toxinas mediante un protocolo de extracción de toxinas celulares, el cual consistió en extraer de la muestra madre una alícuota de 1,5 ml que fueron filtrados en una membrana millipore (diámetro de poro = 0,8 µm), quedándose con la fase líquida de aproximadamente 1 ml. Luego, se centrifugó a 3.500 rpm por 30 minutos, el centrifugado se trató con 10 µl de solución de lisis comercial FastBreak™ Promega diluida a 1x. El mismo se colocó en un termomix a 100°C por 1 min y se volvió a centrifugar por otros 30 min a 3.500 rpm, donde luego se tomaron 10µl y se mezclaron con 20 µl de buffer cargado. Se realizó este protocolo con cada una de las 12 muestras.

Una vez preparadas las muestras, se cargaron en un gel de poliacrilamida de 18% p/v y tras la electroforesis se visualizaron las bandas de proteínas mediante tinción específica con azul de Coomassie. Se utilizó un patrón de pesos moleculares comercial Amersham™ RPU755, para poder identificar las proteínas visualizadas (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades empleadas para 1 gel.

	Gel de Apilamiento	Gel de Corrida
Agua	2 ml	1,5 ml
Acrilamida	600 µl	6 ml
Buffer Tris-SDS	400 µl	2,5 ml
Urea	0	3 g
Persulfato amónico	0,14 g	0,15 g
TEMED	7 µl	30 µl

Análisis de resultados

Se construyeron gráficas de barra para comparar las variables fisicoquímicas y abundancias de los taxones y concentraciones de toxinas en los diferentes sistemas de lagunas de oxidación y ambos meses de muestreo. Un Analisis de Varianza de dos vías ($\alpha = 0,05$) permitió establecer la existencia o no de diferencias significativas entre las medias poblacionales, donde las variables independientes o factores son las lagunas y los meses, mientras que la dependiente es la abundancia de una especie de cianobacteria.

Como índice beta para determinar la presencia o no de un gradiente a lo largo de las lagunas, se utilizó el índice de Whitthaker (1972):

$$\beta_w = \frac{S}{\alpha} - 1$$

Donde:

S = riqueza total de dos estaciones contiguas.

α = riqueza media de las muestras sin tomar en cuenta sus abundancias relativas.

Para establecer relaciones entre variables fisicoquímicas y biológicas (abundancias), se aplicó un Análisis de Componentes Principales (ACP), a partir de una matriz de correlación. Previamente, se determinaron coeficientes de variación (CV) para ordenar jerárquicamente (de menor a mayor CV) las variables que entraron al análisis, con eliminación de aquellas que resultaron tener valores muy bajos (como especies raras). Los datos utilizados fueron sólo los de diciembre, puesto que fue el único mes donde se determinaron turbidez, DBO5 y DQO. Se utilizó el programa PAST para la ejecución de este análisis multivariado.

RESULTADOS

Variables fisicoquímicas

A continuación, se describen los datos obtenidos con relación a las variables ambientales determinadas en cada una de las lagunas para los meses de marzo (sequía) y diciembre (transición de lluvia a sequía) de 2016. La figura 5 muestra los valores medidos en cada una de las lagunas con respecto al pH, donde en ambos periodos se obtuvieron valores que corresponden a pH ácidos, con un aumento desde la laguna 1, en la cual desembocan los desechos, hasta la laguna final 6 que libera su carga al mar. En diciembre los valores de pH son notablemente mayores que marzo.

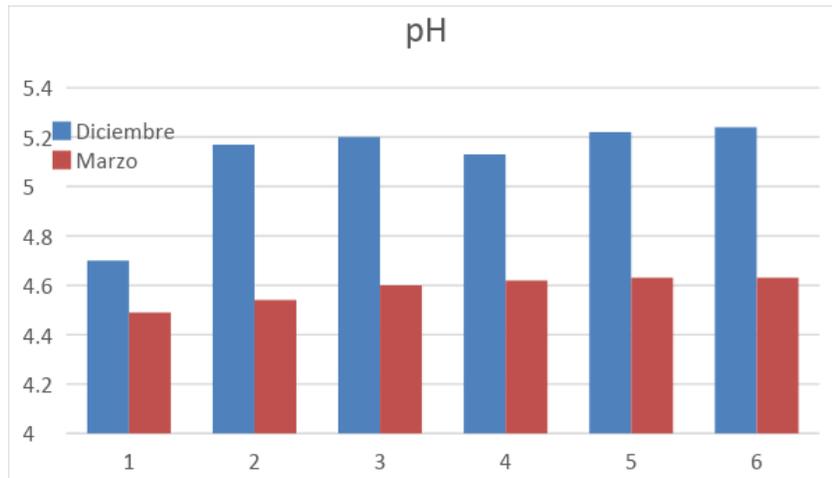


Figura 5. Valores de pH de las lagunas en las dos épocas de muestro.

Con respecto a la temperatura, en ambas épocas se observa un aumento desde la laguna 1, donde confluyen las aguas residuales, hasta la laguna 6 que descarga a la bahía. Los resultados son ligeramente mayores en marzo que en diciembre (Fig. 6).

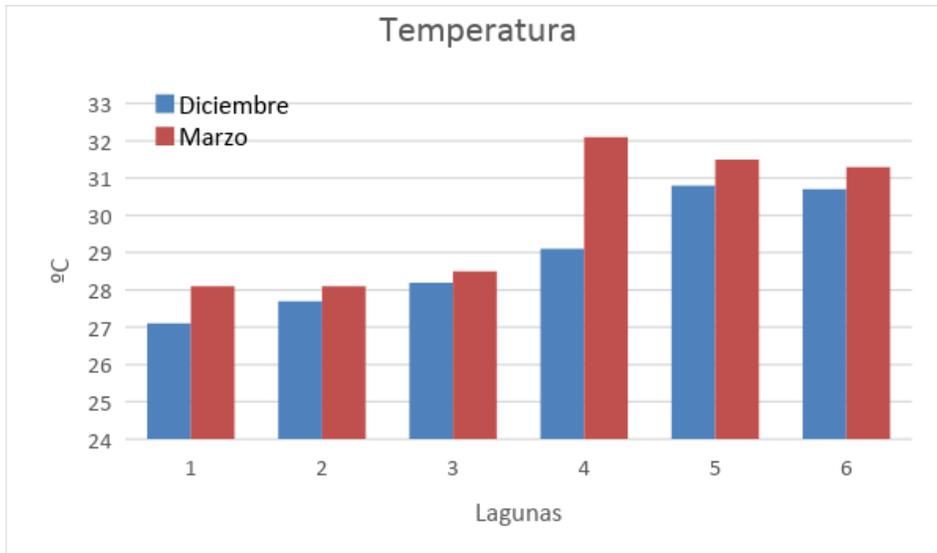


Figura 6. Valores de temperatura para los periodos de lluvia y sequía.

La conductividad presenta valores muy similares en ambos periodos, con registros mayores en las dos últimas lagunas (Fig. 7).

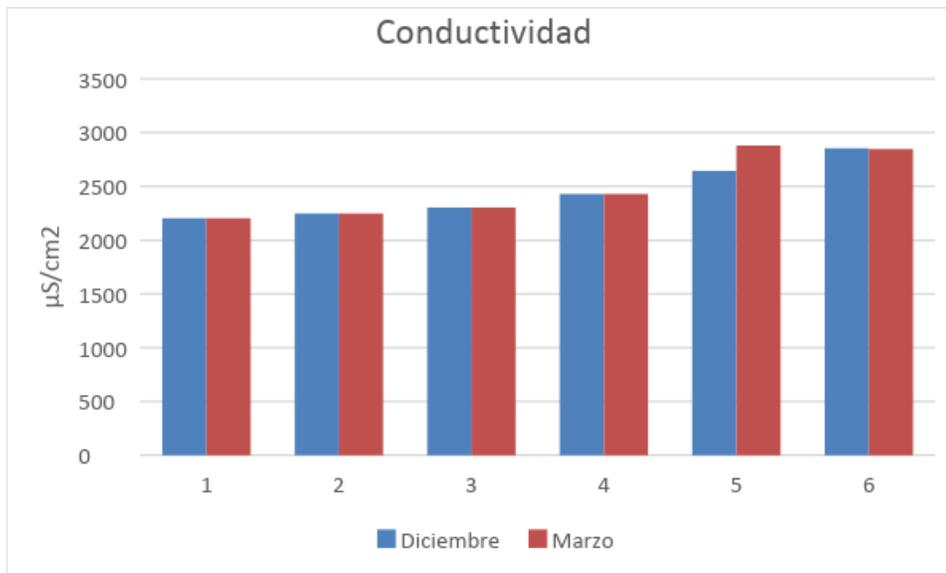


Figura 7. Valores de conductividad en las lagunas para los periodos de lluvia (diciembre) y sequía (marzo).

En la Figura 8 se observan los datos de turbidez, representados en unidades nefelométricas, los cuales fueron tomados en cada una de las lagunas

solamente en el mes de diciembre. En el mismo se puede notar que hay una disminución marcada de la turbidez a lo largo de las lagunas.

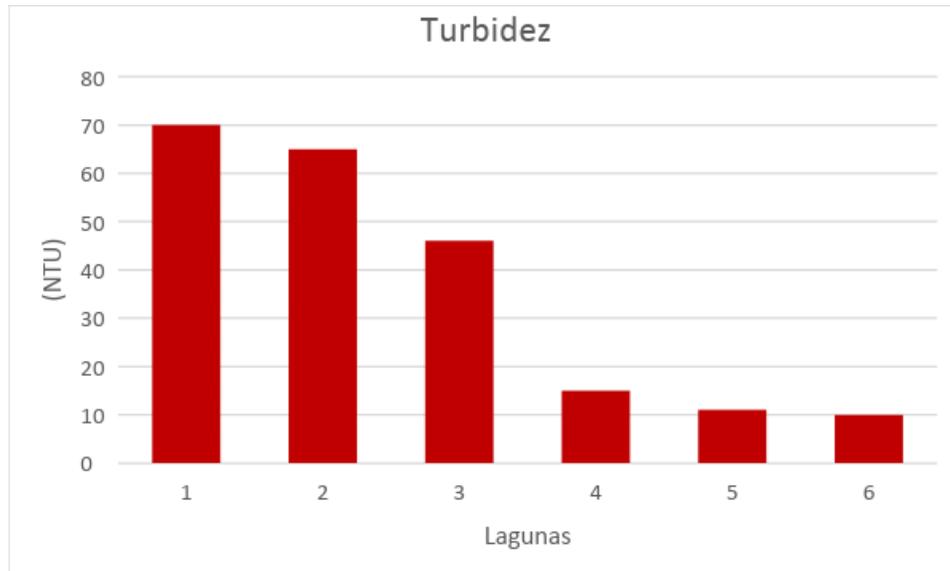


Figura 8. Valores de turbidez en las lagunas para el mes de diciembre.

Las demandas bioquímica y química de oxígeno fueron sólo determinadas en diciembre, resultando ambas mayores en la laguna 1. En la figura 9 se aprecia cómo disminuyen sostenidamente a lo largo del resto de las lagunas.

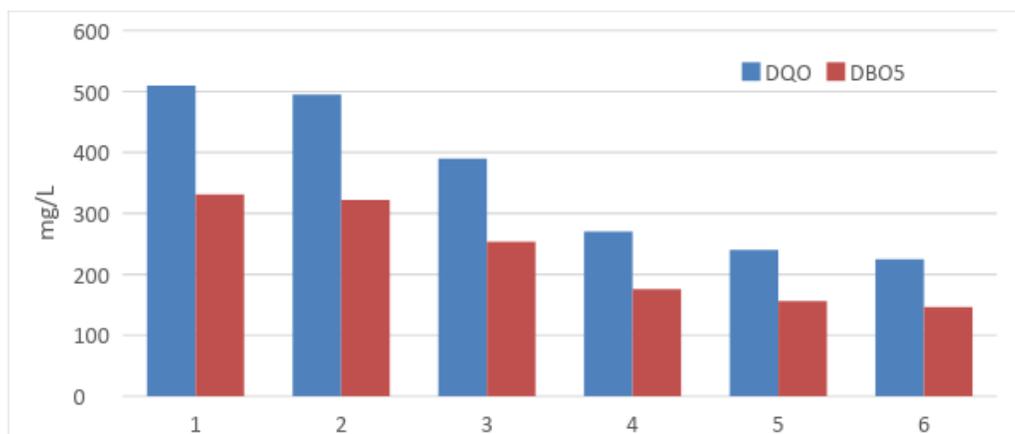


Figura 9. Valores de DBO5 y DQO de las lagunas de oxidación en diciembre.

Identificación y cuantificación de cianobacterias

En la Tabla 3 se presentan las especies fitoplanctónicas registradas durante las dos épocas de muestreos. Se obtuvieron en total 16 especies repartidas en: 7 especies de Cyanobacteria (5 géneros) destacando las especies *Microcystis aeruginosa* y *Chroococcus minutus* observadas en todas las lagunas; 2 especies de Euglenophyta (1 género) encontradas mayormente en las últimas 3 lagunas en la época de lluvia; 1 especie de Chlorophyta (1 género), al igual que las anteriores sólo encontradas en las últimas 3 lagunas en diciembre; 5 de Bacillariophyta (4 géneros) y 1 especie de dinoflagelados (1 género). La Laguna más rica en especies fue la 6, con un total de 13 registradas, seguida por la 1 (7 especies), mientras que la que presentó riqueza menor fue la 2 con 3 especies halladas.

Tabla 3. Especies fitoplanctónicas encontradas en las lagunas (X = presencia).

LAGUNA	MARZO						DICIEMBRE						
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
Especies	CYANOBACTERIA												
<i>Chroococcus minutus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Lyngbya lutea</i>			X										
<i>Nostoc commune</i>	X		X			X							
<i>Nostoc pruniforme</i>						X							
<i>Microcystis aeruginosa</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Microcystis flo. aquae</i>		X	X	X	X	X		X					

Tabla 3. Continuación.

LAGUNA	Marzo						Diciembre					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<i>Merismopedia glauca</i>	X	X	X									
EUGLENOPHYTA												
<i>Euglena guentheri</i>						X				X	X	X
<i>Euglena granulata</i>						X				X	X	X
CHLOROPHYTA												
<i>Chlorella saccharophila</i>										X	X	X
BACILLARIOPHYTA												
<i>Coscinodiscus</i> sp.				X	X	X				X		X
<i>Fragillaria cylindrus</i>					X	X				X		X
<i>Fragillaria</i> sp.	X			X	X	X	X	X		X	X	X
<i>Pinnularia gibba</i>		X					X	X				
<i>Rhizosolenia</i> sp.						X						
PYRROPHYTA O DINOFLAGELLATA												
<i>Ceratium massiliense</i>	X	X			X		X	X			X	X

En la figura 10 se observa la distribución porcentual de los géneros de cianobacterias totales encontradas entre los dos muestreos. El género más encontrado es *Microcystis* (51%) seguido de *Chroococcus* (45%).

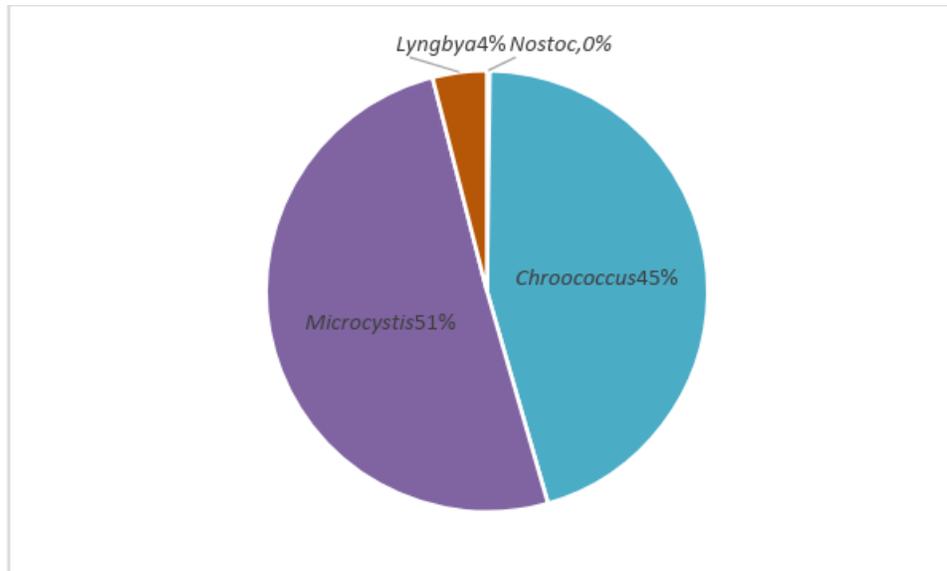


Figura 10. Composición porcentual de los géneros más importantes de cianobacterias.

En la figura 11 se presentan las abundancias de géneros de cianobacterias encontrados en marzo, donde el valor más alto corresponde a *Microcystis* con $4,6 \times 10^6$ cél./L en la laguna 1. De igual manera, la densidad mayor de *Chroococcus* también se encuentra en la laguna 1. Se observa como la cantidad de cianobacterias disminuye conforme se avanza por las lagunas.

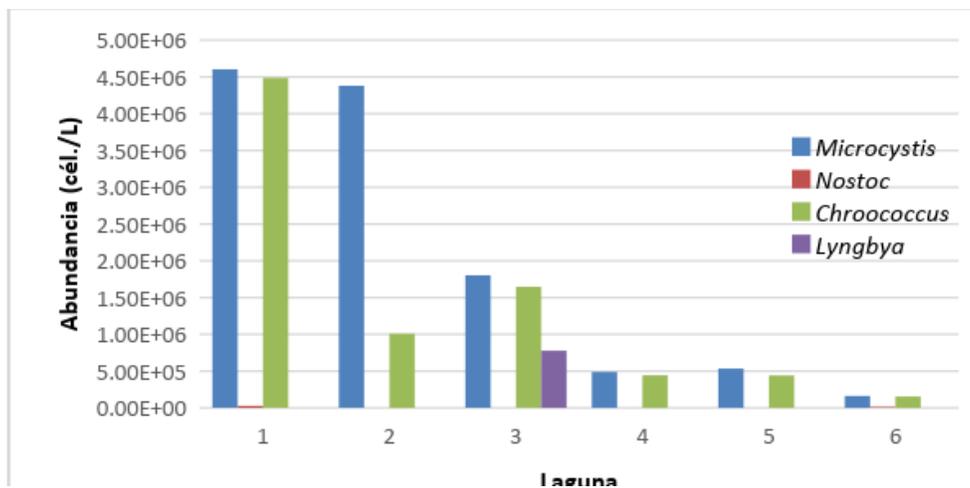


Figura 11. Abundancias de géneros presentes en marzo.

Por su parte, en la figura 12 se evidencia que las abundancias de cianobacterias en diciembre son menores a las registradas en marzo. El valor más alto corresponde al género *Microcystis* en la laguna 1 ($9,65 \times 10^5$ cél./L), al igual que *Chroococcus*. Como en el caso del mes de marzo, se observa una gran disminución de las densidades de cianobacterias conforme se avanza por las lagunas.

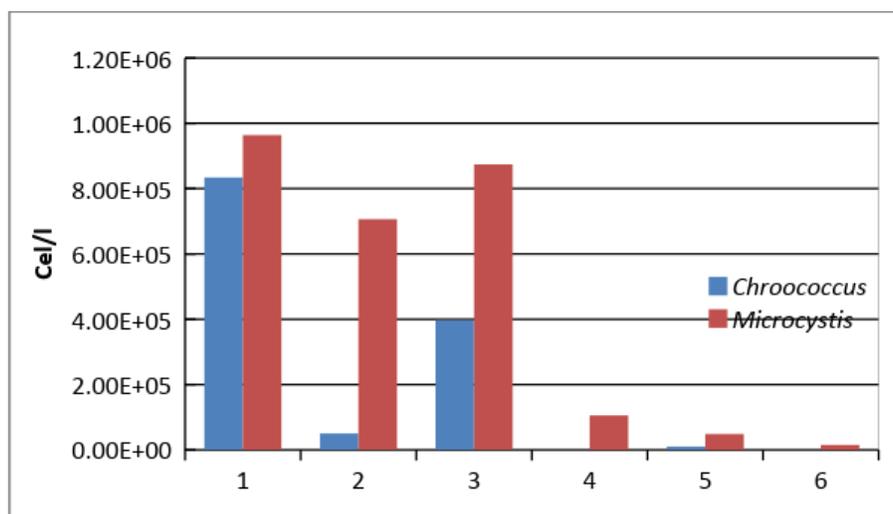


Figura 12. Abundancias de géneros presentes en diciembre.

Se realizó un cultivo en medio rico de las muestras de agua, en el cual se consiguió un título bacteriano de 3×10^5 ufc/ml.

Luego de realizar la extracción de ADN bacteriano se determinó la eficiencia del aislamiento, así como la cantidad de ADN extraído. En la tabla 4 se muestra como la cantidad de ADN va disminuyendo conforme se avanza en las muestras.

Tabla 4. Cantidad y pureza de las muestras de ADN bacteriano.

Laguna	Eficiencia del aislamiento (μg ADN)	Promedio A260/A280	Promedio A260/A230
1	126	1,78	2,07
2	64	1,74	2,17
3	56	1,75	2,2
4	41	1,74	1,94
5	38	1,81	2,1
6	32	1,81	2,1

En la figura 13 se observan los carriles de un gel de agarosa (0,8%) donde los carriles 1-6 son las muestras y el carril 8 contiene el marcador molecular, comprobando los resultados obtenidos por el biofotómetro.

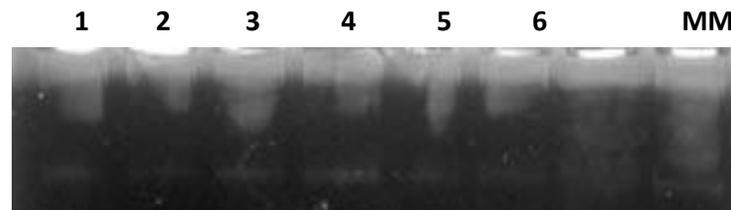


Figura 13. Gel de agarosa (0,8%) para análisis de las muestras de ADN aislado.

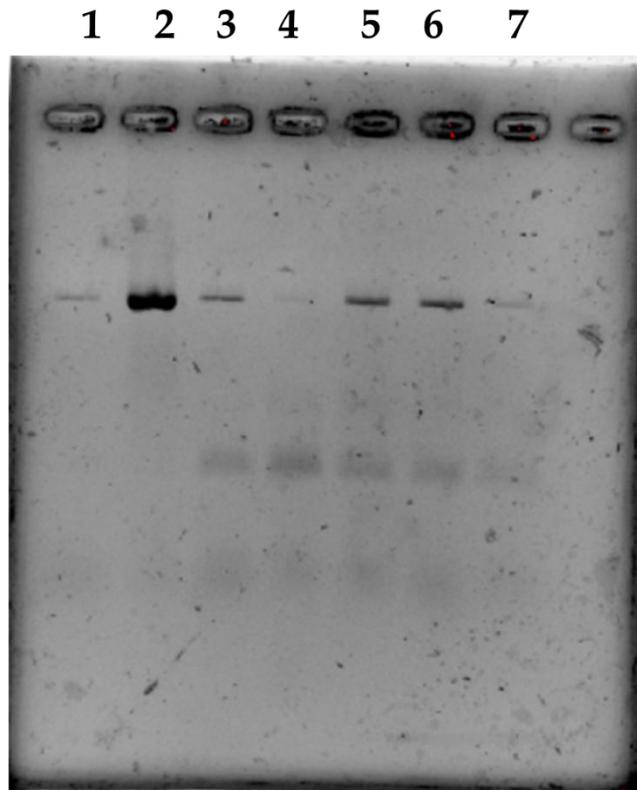
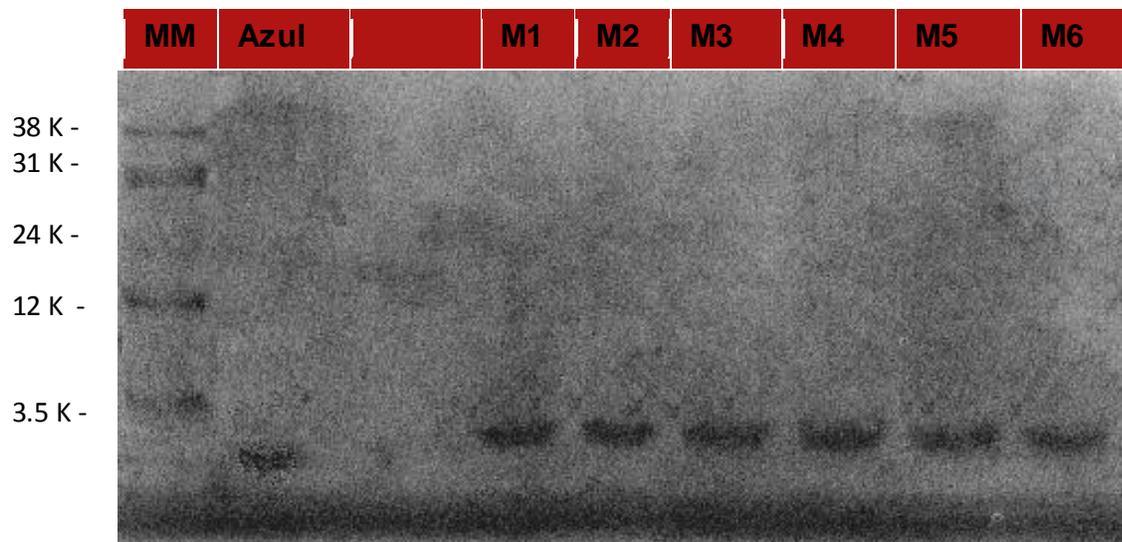


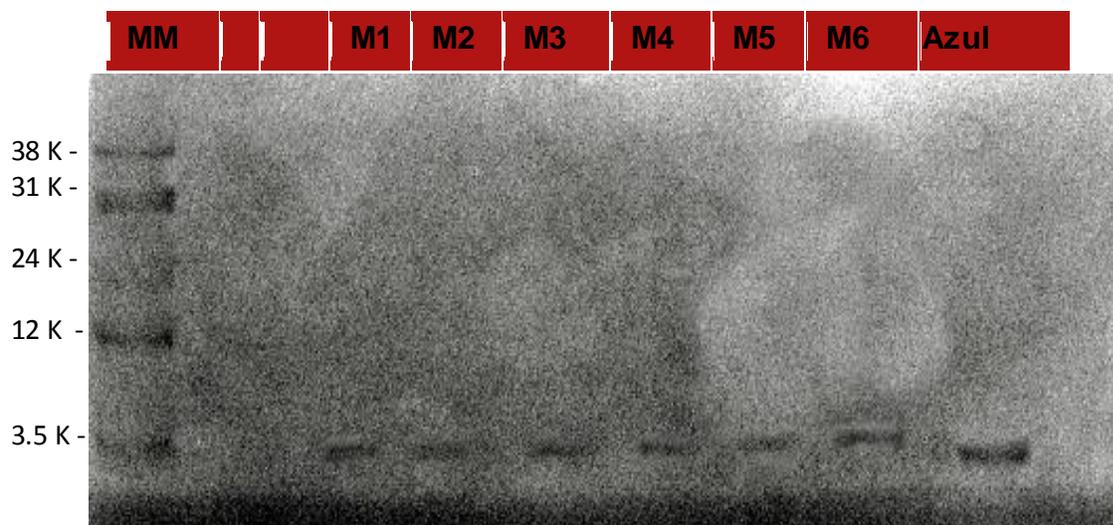
Figura 12. Gel de agarosa (1%) con la amplificación del gen 16S RNA

En la figura 12 se observan los carriles de un gel de agarosa (1%) donde el carril 1 es el control, los carriles 2-7 son las muestras y el carril 8 contiene el blanco, comprobando molecularmente la presencia de bacterias.

Finalmente se extrajeron y purificaron las microcistinas de las muestras y en la figura 14 se aprecian los geles de poliacrilamida para los meses de diciembre y marzo. Se observa que hay una disminución en la cantidad de toxinas conforme se avanza en las lagunas, ya que la nitidez de la banda es cada vez menor. De igual manera, entre los meses también se nota una diferencia entre las bandas.



a



b

Figura 14 a) Gel de poliacrilamida (18%). Microcistinas purificadas para el mes de marzo donde el primer carril es el marcador de peso molecular, el segundo es azul de bromofenol y del 5 al 10 son las muestras. b) Gel de poliacrilamida (18%). Microcistinas purificadas para el mes de diciembre donde el primer carril es el marcador de peso molecular, del 4 al 9 son las muestras y el 10 es azul de bromofenol.

Análisis estadístico

Un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (meses y lagunas como factores o variables independientes y abundancia como variable respuesta o dependiente) fue realizado para cada una de las especies más abundantes (*Chroococcus minutus* y *Microcystis aeruginosa*).

En el caso de *M. aeruginosa* se obtuvo un $p=0,10$ para el análisis entre los meses, es decir, un $p>0,05$ que indica que no hay diferencia significativa en las densidades poblacionales de esa especie entre los meses. De igual manera, para el análisis entre las lagunas se obtuvo un $p=0,25$, por lo que tampoco hay diferencia significativa entre las lagunas.

Asimismo, en el caso de *C. minutus* entre los meses, tampoco se encontró una diferencia significativa, con un $p=0,08$ entre meses y $p=0,19$ para las lagunas. De esta forma se demuestra que durante ambos meses y en todas las lagunas no existen diferencias significativas en cuanto a la abundancia de *C. minutus*.

El índice de diversidad β calculado para las lagunas arrojó un valor de 0,81, lo que indica un reemplazo parcial de las especies, ya que se acerca al valor tope 1 de reemplazo total de especies (Ricklefs y Miller, 1999).

En la figura 14 se muestra el biplot de los dos primeros componentes principales del ACP. Este análisis permitió hacer una reducción dimensional del sistema multidimensional original, puesto que los dos primeros componentes

resumen 93% de la varianza o inercia total del sistema multidimensional original. Se evidencia que *M. aeruginosa* estuvo relacionada más fuertemente al primer componente principal que el resto de las variables, la mayoría de las cuales se orientaron al segundo componente principal. Esta especie de cianobacteria estuvo positivamente correlacionada con la turbidez y en forma negativa con la conductividad y temperatura. La segunda especie de cianobacteria abundante, *C. minutus*, se relacionó con el segundo componente principal y en forma positiva con la conductividad y temperatura, mientras que lo hizo negativamente con el pH. Adicionalmente, se puede evidenciar que *C. minutus* está más próxima a la laguna 1 y *M. aeruginosa* a las lagunas 2 y 3.

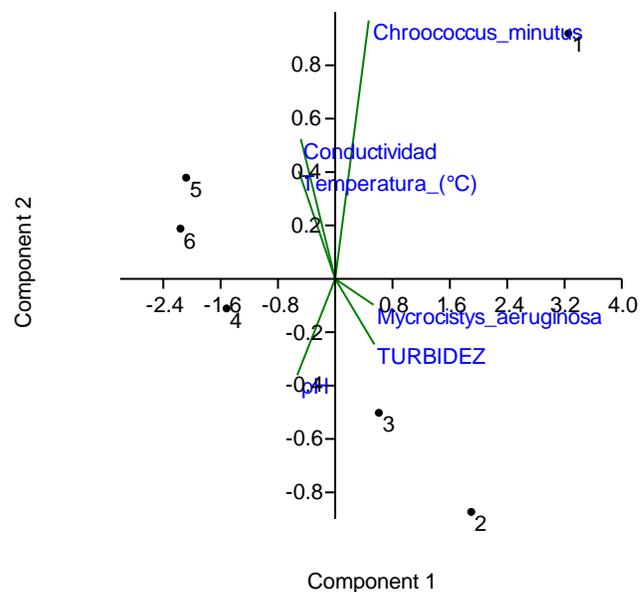


Figura 14. Biplot del ACP para los dos primeros componentes principales. Estos ejes concentraron 93% de la varianza del sistema multidimensional original. Los puntos representan los casos (lagunas) y los vectores corresponden a las varianzas de cada una de las variables.

DISCUSIONES

Análisis ecológico y sanitario

En las lagunas de oxidación de la bahía de Mochima ocurren procesos bióticos y abióticos que transforman los compuestos químicos provenientes de los efluentes domésticos que llegan a las lagunas, esto se refleja en los valores de las variables fisicoquímicas y las demandas química y bioquímica de oxígeno obtenidas en este trabajo. De igual manera, la composición y abundancia de especies fitoplanctónicas reflejan un estado de eutrofización por los aportes y acumulación de materia orgánica y enriquecimiento con nitrógeno y fósforo provenientes de detergentes y otros desechos contenidos en los efluentes.

Comenzando con las variables fisicoquímicas, respecto a los valores de pH obtenidos entre los dos meses de estudio, se puede decir que en diciembre hubo un efecto de dilución, por ser un mes contiguo a finales de lluvia y los valores de pH variaron de ácidos en marzo a ligeramente ácidos. De igual manera los valores de pH aumentan en función del avance de las aguas en las lagunas; en la laguna 1 donde desembocan los desechos domésticos con una gran carga de materia orgánica y detergentes, la actividad bacteriana es muy elevada, concomitante a tasas altas de procesos oxidativos de los compuestos de las aguas que ayudan a tener valores ácidos por la expulsión de CO₂ como parte del metabolismo de las bacterias aerobias, el cual reacciona con el agua produciendo ácido carbónico (Guzmán, 2011; Chorus y Bartram, 1999; Córdova, 2009).

Cuando ocurre una disminución de la biomasa bacteriana de una pileta a otra, los procesos se van reduciendo por un descenso de la actividad bacteriana, lo que responde a las disminuciones observadas de los valores DBO5 y DQO, así como los aumentos evidenciados de pH por reducción de la descomposición orgánica.

Los valores de DBO5 y DQO que se obtuvieron en la primera laguna se corresponden con los de aguas residuales domésticas que presentan un grado medio de contaminación, como lo reportado por Metcalf y Eddy (1985). El comportamiento observado es correspondiente a los valores que se deben obtener en este tipo de sistemas (Correa, 2008). De igual manera, la precipitación también influye, pues el efecto inmediato de la lluvia es provocar un aumento en la entrada de agua al sistema, por lo que el tiempo de residencia del agua disminuye. Cuando la lluvia es fuerte, la turbulencia que ésta genera da lugar a mezclas de las aguas de las lagunas. Como consecuencia de esto, el oxígeno disuelto suele bajar después de las tormentas, lo que es debido a la demanda adicional de oxígeno producido por sólidos arrastrados por el agua de lluvia y los sedimentos de las lagunas que se mezclan con la columna de agua. En estas condiciones, el tiempo de retención en las lagunas disminuye y los valores de DBO5 y DQO tienden a aumentar a sus valores normales (Djajadiningrat, 1981).

Otro aspecto importante a tomar en cuenta es el aumento en la conductividad, lo cual tiene que ver con la mayor disponibilidad de nutrientes en la columna; se puede inferir que como en las primeras lagunas hay una alta

concentración de organismos los nutrientes son consumidos más rápidamente, por lo que hay menor disponibilidad de los mismos. Debido a ello existe un menor nivel de conductividad, aunque estas lagunas pueden poseer una mayor carga interna de nutrientes por la entrada bruta de compuestos y el largo tiempo de retención, lo que determina la anoxia en la columna, produciendo la liberación de compuestos químicos reducidos desde el sedimento (Correa, 2008).

La presencia cuantiosa de organismos y nutrientes en las primeras lagunas puede ser evidenciada por los valores nefelométricos de turbidez observados, los que van disminuyendo conforme se pasa de una laguna a otra. Por ser medidas nefelométricas, la consideración es de toda partícula suspendida en la columna, por lo que dicha disminución en la turbidez concuerda con los resultados obtenidos de abundancia de especies, siendo la mayor concentración para las primeras lagunas, disminuyendo conforme se avanza a las que se supone son en comparación más “limpias” (González y col., 2004; Wetzel, 2001). En este mismo sentido, la disminución progresiva de la turbidez puede significar una retención importante de sedimentos y sólidos en suspensión de un compartimento lagunar a otro.

Por otra parte el aumento de la temperatura observado hacia las últimas lagunas, se puede explicar porque la luz incidente generalmente se asocia a un aumento de la temperatura en un cuerpo de agua más somero y expuesto, lo que es un factor importante en el desarrollo de las cianobacterias (Chorus y Bartram, 1999). Al haber un aumento de la biomasa bacteriana ocurre acumulación de las

colonias en la superficie formando flóculos, los cuales generan un efecto de sombreado sobre los organismos en la columna, por tanto disminuyen la incidencia de luz en la misma y así la temperatura también se reduce (Vollenweider, 1974; Moreno, 1984). Cuando se avanza en las lagunas, la biomasa bacteriana disminuye tanto en la columna como en la superficie, siendo esto lo que genera que la incidencia solar sea mayor y lo más probable es que genere estos aumentos en la temperatura, ya que dichas variaciones son graduales y no poseen gran diferencia. De igual manera, se evidencia que hay una diferencia entre los meses de marzo y diciembre, donde los valores de temperatura del primero son mayores (época de sequía), contrario a los valores observados en el segundo, en el que luego de una época lluviosa por efecto de dilución y mezcla de aguas ocurre una disminución en la temperatura. Sin embargo, en ambas épocas se observa la misma tendencia de aumento paulatino hacia las lagunas con menos biomasa bacteriana, como lo reseñan estudios en otros sistemas por parte de la OMS (1987).

La composición y abundancia del fitoplancton corresponden con la de un sistema eutrofizado. La descarga de las aguas de desecho provoca una eutrofización cultural, produciendo aumentos en la cantidad del fitoplancton y en la proporción de cianobacterias (Infante, 1988). Las cianobacterias y euglenofitas en este sistema son las especies dominantes, por su capacidad de vivir y adaptarse a factores extremos (Chorus y Bartram, 1999). En estos cuerpos de agua se suelen encontrar valores bajos de transparencia, concentraciones altas de nutrientes (en

especial de P y N) y valores altos de producción primaria (Infante, 1988), confirmando los resultados obtenidos en este estudio.

Para la época de sequía, donde se presentan los valores más bajos de pH, se observa una gran dominancia de cianobacterias. En cambio, los resultados obtenidos en diciembre muestran que el efecto de dilución causado por la lluvia provoca el desplazamiento de las cianobacterias por las clorofitas y euglenofitas. Estos resultados concuerdan con Shapiro (1973; 1990), quien afirma que si el suministro de CO₂ no es limitante, los ambientes acuáticos dominados por las cianobacterias sufren un rápido cambio a un ambiente dominado por clorofitas. La situación de CO₂ limitante se presenta con un pH alcalino y, en este caso, las cianobacterias utilizan bicarbonato como fuente de carbono. Caraco y Miller (1998) encontraron, experimentalmente, resultados similares.

La cianobacteria más abundante encontrada en este estudio para ambos meses es *Microcystis aeruginosa*, la cual es una de las especies más comunes en este tipo de sistemas según reportan Mackenthun y col. (1966). Este resultado nos invita a pensar en la presencia de grandes cantidades de cianotoxinas, ya que *M. aeruginosa* es capaz de producir enzimas que catalizan la producción de grandes concentraciones de sustancias proteicas altamente tóxicas para la salud animal y humana (WHO, 1999). La mayor concentración (cél/L) se encuentra en la primera laguna, lo que tiene sentido, ya que es donde primariamente desembocan las aguas residuales no tratadas. Esta laguna es donde se encuentra la mayor concentración de cianobacterias en ambos meses, dicho efecto de la floración

bacteriana genera un incremento del consumo de oxígeno por la respiración de los organismos. El mayor consumo de oxígeno se produce por la formación de los flóculos en la superficie y también está relacionado con la liberación de H₂S, el cual determina que el agua presente malos olores (Chorus y Bartram, 1999).

En cuanto a la disminución de cianobacterias a lo largo de las lagunas para ambos meses, se evidencia un recambio o reemplazo parcial de las mismas hacia las últimas lagunas por euglenofitas, las cuales suelen ser especies predominantes en sistemas con abundancia de materia orgánica, dada su mixotrofia, además de que la disminución de la demanda bioquímica de oxígeno significó reducción de la descomposición de materia orgánica por parte de bacterias. Este cambio en la composición de especies se puede interpretar como el número de hábitats efectivos que utilizan las mismas y ocupación de nichos poco explotados (Ricklefs y Miller, 2000).

El ACP evidenció que las dos especies de cianobacterias cuantitativamente más importantes estuvieron fuertemente correlacionadas en forma diferencial a diferentes variables fisicoquímicas, lo que confirma los resultados discutidos hasta esta parte y adicionalmente se evidenció la asociación de cada especie a diferentes compartimentos lagunares. Las condiciones abióticas en la primera laguna condicionaron una mayor prevalencia de *Microcystis aeruginosa* en dicho ambiente. *Chroococcus minutus* fue una especie menos tolerante a la turbidez, posiblemente debido a la presencia masiva de la otra especie dominante en el sistema que generó un efecto de apantallamiento, pero sobre todo a pH más

ácido. No obstante *C. minutus* resultó algo más adaptable que *M. aeruginosa* al aumento de temperatura y conductividad, esto posiblemente debido a que, aparte de la disminución del tamaño poblacional de *M. aeruginosa*, la reducción de la actividad microbiana por lo ya explicado en esta discusión propició un número diferencial mayor de nichos (conjunto de recursos) a ser ocupados y explotados, lo que ratifica lo dicho a partir del resultado obtenido del índice de Whittaker.

Por otra parte, tomando en cuenta que la planta de tratamiento no está funcionando adecuadamente, debido a que no posee un difusor de aire, el cual es necesario para que este tipo de lagunas aireadas funcionen, el tratamiento biológico que utiliza el oxígeno generado por la acción de dicho sistema artificial de aireación, no solo cumple el papel de llevar oxígeno a toda la columna de agua, sino también mantener una cierta agitación del agua, lo que evita la formación de flóculos y sedimentos. De igual manera, el flujo de una laguna a otra se está dando por una sección del muro que separa las lagunas que posee menor altura, y está cumpliendo el fin de servir de desagüe y evitar el desborde. Esta situación de transferencia superficial de las aguas es la que probablemente esté provocando la disminución de organismos de una laguna a la otra, ya que solo se estarían pasando los organismos más superficiales que rebosen, similar a un filtración mecánica (Correa, 2008). Los resultados obtenidos expresan comportamientos similares en ambos meses.

Los resultados obtenidos por el sistema de lagunas nos dan a entender que dependen de muchos factores, con base en dichos resultados se puede interpretar que en un sistema bien concebido se debe obtener un efluente de buena calidad,

en el que hay una clara eliminación de DBO, nutrientes, sólidos en suspensión, cierta cantidad de metales pesados y la casi total eliminación de los organismos patógenos (Yáñez, 2003). En términos resumidos, las lagunas con un buen diseño y modo de operación, son más eficaces que los métodos convencionales en el tratamiento de las aguas.

Análisis microbiológicos y moleculares

Al realizar un cultivo en medio nutritivo, se encontró un título bacteriano de bacilos Gram⁻, que si bien no se identificaron taxonómicamente, influyen en las variables antes descritas y presentan una tendencia similar a la disminución en la abundancia de cianobacterias de una laguna a otra.

El análisis del gen 16S rRNA permitió en este estudio corroborar la identificación taxonómica hecha con base a caracteres morfológicos. Se pudo identificar la mayoría de las cianobacterias mediante caracteres morfológicos tradicionales y confirmar su identidad genérica con base en el análisis del gen 16S rRNA (Foster y col., 2009; Keshari y col., 2015),

Los geles de poliacrilamida generados en este estudio fueron dirigidos a la detección de microcistina (una hepatotoxina discutida anteriormente), en ellos se identifica la toxina debido a su peso molecular de 1 kDa (Chorus, 2012; Roset y col., 2001). Para la realización de estos geles primero se estandarizó un protocolo para la obtención de las toxinas y un protocolo de corrida para las mismas, debido

a que en los ensayos preliminares los geles obtenidos no eran apreciables ni distinguibles. El bajo peso molecular dificultó una buena resolución de bandas, ya que tendían a unirse las bandas de carriles contiguos, por lo que se optimizó la formulación del gel con mayor porcentaje de acrilamida y urea como un compactador extra del gel, hasta llegar a obtener una mejor resolución, en la cual se pudieron observar bandas claras que contenían las toxinas purificadas.

Los resultados de la purificación y corrida electroforética demuestran una diferencia entre la concentración de toxinas totales en el agua entre los meses, por la diferencia en el ancho de las bandas; obteniendo las bandas más gruesas en el mes de mayo, lo que coincide con la mayor abundancia de *M. aeruginosa*. El grosor de las bandas obtenidas en el mes de diciembre, aunque menor que en el mes de marzo, también presentan un tamaño de banda considerable, cuando hay menor número de cianobacterias.

Como consideración final es necesario resaltar los riesgos que implica una gran acumulación de esta toxina en el agua, ya que las aguas de la laguna son liberadas a la bahía y a partir de ahí no hay control sobre hacia dónde pueden llegar ni su alcance. Una vez liberados, los efectos en todos los niveles tróficos pueden ser catastróficos, desde el alojamiento en el hígado de un pez, el cual puede llegar a ser consumido por el ser humano y este último contaminarse con dichas toxinas, hasta llegar a convertirse en un riesgo potencial para todos los seres vivos (Chorus y Bartram, 1999; De León, 2002; Expósito y col., 1997; Mur y col., 2014).

CONCLUSIONES

- Las variables fisicoquímicas, DBO5 y DQO encontradas en este estudio corresponden, en términos generales, a un sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas.
- La composición y abundancia del fitoplancton son indicadores de eutrofización en el sistema, con dominancia de cianobacterias en marzo y euglenofitas para diciembre.
- La especie de cianobacteria más abundante es *Microcystis aeruginosa*, y en segundo término *Chroococcus minutus*. No hubo diferencias estadísticas en sus abundancias medias, pero ambas estuvieron relacionadas en forma diferencial a distintas variables fisicoquímicas.
- A pesar de que la planta no posee un funcionamiento adecuado, las concentraciones de cianobacterias disminuyen de una laguna a otra, concomitante a una disminución progresiva de la turbidez. Sin embargo, dichas condiciones representan un riesgo muy elevado para la salud del ecosistema marino y seres humanos.
- El análisis del gen 16S rRNA confirmó la identificación taxonómica de presencia de cianobacterias en gran medida.
- La metodología desarrollada en este trabajo nos permite obtener una mejor resolución al aislar y observar proteínas de bajo peso molecular en geles de poliacrilamida, no solo cianotoxinas sino proteínas en general.
- Las toxinas aisladas de las muestras de agua tienen mayor ancho de banda en el mes de marzo y, aunque en diciembre la concentración de

cianobacterias es menor, sigue siendo relativamente alta en las bandas observadas.

- El funcionamiento de la planta no es el adecuado, ya que las concentraciones de *Microcystis aeruginosa* son más elevadas de lo reglamentario. Por tanto, la concentración de las cianotoxinas liberadas en la bahía, que es zona recreativa y de pesca, también lo son. Esto aumenta el riesgo de exposición tanto para personas como comunidades marinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, J. y Carmichael, W. 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32(12): 1495-507.
- APHA, AWWA, WPCF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19TH Edición. Washinton, D.C.
- Biddanda, B., M. Ogdahl y J. Cotner. 2001. Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic water. *Limnology and Oceanography* 46: 730-739.
- Bold, H. C. y M. J. Wynne. 1985. *Introduction to the Algae*. 1ra. Edición. Englewood Cliffs N.J.: Prentice-Hall, Print. 720 pp.
- Brock, T. D. (1973). Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. *Science* 179: 480-483.
- Caraco, N. F. y Miller, R. 1998. Effects of CO₂ on competition between a cyanobacterium and eukaryotic phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 54-62.
- Cavalier-Smith, T. 2002. The neomuran origin of Archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 7-76.
- Chorus I. 2012. Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment, Risk Management and Regulations in Different Countries. Umweltbundesamt; Berlin.

- Chorus, I y Bartram, J. 1999. Riesgos a la salud causados por cianobacterias y algas de agua dulce en aguas recreacionales. E & FN Spon, London, UK.
- Chorus, I y Bartram, J. 2014. Toxic Cyanobacteria in Water. London: CRC Press.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47: 551 – 578.
- Córdova, S., Gaete, H., Aránguiz, F., & Figueroa, R. 2009. Evaluación de la calidad de las aguas del estero Limache (Chile central), mediante bioindicadores y bioensayos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 37(2), 199-209. <http://dx.doi.org/10.3856/vol37-issue2-fulltext-7>
- Correa, G. 2008. *Evaluación y monitoreo del sistema de lagunas de estabilización del municipio de Santa Fé de Antioquia, Colombia*. Maestría. Universidad de Antioquia, Facultad de ingeniería, departamento de ingeniería sanitaria y ambiental. [Online] Medellín. Disponible en:<<http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/50/1/EvalMonitStmaLagunasStfeAnt.pdf>>[Fecha de consulta: 3 de marzo de 2017]
- Cotner, J.B. 2000. Intense winter heterotrophic production stimulated by benthic resuspension. *Limnology and Oceanography* 45: 1672-1676.
- Cotner, J.B. y B.A. Biddanda. 2002. Small players, large role: Microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5: 105-121.
- De León, L. 2002. Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: Causas y Consecuencias. *Perfil Ambiental del Uruguay*; p. 28-37.

- Djajadiningrat, A.H. 1981. Hydrodynamique et Cinetique Depuration dans les Dassins de Stabilization.Ph.D. Thesis, Universié del Sciences et Ecniques du Laguedoc. Montpellier, Fr.
- Dudgeon, D. 2015. *Freshwater Biology*. 60. Edición. Wiley.
- Etchenique, R.O. 2006. Cianobacterias. Algas causantes de toxicidad. Mesa Redonda-Agua. Congreso de Zoonosis, La Plata, Argentina.
- Expósito, L. N., Zoppi De Roa, E. y Montiel, E. 1997. Efectos de las descargas de una laguna de estabilización sobre el fitoplancton marino.
- Ferrero, J. H. 1974. Depuración Biológica De Las Aguas. 1ra edición. Madrid: Alhambra.
- Foster, J., Green, S., Ahrendt, S., Golubic, S., Reid, R., Hetherington, K. y Bebout, L. 2009. Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas. *The ISME Journal* 3(5): 573-587. doi: 10.1038/ismej.2008.129
- Gasol, J.M., P.A. Del Giorgio y C.M. Duarte. 1997. Biomass distribution in marine planktonic communities. *Limnology and Oceanography* 39: 1704-1717.
- González E.J., Ortaz, M., Peñaherrera, C., Montes, E., Matos, M.L. y Mendoza, J. 2003. Fitoplancton de cinco embalses de Venezuela con diferentes estados tróficos. *Limnetica* 22: 15-35.
- González, E. J. 2004. Fitoplancton de un embalse tropical hipereutrífico (Pao-Cachinche, Venezuela): abundancia, biomasa y producción primaria. *Interciencia* 29(10): 548-555.

- Guerrero, J.M. 2006. Monitoreo de Cianobacterias potencialmente toxigénicas en el embalse Paso de las Piedras y en la zona costera del Río de la Plata (Prov. De Buenos Aires). Mesa Redonda-Agua. Congreso de Zoonosis, La Plata, Argentina.
- Guzmán, G. 2011. Evaluación espacio temporal de la calidad del agua del Río San Pedro en el estado de aguas calientes, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27 (2): 89-102.
- Havens, K.E., K.A. Work y T.L. East. 2000. Relative efficiencies of carbon transfer from bacteria and algae to zooplankton in a subtropical lake. *Journal of Plankton Research* 22: 1801-1809.
- Henrikson, R. 1994. Microalga *Spirulina*, superalimento del futuro. Segunda Edición. Ediciones Urano. 60 pp.
- Herrero, A. y Flores, E. 2008. *The cyanobacteria*. 1st ed. Norfolk, U.K.: Caister Academic Press.
- Infante, A. 1988. El plancton de las aguas continentales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Serie de Biología. Monografía 33. Washington DC, EEUU. 130 pp.
- Infante, A. y Riehl W. 1984. The effect of Cyanophyta upon zooplankton in an eutrophic tropical lake (Lake Valencia, Venezuela). *Hydrobiologia* 113: 293-298.
- Kato, K. 1961. Some aspects on biochemical characteristics of sea water and sediments in Mochima Bay, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente* 1(2): 343-358.

- Keshari, N., Das, S., y Adhikary, S. 2015. Identification of cyanobacterial species with overlapping morphological features by 16S rRNA gene sequencing. *European Journal Of Phycology*, 50(4), 395-399. doi: 10.1080/09670262.2015.1064548.
- Korhonen, L. K., Macías, V., Abdala, R., Figueroa, F. y Cabello, A. 2012. Effect of sulfide concentration, pH and anoxia on photosynthesis and respiration of *Zostera marina*. *Ciencias Marinas* 38(4): 625-633.
- López, J y Méndez, A. 2014. Evaluación de la concentración de los grupos de fitoplancton: Diatomeas, Cianofitas, Clorofitas y Dinoflagelados y su relación con los parámetros fisicoquímicos, en las aguas del Río Estero Real, período junio-noviembre 2013. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. UNAN-LEON.
- Mackenthun, K. M., Keup, L. E. y Stewart, R. K. 1966. Nutrients and algae in Lake Sebasticook, Maine. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 40, R72-R81.
- Mara, D.D. 1976. *Sewage Treatment in Hot Climates*, John Wiley & Sons, Londres.
- Martín, D., González, E. y D. Hernández. 1995. Prioridades de Conservación de las áreas marinas-costeras de Venezuela. Fudena. W.W.F. Caracas. 25 pp.
- Martínez, J. 2007. *Evaluación ambiental de los sistemas de lagunas para el tratamiento de aguas residual*. Licenciatura. Universidad de Sucre, facultad de ingeniería, departamento de ingeniería civil. [Online] Sincelejo.

Disponible en: <<http://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/001/333/2/T628.351%20M385.pdf>> [Fecha de consulta: 3 de marzo de 2017]

- Mendonça, S.R. 1987. Tópicos Avanzados em Sistemas de Esgotos Sanitários, ABES, Rio de Janeiro. 259 pp.
- Metcalf, R. y Eddy, J. 1985. Ingeniería sanitaria: tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales, 2ª ed. Labor SA (ed), p969. ISBN 84-335-6421-8.
- Moreno, M. D. 1984. Aplicación de Estanques Profundos a la depuración de Aguas Residuales Urbanas. Ph.D. Thesis, Universidad de Murcia, Murcia. España.
- Mur, L., Skulberg, O., y Utkilen, H. 2014. A guide to their public health consequences, monitoring and management. En: I. Chorus y J. Bartram, ed. *Toxic Cyanobacteria in Water*. W.H.O.
- Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. 1995. Gaceta Oficial de la República de Venezuela, N° 5.021, Decreto N° 883.
- Okuda, T., Benitez, A., García, A. & E. Fernández. 1968. Condiciones hidrográficas y químicas de la Bahía de Mochima y La Laguna Grande del Obispo desde 1964 a 1966. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, **7**: 7-37.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 1987. *Wastewater Stabilization Ponds. Principles of Planning and Practice*. Technical Publication No. 10, World Health Org. Reg. Off. East. Mediterranean, Alexandria, Egypt.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1998. Capítulo 7: Algas y cianobacterias en aguas dulces. Guías para ambientes seguros en aguas

recreativas. Volumen 1: Aguas costeras y aguas dulces; Ginebra, CH.
Disponible en: <http://www.cridlac.org/digitalizacion/pdf/spa/doc14617/doc14617-7.pdf> [Fecha de consulta: 4 de marzo de 2017]

- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2001. *Guidelines for drinking-water quality*. Geneva.
- Ortega, M. 1984. *Catálogo De Algas Continentales Recientes De México*. 1st ed. México: Coordinación de la Investigación Científica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Parilly, F. 2000. Identificación de los problemas y estudio de los usuarios del Parque Nacional Mochima y elaboración de los lineamientos básicos para la formulación ulterior del plan de educación ambiental. Proyecto Manejo del Sistema Nacional de Parques. INPARQUES-BIRF-3902VE.
- PDVSA. 1994. Atlas Imagen de Venezuela: Una visión espacial. Instituto de Ingeniería, 265 pp.
- Pérez, D., Soraci, A. y Tapia, M. 2008. *Cianobacterias y cianotoxinas: rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua*. [Online] Buenos Aires. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11209/Documento_completo.pdf?sequence=1 [Fecha de consulta: 3 de marzo de 2017].
- Prospero, C.H. 2000. Cyanobacteria in human affairs. *Interciencia* 25 (6): 303 – 306.
- Quesada, A. y Carrasco, S. 2006. Cianobacterias en aguas de consumo y de recreo: Un problema de todos, Ponencia en Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX).

- Ramírez, P., Martínez, E., Martínez, M. y Eslava, C. 2004. Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana. En: I. Rosas, A. Cravioto y E. Ezcurra, ed., *Microbiología Ambiental*, Instituto Nacional de Ecología, 1st ed. [online] México, D.F., pp. 83-100. Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/440.pdf> [Fecha de consulta: 3 de marzo de 2017]
- Restrepo, N., Galvis, M. y Montes, E. 2012 Tratamientos de Aguas Residuales. Recuperado de: http://www.institutodeestudiosurbanos.info/dmdocuments/cendocieu/coleccion_digital/Agua_Servicio_Publico/Tratamiento_Aguas_Residuales-Zapata_N.pdf
- Ricklefs, R.E. y G.L. Miller. 1999. Ecology. Cuarta edición. W. H. Freeman and Company, New York. 822 pp.
- Rinta-Kanto, J., Oullette, A., Boyer, G., Twiss, M., Briedgman, T., y Wilhelm, S. 2005. Quantification of Toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR. *Environmental Science & Technology*, 39(11): 4198-4205. En: <http://dx.doi.org/10.1021/es048249u>
- Rolim M., S. 2000. Sistemas de Lagunas de Estabilización. Editorial Mc Graw Hill, Santa Fe de Bogotá. pp.31.
- Roset, J., Muñoz, M. J. y Aguayo, S. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología* [Online], 18 (65-71): Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91918202> ISSN 0212-7113 [Fecha de consulta: 3 de marzo de 2017].

- Shapiro, J. 1973. Blue-green algae: Why they become dominant. *Science* 179: 382-384.
- SINIA 2009. Tratamiento y Reuso de AGUAS RESIDUALES. Recuperado de: sinia.minam.gob.pe/download/file/fid/39054
- Sun, C., Wang, Y., Wu, M., Dong, J., Wang, Y., Sun, F., y Zhang, Y. 2011. Seasonal Variation of Water Quality and Phytoplankton Response Patterns in Daya Bay, China. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 8(7), 2951-2966. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph8072951>
- Talón, M y Azcón, J 2000 Fundamentos de la Biología Vegetal.
- Urbach, E., Robertsin, D. y Chisholm, S. 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature*, 355, 267-270.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt.Int.Ver Limnol.* 9: 1 – 8.
- Villanueva, A. & López, H. 2013 Tratamiento de aguas residuales domésticas mediante plantas macrófitas típicas en Los Altos de Jalisco, México. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/html/4990/499051554003/>
- Vollenweider, R., Munawar, M. y Stadelmann, P. 1974. A Comparative Review of Phytoplankton and Primary Production in the Laurentian Great Lakes. *Journal Of The Fisheries Research Board Of Canada*, 31(5), 739-762. <http://dx.doi.org/10.1139/f74-100>

- Welker, M. y Von Döhren, H. 2006. Cyanobacterial peptides — Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), pp.530-563.
- Wetzel, R.G. 2001. Limnology. Lake and river ecosystems. 3rd edition. Academic Press. San Diego, Ca, EEUU. 1006 pp
- Whittaker, R. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21: 213- 251.
- Wu, X., Zarka, A. y Boussiba S. 2000. A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. *Plant Mol Biol Rep* 18:385–392
- Yáñez, P. 2003. Lagunas de estabilización. Universidad Laica Vicente Rocafuerte de Guayaquil.

APÉNDICE 1

Especies estudiadas

a) *Anabaena circinalis*: Común en aguas dulces de todo el mundo, producen toxinas potencialmente dañinas y forman grandes floraciones que pueden dañar la fauna y la flora del área.

Su morfología es filamentosa, cada filamento es una cadena de células. Las estructuras más numerosas son células vegetativas responsables de realizar fotosíntesis de azúcares de alta energía a partir del carbono ambiental, el agua y la luz solar. Crece sin control formando grandes floraciones que aparecen como una baba verdosa en la superficie del agua.

En condiciones difíciles forma células similares a esporas llamadas akinetes y son resistentes a bajas temperaturas, desecación y oscuridad, pudiendo germinar y formar un rebrote. Convierten el nitrógeno ambiental en compuestos como el amoníaco y el nitrato. La nitrogenasa es una enzima sensible al oxígeno y es esencial para esta conversión.

Producen anatoxina-a una de las primeras neurotoxinas identificadas. Los síntomas de intoxicación son: pérdida de coordinación, parálisis, espasmos musculares, dificultad para respirar y posiblemente la muerte.

Las floraciones pueden afectar y alterar las áreas de pesca comercial, las instalaciones de tratamiento de aguas residuales y las vías acuáticas recreativas.

Pueden producir la toxina paralizante de moluscos (PST), la misma se encuentra en una clase de venenos conocidos como saxitoxinas, una sustancia

considerada como una de las más tóxicas producidas naturalmente. La CWC (conversión de armas químicas) clasificó las saxitoxinas como sustancias de la lista 1, lo que significa:

- I- La saxitoxina tiene el potencial para ser utilizada como arma biológica, o como un precursor de otra arma.
- II- La saxitoxina no tiene uso práctico fuera de la fabricación de armas.

b) *Microcystis aeruginosa*: Es un género de la Familia Microcystaceae, muy común y su distribución es mundial, fija nitrógeno y puede vivir en condiciones inferiores de alimentación o en presencia de alguna sustancia nitrogenada como el amoníaco. Vive en aguas dulces y saladas.

Produce microcistina, una sustancia altamente tóxica que puede provocar disminución en la motilidad del plancton y aumentar la lisis celular, incluso en otras cianobacterias no tóxicas.

Forman colonias muy grandes generalmente esféricas, verde-azuladas; es un indicador de aguas contaminadas o ricas en nutrientes. Aguas poco profundas con poco movimiento, grado alto de turbidez y temperaturas altas son medios propicios para la proliferación de *Microcystis aeruginosa*, las colonias que forman son tan densas y pesadas que se hunden en los fondos de los espejos de agua.

c) *Microcystis flos-aquae*:

Crece en agrupaciones coloniales, forman parte del plancton en aguas estancadas, son esféricas y producen hepatotoxinas. Las primeras intoxicaciones humanas reportadas por consumo de aguas contaminadas con cianobacterias corresponden a cepas de *M. flos-aquae*, tal como ha sido descrito en Australia, Inglaterra, China y África del sur. Pueden crecer desmesuradamente en ambientes

ricos en abonos animales o procedentes de la agricultura o comunidades. Al igual que *M. aeruginosa* es altamente nociva.

d) *Chroococcus minutus*:

Son unicelulares, su forma geométrica es esférica con un diámetro 6.0 µm. Habita en lugares frescos, ambientes marinos y dulceacuícolas, ocupan áreas extensas forman mucilagos alrededor de pequeños grupos de células, generan esporas. Son conocidos como los gemelos cianobacterianos, ya que se agrupan en 2, 4, 8 y rara vez en grupos de 32 células, algunas veces aparecen aislados y solitarios, siempre protegidos por una cápsula viscosa para evitar su desecación. En zonas terrestres húmedas pueden vivir entre musgos del género *Sphagnum* específicamente; también habitan en lagos poco profundos y más frecuentemente en aguas oligotróficas y mesotróficas. Son potencialmente tóxicas.

e) *Nostoc commune*:

Forman esferas de 10 a 25 mm de diámetro semejantes a un racimo de uvas, son verde-azules como todas las cianobacterias, fijan el nitrógeno del aire y otros elementos. En Sudamérica también se le conoce como: cochuro, murmunta, llullucha y llayta. Es conocida desde Centroamérica hasta Brasil, también existe en Asia (China, Indonesia, India) y en Europa (Alemania, España y Francia). En sudÁfrica es empleada como fertilizante natural.

Tiene importancia económica, ya que se utiliza como biofertilizante, en la medicina y en la industria química en la producción de etanol. También es utilizada como complemento alimenticio y nutricional; según informes médicos fortalece los dientes y los huesos.

La composición nutricional por cada 100 g está comprendida por 25,4 g de proteína, 62,4 g de glúcidos, 0,80 g de lípidos, 6,3 g de agua, 5.10 g de cenizas, 258 mg de fósforo, 1,076 g de calcio, 19,6 mg de hierro y 10 µg de vitamina A.

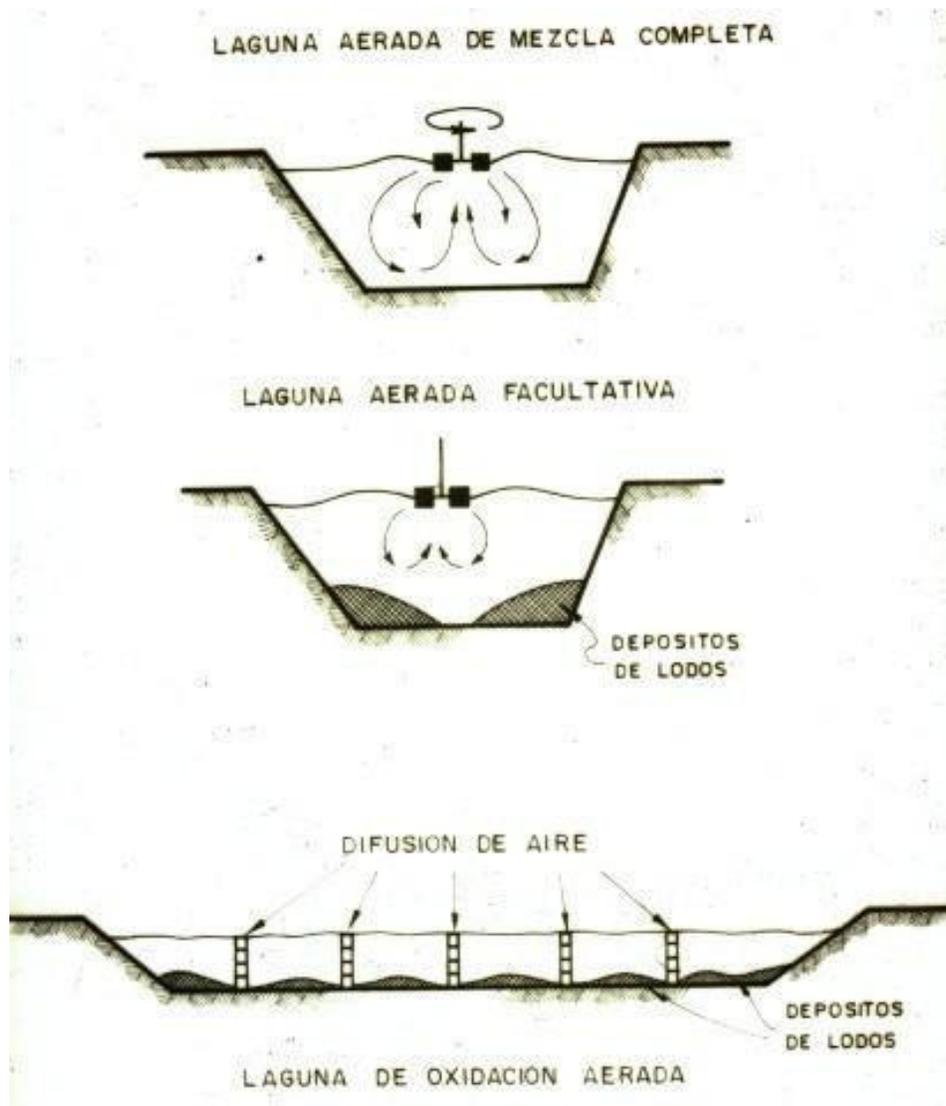
Posee gran importancia industrial y por ende económico en la industria alimentaria, en su uso en la medicina y en el área agrícola, lo que significa que todos los estudios presentes y futuros deben considerar su grado de toxicidad para una producción tecnificada que estaría orientada al uso humano.

f) *Lyngbya* spp.:

Habita en aguas dulces y salobres, en el plancton y bentos. Forma masas viscosas de color amarillo verdoso, su talo está formado por filamentos largos sin ramificar dentro de una vaina mucilaginoso rígida, miden de 7-10x2-3 µm, viven en el supralitoral y se mueven por deslizamiento. Son autótrofos unicelulares que forman base de la cadena alimentaria oceánica. Forman mantas densas y flotantes en el agua. Son irritantes por producir toxinas (saxitoxinas).

Recopilado de Chorus y Bartarm (2014)

APÉNDICE 2



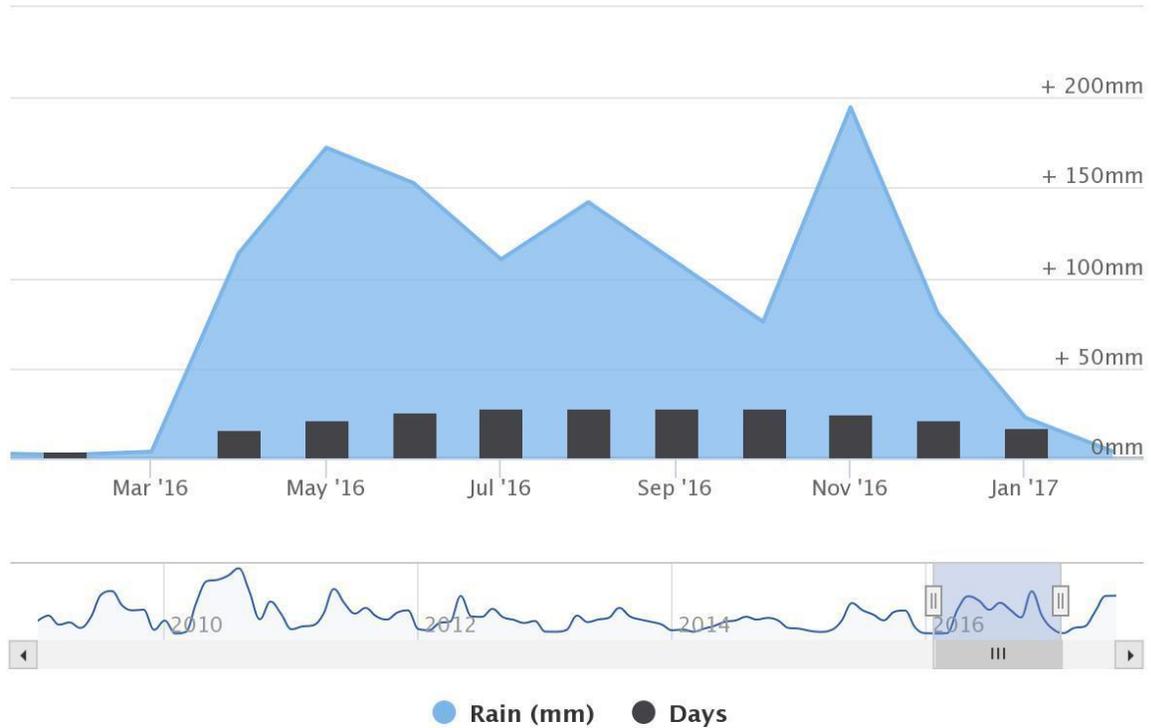
Fuente: Lagunas de estabilización. (Yanez, 2003)

APÉNDICE 3

Mochima

Average Rainfall Amount (mm) and Rainy Days

Zoom 1m 3m 6m YTD **1y** All



WorldWeatherOnline.com

Distribución de pluviosidad durante el estudio.

Fuente: WorldWeatherOnline.com