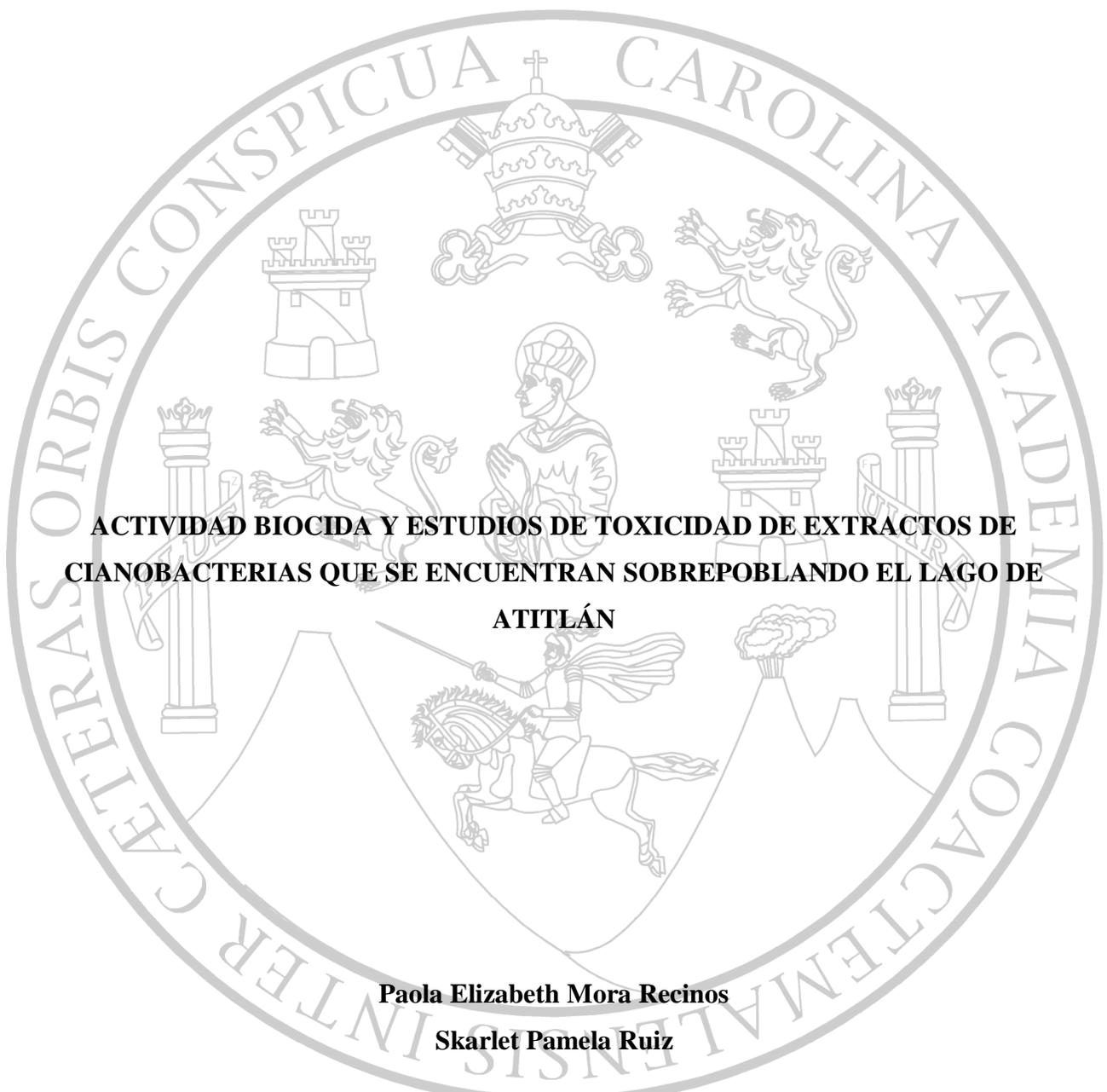


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a crown, and various symbols. The shield is surrounded by a circular border containing the Latin motto: "CAETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER".

**ACTIVIDAD BIOCIDA Y ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE  
CIANOBACTERIAS QUE SE ENCUENTRAN SOBREPBLANDO EL LAGO DE  
ATITLÁN**

**Paola Elizabeth Mora Recinos**

**Skarlet Pamela Ruiz**

**Químicas Biólogas**

Guatemala, Noviembre de 2012

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.

Decano

Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.

Secretario

Licda. Liliana Vides de Urizar

Vocal I

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Vocal II

Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli

Vocal III

Br. Fausto René Beber García

Vocal IV

Br. Carlos Francisco Porras López

Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y La Virgen María

Por iluminar siempre nuestro camino, por habernos permitido llegar hasta este punto, dándonos salud para lograr nuestros objetivos, y por haber puesto en nuestro camino a aquellas personas que han sido soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A Nuestros Padres

Por ser el pilar fundamental de todo lo que somos, en toda nuestra educación, tanto académica como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo, pero más que nada, por su amor.

A Nuestros hermanos

Por habernos apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores y su motivación constante.

A Nuestra Asesora y Revisora

Por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de este trabajo de investigación.

A la Unidad de Bioensayos, Departamento de Citohistología de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC

Por permitirnos realizar la presente investigación en el mencionado departamento.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

Por ser nuestra casa de estudios.

A Nuestros amigos

Por su apoyo y cariño sincero en cada momento bueno o malo de nuestras vidas.

## ÍNDICE

I.	RESUMEN	05
II.	INTRODUCCIÓN	06
III.	ANTECEDENTES	
	A. Cianobacterias	
	1. Características generales	07
	2. Ecología y distribución	08
	3. Estructura subcelular y organización celular	10
	4. Clasificación taxonómica	12
	5. Floraciones de cianobacterias	15
	a. Causas	16
	b. Consecuencias	19
	6. Factores que regulan el crecimiento de las cianobacterias	20
	a. Disponibilidad de luz	20
	b. Distribución en la columna de agua	21
	c. Temperatura	21
	d. Disponibilidad de nutrientes	22
	7. Eutrofización	23
	8. Producción de toxinas y otros metabolitos	25
	a. Vías de exposición	27
	b. Niveles máximos de referencia	28
	B. Departamento de Sololá	
	1. Lago de Atitlán	29
	a. Características	29
	b. Perfil ambiental del lago y su cuenca	30
	c. Situación del lago de Atitlán	31

C. Pruebas del estudio	
1. Test <i>Allium</i> cepa	32
2. Citotoxicidad contra nauplios de <i>Artemia salina</i>	32
3. Actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	33
4. Actividad larvicida	33
5. Actividad antilevadura <i>in vitro</i>	34
6. Actividad antimicótica <i>in vitro</i>	34
IV. JUSTIFICACIÓN	36
V. OBJETIVOS	37
VI. HIPÓTESIS	38
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
A. Universo de trabajo	39
B. Muestra	39
C. Recursos	39
D. Metodología	
1. Recolección y toma de la muestra.	42
2. Obtención del extracto	43
3. Test <i>Allium</i> cepa	
a. Procedimiento	43
b. Interpretación	45
4. Citotoxicidad contra nauplios de <i>Artemia salina</i>	
a. Procedimiento	45
b. Interpretación	46
5. Actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	
a. Procedimiento	46
b. Interpretación	47
6. Actividad larvicida	
a. Procedimiento	47
b. Interpretación	48
7. Actividad antilevadura <i>in vitro</i>	
a. Procedimiento	48

b. Interpretación	49
8. Actividad antimicótica <i>in vitro</i>	
a. Procedimiento	49
b. Interpretación	50
E. Diseño de la Investigación	50
F. Análisis Estadístico	51
VIII. RESULTADOS	53
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
X. CONCLUSIONES	62
XI. RECOMENDACIONES	63
XII. REFERENCIAS	64
XIII. ANEXOS	70

## I. RESUMEN

El lago de Atitlán es el reservorio natural más grande de agua dulce de Guatemala y uno de los tres destinos turísticos más importantes del país. Actualmente, es un recurso en degradación amenazado por las aguas residuales, los desechos sólidos, la deforestación, la erosión, la presión demográfica, la falta de conciencia ambiental y la falta de estrategias para protegerlo; todo esto aunado a factores del clima como la temperatura del aire, la temperatura del agua y la radiación solar, han favorecido el crecimiento acelerado y desmedido de cianobacterias.

Las cianobacterias tienen la capacidad de realizar fotosíntesis, son microorganismos que colonizan numerosos ecosistemas terrestres y acuáticos. Los florecimientos de estos generalmente tienen mala apariencia y provocan olor desagradable en el agua, pueden causar daños ecológicos a la biodiversidad y además dañar la salud humana, ya que algunas especies producen cianotoxinas.

En el año 2009 entre el 22 de octubre y el 11 de diciembre ocurrió el mayor florecimiento de cianobacterias registrado en el lago de Atitlán, el cual cubrió, en su etapa de mayor crecimiento, el 38% del área superficial del lago (4,940 hectáreas). Es muy difícil predecir una fecha específica para que sucedan estos florecimientos; desde el año 2009 a la fecha, la mayoría han ocurrido entre los meses de octubre a diciembre, a excepción de los registrados en los años 2011 y 2012 que sucedieron en el mes de mayo.

El presente estudio se realizó durante el florecimiento registrado durante el mes de mayo del año 2011. Para evaluar la actividad citotóxica, genotóxica y el potencial biocida del extracto etanólico, obtenido de tres puntos claves del lago, se emplearon varios bioensayos: Test *Allium cepa*, Test de *Artemia salina*, Test para evaluar la actividad larvicida y bioensayos bacterianos y fúngicos basados en la técnica de difusión en agar.

El estudio fue experimental. Los resultados mostraron que el extracto en estudio no presenta grado de citotoxicidad ni genotoxicidad significativo ( $p > 0.05$ ) frente a la especie de *Allium cepa*, tampoco presenta un efecto inhibitorio significativo contra bacterias, larvas y levaduras. Sin embargo, se demostró un efecto citotóxico contra nauplios de *Artemia salina* con un  $CL_{50}$  de 0.84 mg/mL y una actividad antifúngica significativa ( $p = 0.0312$ ) sobre la especie de *Tricophyton mentagrophytes* con una concentración mínima inhibitoria de 1 mg/mL de extracto.

## II. INTRODUCCIÓN

El lago de Atitlán está ubicado en el centro del departamento de Sololá, unos 160 kilómetros al oeste de la capital guatemalteca, y es circundado por doce poblaciones de indígenas que dependen directamente de sus aguas. Es considerado uno de los principales sitios turísticos de Guatemala y un recurso hidrológico muy importante, al proveer agua a muchas comunidades de sus alrededores (Castellanos, 2002, p. 40).

Actualmente, este Lago está siendo amenazado por floraciones de cianobacterias, que pueden producir cianotoxinas, las cuales afectan a los peces, crustáceos, plantas acuáticas y seres humanos que tengan contacto con el agua contaminada. Dichas cianobacterias crecen de forma desproporcionada debido al incremento de los niveles de nitrógeno y fósforo provenientes de los desechos domésticos e industriales que van a desembocar a las aguas del lago (Culujay, 2008, p.30).

Debido a que las cianobacterias presentan una gran distribución ecológica, encontrándose principalmente en cuerpos de agua con altos niveles tróficos, además, diversos estudios realizados alrededor del mundo en ambientes de agua dulce como lagos, embalses y ríos, han demostrado que algunas de estas especies pueden ser tóxicas debido a la producción y liberación de diferentes metabolitos que causan efectos adversos en los organismos; la presente investigación tuvo como propósito el determinar la actividad biocida y toxicidad de extractos de cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el lago de Atitlán, tomando para el estudio, muestras del florecimiento presentado en mayo de 2011. Esto con el fin primordial de brindar información importante a los pobladores próximos al lago sobre las consecuencias que tiene la presencia de dichos florecimientos.

Para la determinación de la actividad citotóxica, genotóxica y el potencial biocida de los extractos se emplearon varios bioensayos: Test *Allium* cepa, Test de *Artemia salina* y bioensayos basados en la técnica de difusión en agar.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Cianobacterias

##### 1. Características generales

Las cianobacterias también conocidas como cianofíceas, algas verde-azuladas o cianoprocariontes es el grupo de procariontes fotosintéticos más relevante en diversidad y biomasa (Pérez, Sorasi & Tapia, 2008, p.50). Son los organismos del fitoplancton más comúnmente identificados y se encuentran principalmente en cuerpos de agua con altos niveles tróficos. Su nombre lo reciben del prefijo griego “*cyanos*” que significa azul, aludiendo a su coloración verde oliva a azulada, mas sin embargo podemos encontrarlas de varias tonalidades (Torres, 2004, p.44).

Las cianobacterias constituyen un grupo muy diverso de organismos procarióticos fotoautótrofos pertenecientes al dominio Bacteria, que sintetizan clorofila y ficobilinas, y son las únicas bacterias fotosintéticas que poseen clorofila *a* y que, por lo tanto, son capaces de desarrollar fotosíntesis oxigénica. A pesar de tener características fotosintéticas similares a las algas eucariotas y plantas superiores, su organización estructural y bioquímica corresponde con la de las bacterias gram-negativas (Berrendero, 2008, p.24; Chorus, 2007).

Estos organismos tienen una larga historia evolutiva, por lo que la mayoría de geólogos y geoquímicos están de acuerdo en que su origen se extiende 3,500 millones de años en la era proterozoica, conocida también como la era de las cianobacterias. Fueron posiblemente los principales productores primarios y los responsables de la oxigenación inicial de la atmósfera terrestre, debido a la utilización de agua en el proceso de fotosíntesis (Chorus, 2007; Sarukhán, 2004, p.86).

Las cianobacterias presentan una gran distribución ecológica, abarcando un amplio rango de hábitats, crecen dispersos en el agua, en superficies de cuerpos de agua, así como en superficies terrestres húmedas y a veces colonizan ambientes extremadamente inhóspitos (Berrendero, 2008, p.25). Presentan una gran importancia como colonizadores de tierras áridas, pero quizás lo más destacado, es la capacidad que tienen algunas cianobacterias de fijar nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) en condiciones aerobias, lo que les confiere un especial interés con fines agrícolas, pudiendo ser utilizadas como biofertilizantes (Roset, Aguayo & Muñoz, 2001, p.65).

Las cianobacterias exhiben una gran variedad de formas, desde unicelulares como cocos y bacilos, hasta filamentosas que pueden llegar a presentar ramificaciones multicelulares. Existen especies de cianobacterias en un amplio rango de tamaños, desde especies de 0.5  $\mu\text{m}$  (ej.: *Prochlorococcus* sp.) hasta otras que forman colonias macroscópicas de varios milímetros de diámetro (ej. *Microcystis* sp.) (Sarukhán, 2004, p.80). En la naturaleza, estos organismos tienden a agruparse, formando en muchos casos colonias características y, otras veces, aparecen asociados con otros microorganismos constituyendo tapetes microbianos. Las cianobacterias también pueden formar asociaciones simbióticas con una amplia variedad de plantas, así como con hongos y animales invertebrados en ambientes terrestres, desempeñando un papel importante en el funcionamiento del ecosistema y en el ciclo de los nutrientes (Berrendero, 2008, p.25). En determinadas ocasiones, algunas cianobacterias planctónicas forman afloramientos masivos, que pueden ser visibles a simple vista, observándose como manchas o puntos cafés en las rocas sumergidas, cuando aparecen en densas concentraciones cerca de la superficie (Bonilla, 2009, p.16).

Los estudios llevados a cabo en ambientes de agua dulce, como lagos, embalses y ríos así como en ambientes marinos, han mostrado que algunas de estas especies pueden ser tóxicas debido a la producción y liberación de diferentes metabolitos, denominados toxinas, que causan efectos adversos en los organismos (Carrasco, 2007, p.6).

## **2. Ecología y distribución**

Debido a que las cianobacterias son un grupo de organismos muy antiguo, han sido capaces de adquirir una gran variedad de estrategias, a lo largo de la evolución, para poder adaptarse a los cambios que se producen en su ambiente físico. Gracias a esta capacidad de adaptación, han logrado colonizar prácticamente cualquier hábitat en la Tierra; forman parte de ecosistemas terrestres y acuáticos, tanto de agua dulce como marinos, donde se encuentran poblaciones planctónicas, bentónicas, e intertidales, e incluso pueden vivir en ambientes extremos, como desiertos áridos y fuentes termales (Berrendero, 2008, p.26; Forján, 2008, p.38).

Las cianobacterias que viven en el medio acuático se pueden clasificar ecológicamente en dos grupos, planctónicas y bentónicas. Las primeras se caracterizan por vivir libremente en la superficie o en la columna de agua, mientras que las segundas viven en el fondo o asociadas a un sustrato (Carrasco, 2007, p.6).

La adaptación a ambientes con poca luz y concentraciones bajas de nutrientes, supone un factor importante que ha conllevado a que hoy en día, las cianobacterias dominen tanto la biomasa como la producción en los océanos oligotróficos del mundo. Por lo general, las cianobacterias planctónicas marinas son poco abundantes, sin embargo, pueden formar densas poblaciones bénticas en los fondos marinos, constituyendo tapetes microbianos junto con otros organismos, especialmente en las zonas intertidales costeras y como fitobiontes de algunos líquenes costeros (Sanchis, 2002, p.178).

En medios dulceacuícolas (lagos, ríos, arroyos, fuentes, etc.) es donde se localiza una gran variedad de cianobacterias. Las formas picoplanctónicas están ampliamente distribuidas en todo tipo de lagos y embalses y, se ha observado que bajo ciertas condiciones nutricionales y físico-químicas, pueden aparecer afloramientos masivos de cianobacterias en la superficie, contribuyendo a diversos problemas de contaminación de los mismos. Presentan algunas limitaciones, ya que no son capaces de crecer en condiciones de pH inferiores a 4, teniendo así preferencia por las aguas neutras o alcalinas, crecen a temperaturas entre 15 y 30°C y prefieren una alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo (Atkins, Rose, Brown & Robb, 2000, p.107; Sanchis, 2002, p.173). La gran mayoría de las cianobacterias filamentosas suelen estar formando parte del bentos sobre todo tipo de sustratos, ya que se adhieren a las diferentes superficies, adaptándose de este modo a ambientes muy heterogéneos en la mayor parte de los casos (Oliver & Ganf, 2000, p.149).

Las cianobacterias son también importantes en muchos ambientes terrestres, siempre que exista algún recurso de agua aunque éste sea intermitente. Se han encontrado en desiertos debido a que son capaces de aguantar largos periodos de sequía, gracias a las adaptaciones desarrolladas frente a la desecación (Friedman, 1980, p.223). Además, las cianobacterias juegan normalmente un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad de la superficie del suelo, con el desarrollo de estructuras biológicas formadas por la asociación de diferentes microorganismos en zonas semidesérticas, denominadas costras biológicas del suelo o "*biological soil crust*" y en la fertilidad de los suelos utilizados para el cultivo en regiones áridas (Reed, Warr, Kerby & Stewart, 1986, p.51).

La alta tolerancia a la radiación ultravioleta B y C y la capacidad de soportar temperaturas extremas que presentan algunas cianobacterias, son factores muy importantes para colonizar ambientes extremos, permitiéndoles ser la población dominante en hábitats tan inhóspitos como

cráteres volcánicos, fuentes termales, lagos alpinos o polares y ambientes hipersalinos (Berrendero, 2008, p.30).

Finalmente, hay que destacar que las cianobacterias son capaces de formar relaciones simbióticas con gran cantidad de organismos: hongos, algas verdes, diatomeas, musgos, angiospermas, protozoos, etc. En estas asociaciones la cianobacteria excreta amonio para el hospedador, excepto en las asociaciones con hongos (líquenes), en las que aporta glucosa. El hospedador, a cambio le proporciona un sustrato donde desarrollarse y los metabolitos necesarios para el crecimiento. Las cianobacterias simbióticas tienen mayor actividad nitrogenasa y mayor porcentaje de heterocistos que las de vida libre y bajos niveles de glutamina sintetasa enzima necesaria para la incorporación del amonio a los aminoácidos (Carrasco, 2007, p.7).

### **3. Estructura subcelular y organización celular**

Las células vegetativas constituyen el tipo celular básico de todas las cianobacterias (anexo 1). Se caracterizan por poseer un protoplasto y una membrana plasmática rica en sistemas enzimáticos, rodeada por una pared celular similar a la que presentan las bacterias Gram-negativas, a diferencia de que éstas poseen una capa de peptidoglucano más gruesa y componentes no comunes en dicho grupo, interrumpida por pequeños poros (Maldener, Fiedler, Ernst, Fernandez & Wolk, 1994, p.543). En ocasiones, la pared celular se rodea de una cápsula o vaina mucilaginosa, constituida por polisacáridos, que facilita la agregación de las células y puede servirles de protección contra la desecación. En la parte central se encuentra el material genético, formado por un cromosoma circular de Acido desoxirribonucleico (ADN) de tipo bacteriano no unido a histonas. En algunas especies se conoce la presencia de intrones dentro del genoma bacteriano, así como de plásmidos (Castenholz, 2001, p.474).

Dispersos por el citoplasma se localizan los ribosomas de tipo bacteriano (70S) y una serie de gránulos, que generalmente contienen sustancias de reserva, cuya abundancia depende de las condiciones en que se encuentren las especies. Estos gránulos pueden ser polifosfatos (reserva de fósforo), de cianoficina (reserva de compuestos nitrogenados), de glucógeno y de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (reserva de carbón). También se encuentran otras estructuras denominadas carboxisomas o cuerpos poliédricos, que acumulan ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa (Berrendero, 2008, p.26; Carrasco, 2007, p.7).

La mayor parte del protoplasto se encuentra ocupado por tilacoides, los cuales contienen los principales componentes del aparato fotosintético: pigmentos, centros de reacción y cadena de transporte electrónico (Anexo 2). Una característica fundamental de estos organismos es la presencia, entre los pigmentos antena, de una familia de compuestos capaces de captar longitudes de onda de la luz que normalmente no son utilizadas por otros organismos fotosintéticos (Anexo 3). Los pigmentos fotosintéticos que poseen las cianobacterias son: clorofila a, componente del fotosistema I y principal colector de energía; carotenoides, con función protectora contra la oxidación de los pigmentos y, ficobiliproteínas, presentes sólo en cianobacterias y algunas algas (Cohen-Bazire & Bryant, 1982, p.143). Las ficobiliproteínas pueden ser ficocianina y aloficocianina presentes en todas las cianobacterias, así como ficoeritrina y ficoeritrocianina con menor frecuencia. Son muy eficientes en la captación de energía, formando parte del sistema antena en unos complejos multimoleculares denominados ficobilisomas, cediéndola mayoritariamente al fotosistema II. Además, son la porción nitrogenada de la célula con mayor capacidad de movilización, variando su proporción en función de la fuente de nitrógeno que exista en el medio (Ludeña, 2007, p.20; Prudente, 2008, p.12).

Muchas especies poseen vesículas especializadas de gas intracelular. Las pilas de estos cilindros huecos diminutos (< 300 nm) hechos de proteínas mantienen un espacio lleno con gas en la célula que permite al microorganismo controlar su flotabilidad y así, buscar activamente las profundidades del agua con condiciones óptimas de crecimiento. Sin embargo, la regulación de la flotabilidad para cambiar la cantidad de gas en las vesículas es lenta. Las células adaptadas a la mezcla turbulenta por vesículas de gas agrandadas tomarán algunos días en reducir su flotabilidad para adaptarse a condiciones más tranquilas. Por lo tanto, especialmente cuando el clima cambia de tormentoso a bueno, muchas células o colonias excesivamente flotables pueden acumularse en la superficie, donde forman natas (Torres, 2004, p.45).

A partir de las células vegetativas, algunas cianobacterias son capaces de diferenciar diferentes tipos de células especializadas, proporcionándoles una gran ayuda en la adaptación a los distintos hábitats en los que se encuentran. De entre ellas destacamos los heterocistos, acinetos y hormogonios (Berrendero, 2008, p.28).

Los heterocistos son células especializadas en donde tiene lugar la fijación del nitrógeno en condiciones aerobias, gracias a la enzima nitrogenasa que aparece en su interior. La diferenciación de los heterocistos a partir de células vegetativas es irreversible y se produce

generalmente en condiciones de deficiencia de fuente nitrogenada (Berrendero, 2008, p.28). Poseen una envoltura muy gruesa para impedir la difusión del oxígeno que inhibe a la enzima, así como unos gránulos polares en el sitio de unión con las células vegetativas denominados gránulos de cianoficina. Normalmente son de mayor tamaño que las células vegetativas (Carrasco, 2007, p.9).

Los acinetos o formas celulares esporuladas se diferencian de las células vegetativas, cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Generalmente se inducen en condiciones limitantes de fósforo, pero si esto no sucede, la diferenciación se puede producir al limitar la luz, la presencia de carbohidratos como fuente de energía o después de una larga exposición al frío o desecación. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, tienen la capacidad de germinación para producir nuevos filamentos. Se puede formar un sólo acineto o bien varios dispuestos en serie a lo largo del tricoma. Los acinetos se forman a partir de las células vegetativas por acumulación de nuevas capas de materiales polisacáridicos en el lado exterior de la pared celular y por la formación de acúmulos de reserva en el protoplasma (fundamentalmente gránulos de cianoficina y de glucógeno). También ocurren otros cambios fisiológicos y químicos como el incremento del contenido de ácido ribonucleico (ARN), la desaparición de las actividades biosintéticas, la fotosíntesis y los gránulos de polifosfato (Berrendero, 2008, p.29; Carrasco, 2007, p.9).

Los hormogonios son otra forma de especialización celular, que por lo general, se diferencian en cianobacterias filamentosas a partir de la muerte de una o más células intercalares denominadas necridios, o bien por la separación entre dos células contiguas, pero en ambos casos la formación de los hormogonios depende de las condiciones del medio. La función principal es la de reproducción y, pueden tener movilidad. Los hormogonios pueden ser también unicelulares, en cuyo caso se denominan gonidios (Berrendero, 2008, p.29).

#### **4. Clasificación taxonómica**

Inicialmente la clasificación taxonómica de las cianobacterias fue realizada principalmente en base a características morfológicas. Posteriormente, fueron utilizadas también características fisiológicas, ecológicas y ultraestructurales (Bonilla, 2009, p.18).

Según la tradición botánica, las cianobacterias se han distinguido en base a sus propiedades morfológicas, que incluyen principalmente la formación de la colonia, la morfología celular y

envolturas extracelulares, pigmentación, reproducción y, en menor medida, en base a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas. Este sistema de clasificación, gobernado por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, requiere como referencia taxonómica muestras fijadas y preservadas, como muestras de herbarios. Se han publicado y aceptado alrededor de 2,000 especies de cianobacterias bajo este código. Todas ellas, quedan englobadas en los 4 órdenes siguientes (Anexo 4) (Berrendero, 2008, p.28; Bonilla, 2009, p.18):

- Orden Chroococales: Incluye a todas las unicelulares y se agrupan en función de los tipos de células, las envueltas y el tipo de reproducción.
- Orden Oscillatoriales: Incluye aquellas con organización en filamentos, generalmente se reproducen por fragmentación del tricoma formando hormogonios y, carecen de heterocistos y acinetos. Algunas pueden presentar una vaina recubriendo los tricomas.
- Orden Nostocales: Agrupa aquellas filamentosas provistas de heterocistos y acinetos. Se agrupan en función de la morfología de las colonias, los filamentos, así como por la diferenciación y posición de los heterocistos, y la diferenciación de acinetos.
- Orden Stigonematales: Formada por filamentosas con un talo morfológicamente complicado. Su diferenciación se realiza principalmente en función de la estructura de los filamentos, tipo de ramificación, posición de los heterocistos y procesos reproductivos (Anagnostidis y Komárek, 1990).

Esta clasificación ha sido modificada de acuerdo a los avances científicos y la incorporación de técnicas moleculares para la distinción filogenética de los grupos. Estudios moleculares recientes han demostrado que la presencia o ausencia de ramificaciones verdaderas no es una característica relevante para separar Ordenes. Estos autores han propuesto una nueva clasificación que agrupa todos los talos filamentosos heterocitados con ramificaciones falsas y verdaderas o sin ramificaciones en un mismo Orden (Nostocales), eliminando el Orden Stigonematales (con ramificaciones verdaderas) (Bonilla, 2009, p.18).

En la década de los setenta con el reconocimiento de las características bacterianas de este grupo, surgió un nuevo sistema de clasificación, basado en los criterios establecidos por el Código Internacional Bacteriológico de Nomenclatura. Las primeras aproximaciones fueron realizadas por Stainer y Cohen-Bazire (1977), seguidos por Waterbury y Stainer (1977) y Rippka y col. (1979) entre otros, siendo estos últimos, los que diseñaron las primeras claves para determinar cianobacterias en cultivo (Carrasco, 2007, p.10). A diferencia del sistema tradicional,

el sistema bacteriológico está basado en algunas características morfológicas, fisiológicas, citológicas y bioquímicas de cultivos axénicos de especies aisladas, como la composición de pigmentos, análisis de ácidos grasos, crecimiento heterotrófico, actividad nitrogenásica, composición nucleotídica del ADN y longitud del genoma. Además requiere como referencia taxonómica básica muestra viva, que sea cultivada en una de las colecciones de cianobacterias oficiales existentes en el mundo. A partir de las diferencias en la organización celular y en el modo de reproducción, las cianobacterias se agruparon en 5 secciones, las cuales son (Anexo 5) (Berrendero, 2008, p.25; Bonilla, 2009, p.18):

- Sección I (orden Chroococcales en el sistema botánico). Engloba las cianobacterias unicelulares que se multiplican por fisión binaria o gemación. Las células tienen forma esférica, cilíndrica u ovalada.
- Sección II (orden Pleurocapsales). Agrupa a las cianobacterias unicelulares que pueden formar colonias y que se multiplican por fisión múltiple, dando lugar a células hijas de menor tamaño llamadas baeocitos.
- Sección III (orden Oscillatoriales en el sistema botánico). Incluye cianobacterias filamentosas sin heterocistos, que se dividen en un único plano. La multiplicación se produce por rotura de filamentos y en algunos géneros también mediante la germinación de acinetos, o la formación de hormogonios.
- Sección IV (orden Nostocales en el sistema botánico). Dentro de esta sección nos encontramos a las cianobacterias filamentosas con heterocistos, que se dividen en un solo plano y se reproducen mediante rotura de tricomas, formación de hormogonios o germinación de acinetos.
- Sección V (orden Stigonematales en el sistema botánico). Formadas por las cianobacterias filamentosas con heterocistos en las que la división celular se realiza en dos planos, dando lugar a tricomas ramificados. La reproducción se realiza como en las dos secciones anteriores.

Posteriormente, Castenholz y Waterbury en la primera edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, realizaron una rigurosa revisión de algunos de los géneros más importantes, basándose en las características morfológicas (célula, tricoma y colonia), ultraestructurales, fisiológicas y ecológicas, así como en el análisis del porcentaje de guanina más citosina (G+C) del genoma e hibridación ADN-ADN. Mediante esta aproximación, fueron reconocidos cinco órdenes bastantes similares a los reconocidos por el sistema tradicional.

Además, se comprobó que numerosos organismos que en el pasado fueron considerados estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético, ahora no lo son (Berrendero, 2008, p.30).

En la actualidad, los esquemas publicados por Rippka y col. (1979) y en el *Bergey's Manual* (Boone y Castenholz, 1989) se han revisado en la nueva versión de este manual, utilizando para ello las interpretaciones filogenéticas basadas en las secuencias del gen que codifica para el ARN ribosómico de 16S (ARNr 16S). En esta última edición, se incluye información recopilada tanto de fuentes bacteriológicas como fisiológicas, que han permitido distinguir 5 subsecciones (I-V), equivalentes a los órdenes establecidos en la literatura botánica (Anexo 6). Sin embargo, es evidente que ciertos órdenes y familias continúan siendo problemáticos y requieren más revisiones, por ello la clasificación debe ser cambiada, corregida y re-evaluada continuamente (Berrendero, 2008, p.31).

## **5. Floraciones de cianobacterias**

En las últimas tres décadas, estuarios y lagunas costeras de todo el mundo han visto modificado su equilibrio ecológico a consecuencia de la intensificación de las actividades antrópicas o por factores climáticos. En este contexto, la presencia de floraciones de cianobacterias son eventos cada vez más comunes provocando el deterioro general de la calidad del agua (Bonilla, 2009, p.19; Pérez y otros, 2008, p.50).

Los agrupamientos masivos de cianobacterias se denominan “floraciones de agua” o “blooms algales” y se describen como un aumento significativamente mayor que el promedio en la biomasa del fitoplancton, bajo esta definición cualquier cuerpo de agua independientemente de su estado trófico puede presentar afloramientos. Esta definición es tan abierta que en aguas dulces con uso de aguas potables o recreacionales suele hacerse una modificación de la definición, por la cual, se describe un afloramiento en función de la concentración celular que puede causar daños a los seres humanos. En este caso se estaría hablado de afloramiento cuando la concentración de clorofila *a* sea superior de 10 µg/L, concentración que equivale aproximadamente a 20,000 células por mL (Carrasco, 2007, p.11; Pérez y otros, 2008, p.50).

Los factores que desencadenan las floraciones de las cianobacterias planctónicas son diversos y actúan en forma combinada (Pérez y otros, 2008, p.51). Cada floración está formada por una o pocas especies. El fenómeno puede generarse en períodos que van desde pocas horas a

varios días y desaparecer en un plazo similar. Sin embargo, algunas floraciones de cianobacterias pueden permanecer por períodos más largos como todo el verano, durante todo el año o incluso en forma permanente (Bonilla, 2009, p.18).

Las floraciones de cianobacterias planctónicas ocurren en los cuerpos de aguas continentales de todo el planeta, generalmente a fines de verano. Pueden ser evidentes a simple vista por la coloración generalmente verde y la turbidez que le confieren al agua, por la presencia de acumulaciones o franjas densas superficiales o por espumas flotantes en la superficie (Pérez y otros, 2008, p.51). Si bien la frecuencia e intensidad de las floraciones han aumentado en el mundo a consecuencia de las actividades humanas y el cambio climático, el fenómeno no es nuevo. Existen registros de floraciones en lagos de Europa central desde hace varios siglos (Díaz, 1997, p.12).

Las floraciones pueden ser desarrolladas por diatomeas, algas verdes, dinoflagelados y cianobacterias. Generalmente, están relacionadas con uno o dos especies y se identifican por el tipo de fitoplancton dominante. Existen numerosas especies de cianobacterias que desarrollan floraciones en ambientes de agua dulce, salobre o marina, aunque las principales son *Anabaena circinalis* y *Microcystis aeruginosa* (Alonso, 2008; Pérez y otros, 2008, p.51).

Muchas cianobacterias al igual que otras algas fitoplanctónicas producen olores o sabores desagradables en el agua, pero el principal motivo de preocupación por las floraciones de cianobacterias, es que estos organismos pueden producir toxinas. La alta biomasa concentrada en las floraciones sumada a la presencia de las cianotoxinas puede representar un problema para los otros organismos del medio acuático y para el ser humano (Bonilla, 2009, p.18; Díaz, 1997, p.13).

#### **a. Causas**

Para crear las condiciones favorables al desarrollo de una floración basta con que estén presentes algunos y no todos los factores siguientes, dependiendo de las características naturales de los sistemas acuáticos (Carrasco, 2007, p.7).

Los procesos asociados a actividades humanas más relevantes que determinan las floraciones son:

- Los aportes puntuales, provenientes de aguas residuales domésticas o industriales no tratadas, que son vertidas directa o indirectamente a los sistemas acuáticos.

- Los aportes difusos provenientes de aguas de escorrentía debido al lavado de suelos de áreas cultivadas y fertilizadas, de suelos deforestados o de campos con ganadería.
- La aridez de regiones próximas o dentro de la cuenca hidrográfica, o los efectos similares debidos a suelos sin vegetación.
- El manejo de los flujos de salida (manejo de las compuertas de las represas) mediante el cual es posible regular el tiempo de residencia del agua en los embalses.
- Entre las causas que favorecen y controlan el desarrollo de floraciones se destacan:
- La carga excesiva de nutrientes en el agua, principalmente de nitrógeno y fósforo. El exceso de alguno de ellos transforma al otro en un nutriente limitante para el crecimiento algal, de modo que solo aquellas especies capaces de desarrollar determinadas estrategias podrán superar esa carencia y alcanzar densidades muy altas. Este proceso de enriquecimiento puede verse acelerado por la participación del hombre mediante aportes debidos a las actividades industriales, rurales y a los residuos domésticos. El control de estos aportes hace posible la disminución de las floraciones y hasta la desaparición del fenómeno.
- El incremento de la intensidad luminosa propia de primavera y verano, que generalmente va asociado al incremento de la temperatura y de la duración del día solar. La luz tiene incidencia directa sobre el metabolismo algal, de modo que al aumentar la intensidad luminosa también aumenta la actividad fotosintética y la demanda de nutrientes. Se produce un incremento de la biomasa de las células algales y de la tasa de multiplicación, que ocasiona el incremento de las poblaciones de determinadas especies. Cuando la floración se acumula en la superficie de la columna de agua, se produce un sombreamiento sobre el resto de las especies dispersas en los niveles inferiores y con ello una limitación de su crecimiento. La alta intensidad luminosa también puede producir fotoinhibición en algunas especies y/o ocasionar la muerte y sedimentación de las algas acumuladas en la superficie. Por otra parte, el aporte de sedimentos mediante fuentes difusas incrementa la turbidez de la columna de agua limitando el crecimiento algal. En este sentido, las especies de cianobacterias que poseen vacuolas de gas regulan su posición en la columna de agua y permanecen en las capas superiores iluminadas, donde pueden desarrollar floraciones.
- El aumento de la temperatura del agua por sobre los 20 °C favorece el desarrollo de las cianobacterias, ya que incrementa las tasas de crecimiento y de reproducción celular. Otro efecto del aumento de la temperatura está relacionado con la estratificación de la columna de

agua. Al incrementarse la temperatura de las capas superficiales, se forma un gradiente vertical de densidad que resulta en la estratificación de la columna de agua. En ausencia de viento o con baja turbulencia (velocidad del viento menor a 3 m/s), se acelera el proceso de sedimentación de las partículas, incluidas otras especies de algas, el agotamiento de los nutrientes y la acumulación superficial de las cianobacterias.

- Los sistemas acuáticos con altos tiempos de residencia del agua favorecen el desarrollo de floraciones. Esta causa tiene relación directa con la estratificación de la columna de agua, el incremento en la tasa de sedimentación de las partículas, el aumento de la transparencia y la acumulación de las cianobacterias en la superficie. En algunos sistemas, los altos tiempos de residencia determinan la anoxia (ausencia de oxígeno) de los niveles más profundos y con ello la liberación de compuestos químicos reducidos desde el sedimento, constituyendo un incremento de la carga interna de nutrientes al sistema. Los cuerpos de agua con bajo tiempo de residencia (< 10 días), como los sistemas fluviales (ríos), o los embalses con tasas de renovación altas, impiden el establecimiento de las condiciones ambientales favorables al crecimiento de las cianobacterias.
- La turbulencia, que generalmente está asociada a la presencia del viento, determina una disminución de la transparencia del agua por aumento de la turbidez en ambientes someros (resuspensión), actuando como un factor controlador de las floraciones, ya que ocasiona una disminución de la tasa de fotosíntesis y de la biomasa algal. Cuando la intensidad del viento ocasiona la mezcla de la columna de agua, impide la acumulación de las cianobacterias en la superficie y favorece la resuspensión de los nutrientes. Por otra parte, la distribución y ubicación de una floración en un cuerpo de agua tiene relación también con la dirección del viento antes y/o durante el acontecimiento. Las floraciones se acumulan en las bahías hacia donde sopla el viento y/o en las zonas protegidas.
- Factores adicionales como la disminución en la concentración de carbono inorgánico disuelto en el agua con el consiguiente incremento del pH, también favorece el desarrollo de floraciones. Este incremento del pH puede estar dado por las características naturales del sistema (aguas duras) o por los efectos del crecimiento de la comunidad fitoplanctónica. En este sentido, la incorporación de carbono, que las algas toman como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) disuelto en el agua mediante la fotosíntesis, determina un cambio en la concentración de iones

debido a la disminución del carbono disponible, un aumento del pH y una limitación para el crecimiento de muchas especies de algas, excepto las cianobacterias.

## **b. Consecuencias**

En aguas dulces y estuarinas, las floraciones son indicadoras de un proceso de eutrofización acelerada, a la vez que ocasionan perjuicios con relación a los diversos usos del recurso. Entre los efectos más destacables de estos fenómenos se mencionan (Carrasco, 2007, p.10; Forján, 2008, p.38):

- La presencia de cianotoxinas y el consiguiente riesgo de intoxicación de los seres vivos en contacto con el fenómeno. Cuando estos fenómenos se dan en cuerpos de agua destinados a usos humanos, como fuente de agua potable, recreación, baños, etc., ocasionan importantes perjuicios desde el punto de vista sanitario y estético.
- Otro efecto de las floraciones de cianobacterias se relaciona con la alta productividad primaria de la comunidad planctónica. Esto determina, por un lado, un incremento en el consumo de oxígeno debido a la respiración de las algas y especialmente de los microorganismos degradadores de esa biomasa. Por otra parte, se produce una alteración de las propiedades químicas del agua, especialmente del pH, debido al consumo del carbono que puede volverse limitante para el desarrollo de otras microalgas. Esto favorece la disminución de la diversidad de la biota del sistema.
- El mayor consumo de oxígeno que se produce cuando la floración sedimenta, frecuentemente ocasiona la anoxia en los niveles más profundos del cuerpo de agua. Este efecto puede determinar la muerte de la fauna ictícola (peces), especialmente los que viven próximos al sedimento. También está asociado a la liberación de nutrientes reducidos desde el sedimento, junto al desarrollo de bacterias sulfactantes y la liberación de sulfuro de hidrogeno ( $H_2S$ ).
- La liberación de sulfuro de hidrogeno ( $H_2S$ ) determina que el agua tenga un olor y sabor desagradable, además de resultar un compuesto tóxico para la biota del sistema. El fuerte olor y sabor del agua y de los organismos acuáticos, puede también estar asociado a la presencia de compuestos volátiles (Geosmina y 2-methyl-isoborneol (2-MIB)) sintetizados por algunas especies de cianobacterias y/o hongos (actinomicetes). Estos productos dificultan y encarecen los tratamientos de potabilización del agua, que conjuntamente con las toxinas disueltas, deben

ser totalmente removidos del sistema. También pueden ser causantes de mal sabor en los productos de pesca, limitando su consumo.

## **6. Factores que regulan el crecimiento de las cianobacterias**

El crecimiento de las cianobacterias fitoplanctónicas en los ambientes naturales depende de su capacidad de optimizar la utilización de los recursos y minimizar las pérdidas de biomasa (De León, 2002, p.28). Los recursos necesarios para el crecimiento son la luz y los nutrientes (minerales), mientras que las pérdidas se deben a la depredación, sedimentación hacia zonas afólicas (oscuras) donde no es posible realizar la fotosíntesis y el “lavado” por el arrastre de las corrientes de agua. Las interacciones tróficas entre los organismos en los cuerpos de agua también juegan un papel importante para determinar la dominancia o no de las cianobacterias. Además, las cianobacterias interactúan con otros productores primarios (algas del fitoplancton y plantas sumergidas) compartiendo los mismos recursos (Anexo 7) (Bonilla, 2007, p.18).

En algunas situaciones, las cianobacterias tienen la facultad de dominar el fitoplancton gracias a su capacidad para explotar intensidades de luz muy bajas o altas, optimizar la fotosíntesis mediante la flotación en la columna de agua, soportar amplios rangos de temperatura, crecer en ambientes crónicamente deficientes en nutrientes y resistir la depredación debido a su capacidad de sintetizar toxinas y a su plasticidad morfológica (Alonso, 2008; De León, 2002, p.29).

### **a. Disponibilidad de luz**

Las cianobacterias pueden crecer en condiciones no óptimas para el fitoplancton en general, gracias a su adaptabilidad a intensidades de luz bajas o extremadamente altas. Adicionalmente pueden acceder a condiciones favorables para el crecimiento por su capacidad de regular su posición en la columna de agua (Bonilla, 2009, p.19). El típico color verde-azul de las cianobacterias se debe a la presencia de pigmentos accesorios como las ficobilinas. La proporción de estos pigmentos puede ser alterada para aumentar la absorción de la luz en el espectro visible (400 a 700 nm). Esta es una diferencia fundamental entre las cianobacterias y las algas eucariotas (excepto criptofitas), ya que las ficobilinas absorben la luz en un rango de longitud de onda en el que las algas eucariotas del fitoplancton no pueden (De León, 2002, p.30).

Como la intensidad de la luz disminuye exponencialmente en la columna de agua y su calidad espectral cambia, las cianobacterias pueden utilizar parte de esta energía lumínica en rangos del espectro que no son utilizados por otros grupos. Esta estructura pigmentaria les confiere una alta tolerancia a las condiciones de penumbra. En el otro extremo, algunas cianobacterias pueden tolerar la radiación solar prácticamente directa y crecen y se acumulan próximas a la superficie del agua (Bonilla, 2009, p.22).

#### **b. Distribución en la columna de agua**

Las cianobacterias regulan la flotación mediante, al menos, tres mecanismos: la disminución del número de vesículas de gas a medida que avanza la división celular, el colapso de algunas vesículas por aumento de la presión citoplasmática debido a la acumulación de metabolitos de la fotosíntesis y, finalmente, mediante la acumulación fotosintética de polímeros de alto peso molecular para alcanzar la flotación neutra. De este modo, una mayor exposición a la luz aumenta la presión intracelular por una rápida síntesis de carbohidratos, lo que tiene como resultado el colapso de las vesículas y el consiguiente hundimiento de las colonias o filamentos (Díaz, 1997, p.20). Estos mecanismos de regulación permiten a las cianobacterias alcanzar profundidades de 2 a 4 m en horas. Cuando acceden a zonas de intensidad de luz intermedia se logra la flotación neutra y la posterior formación de nuevas vesículas que llevan a los organismos a la superficie nuevamente (Anexo 8) (Bonilla, 2009, p.22; De León, 2002, p.30).

#### **c. Temperatura**

El rango de temperatura a la que generalmente se produce la tasa máxima de crecimiento de las cianobacterias se encuentra entre 25 y 30 °C. Por encima del rango de temperatura óptima ocurre una disminución abrupta de la tasa de crecimiento. Los rangos óptimos de temperatura de las cianobacterias no termofílicas son similares a los rangos de las algas eucariotas. Por otro lado, las cianobacterias son dominantes en numerosos ecosistemas acuáticos polares, tanto en el bentos formando gruesas matas, como en el fitoplancton, debido a su tolerancia a un amplio rango de temperatura (Bonilla, 2009, p.23).

#### **d. Disponibilidad de nutrientes**

El protoplasma celular de las algas eucariotas y las cianobacterias, requiere de aproximadamente 20 elementos químicos para la formación de la nueva biomasa, algunos de ellos son necesarios en grandes cantidades (hidrogeno, carbono, oxígeno y nitrógeno) y otros en cantidades relativamente pequeñas (fosforo, azufre, potasio, sodio, calcio, magnesio y cloro). Un conjunto de nutrientes que intervienen en el metabolismo (ej.: estructura de enzimas) son requeridos en concentraciones traza (silicio, hierro, manganeso, molibdeno, cobre, cobalto, zinc, etc.) (Bonilla, 2009, 24; Massaut & Ortiz, 2003, p.15).

Los nutrientes que generalmente limitan el crecimiento del fitoplancton pueden ser nitrógeno, fosforo, hierro, (Si, en el caso de las diatomeas) o algún elemento traza. En general, el carbono no es limitante para el fitoplancton debido a los aportes de dióxido de carbono atmosféricos y del sedimento. Sin embargo, altas tasas fotosintéticas pueden disminuir la concentración de dióxido de carbono. Al disminuir el dióxido de carbono por su incorporación durante la fotosíntesis, se produce un aumento del pH debido a que disminuye el ácido carbónico disuelto. Este aumento de pH hace que la forma más abundante de carbono inorgánico sea el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). En estos casos puede ocurrir la limitación del crecimiento de las cianobacterias que solo puedan asimilar dióxido de carbono. Sin embargo, la mayoría de las cianobacterias y algunas algas eucariotas contienen la enzima anhidrasa carbónica y pueden recurrir al bicarbonato como fuente alterativa de carbono inorgánico (Roset y otros, 2001, p.67; De León, 2002, p.31).

El nitrógeno puede ser obtenido del agua a través de la incorporación activa como amoníaco ( $\text{NH}_4^+$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ); dependiendo de la fuente de nitrógeno, la asimilación requiere de varias etapas para reducirlo (nitrato reductasa y nitrito reductasa, para formar finalmente amonio), por lo tanto, el  $\text{NH}_4^+$  es la fuente de nitrógeno energéticamente menos costosa de asimilar. El metabolismo del nitrógeno en cianobacterias y algas eucariotas es muy similar, la principal diferencia es que el nitrógeno es un elemento esencial para la síntesis de las vesículas de gas y que algunas cianobacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico. Ésta capacidad y la facultad de migrar en la columna de agua para acceder a fuentes de nitrógeno inorgánico les permite crecer en ambientes con relaciones atómicas de nitrógeno: fosforo (N:P) menores a 10. La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico es generalmente considerada como una ventaja de las cianobacterias sobre las algas eucariotas para crecer en ambientes pobres en nitrógeno. La

fijación de nitrógeno requiere del complejo enzimático nitrogenasa localizado en los heterocitos, aunque se ha demostrado que algunas especies no heterocíticas también pueden fijar nitrógeno. Debido a que la enzima nitrogenasa es rica en hierro la capacidad de fijar nitrógeno sería ventajosa en ambientes con disponibilidad de este micronutriente ( $>0,06 \mu\text{g}$  de hierro) (Carrasco, 2007, p.10).

El fósforo es un componente esencial del metabolismo celular debido a que sus enlaces actúan como acumuladores y liberadores de energía para las reacciones enzimáticas (adenosín trifosfato (ATP)), además de ser esencial en estructura del ADN y las membranas celulares. Los altos requerimientos de fosfato ( $\text{PO}_3^{4-}$ ) por el fitoplancton combinado con un suministro ambiental restringido en relación a los otros nutrientes, determina que el fosforo sea el principal elemento limitante del crecimiento fitoplanctónico en ambientes límnicos (Carrasco, 2007, p.11).

## **7. Eutrofización**

La eutrofización es el proceso natural y/o antropogénico que consiste en el enriquecimiento de las aguas con nutrientes, a un ritmo tal que no puede ser compensado por la mineralización total, de manera que la descomposición del exceso de materia orgánica produce una disminución del oxígeno en las aguas profundas (Riobos & Martínez, 1994, p.27).

La eutrofización representa un problema ambiental reconocido desde la mitad del siglo XX. Puede provocar el deterioro del medio acuático, agotando el oxígeno disuelto, provocando mortalidad de peces y otros organismos, facilitando la liberación de sustancias tóxicas previamente fijadas en los sedimentos, y contaminando el agua para consumo humano. Este proceso puede producirse de forma natural e irreversible; pero lo más frecuente es que su origen sea antropogénico (Falch, Koning & Wright, 1995, p.322).

La causa primaria que desencadena el pasaje de un estado oligotrófico a uno eutrófico es el aporte de una carga de fósforo y/o nitrógeno en una tasa mayor a la que el sistema acuático puede procesar. El origen es siempre diverso, pero se destacan como aportes puntuales los desechos orgánicos urbanos, domésticos e industriales, y los aportes difusos por escorrentía, mayoritariamente inorgánicos, que provienen de la actividad agrícola-ganadera. Otros factores que pueden modificar la dinámica del fenómeno son: el clima (que puede controlar la productividad al modificar la entrada de energía solar al sistema), la geología, los tipos de suelos de la cuenca y la hidrología (que determinan los aportes de nutrientes a través de la precipitación,

la escorrentía o los afluentes). La morfología del sistema y el tiempo de residencia del agua son otros aspectos a tener en cuenta, ya que los lagos someros y pequeños son más susceptibles a la eutrofización por su escaso volumen y capacidad de procesamiento del exceso de materia orgánica. Por su parte, los ecosistemas con bajas tasas de renovación del agua facilitan la acumulación del material en exceso (Bonilla, 2009, p.25).

Si el aporte en exceso se mantiene, comienzan a desencadenarse una serie progresiva de eventos más o menos predecibles. Uno de los primeros síntomas es la deficiencia de oxígeno disuelto en el agua, el que es consumido en la degradación microbiana de la biomasa en descomposición. El consumo de oxígeno en el sedimento y en el agua de fondo conduce a la anoxia, especialmente bajo condiciones de estratificación de la columna de agua en verano. Esto puede interferir en los procesos de nitrificación de algunas formas de nitrógeno, permitiendo la acumulación de amonio que es rápidamente utilizado por las algas y cianobacterias. A su vez, la anoxia promueve una serie de mecanismos físico-químicos que culminan con la liberación de fosfato de los flóculos de hidróxido de hierro que lo mantenían retenido en el sedimento bajo condiciones de oxigenación. Esta “carga interna” de fósforo contribuye a estimular aún más la producción primaria y fomentar las floraciones de cianobacterias. Así, puede producirse una situación de perpetuación a largo plazo debido a esta retroalimentación positiva entre las causas y las consecuencias del fenómeno, posibilitando incluso presencia constante de floraciones de cianobacterias (Anexo 9) (Bonilla, 2009, p.28).

La presencia de cianobacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico y/o de regular su flotabilidad es una característica común en ambientes eutróficos. Ambas capacidades brindan a estas especies ventajas para dominar el fitoplancton y, potencialmente, desplazar a las algas eucariotas. La dominancia de cianobacterias en el fitoplancton, comúnmente menos apetecible para los herbívoros, resulta en una disminución del alimento y la energía disponible para los niveles tróficos superiores (Massaut & Ortiz, 2003, p.16). La cascada de efectos derivados de los cambios en la comunidad algal puede dar como resultado modificaciones importantes de la estructura global del ecosistema. Así, especies relevantes para la estructura trófica o desde el punto comercial pueden ser negativamente impactadas o desaparecer por el proceso de eutrofización (Riobos & Martínez, 1994, p.29).

## 8. Producción de toxinas y otros metabolitos

Las cianobacterias producen una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales son tóxicos para animales y se conocen con el nombre genérico de cianotoxinas. En muchos casos, las cianotoxinas son metabolitos secundarios en la formación de los ftopigmentos, que se acumulan en el citoplasma en determinadas situaciones. Estos compuestos pueden afectar la biota acuática y terrestre incluyendo a los seres humanos (Bonilla, 2009, p.28; Capos & Lisperguer, 2005, p.74).

La producción de toxinas varía con el ciclo de vida del organismo: poblaciones senescentes producen entre 8 y 15 veces más toxinas que las poblaciones de un día. En muchos casos, condiciones ambientales de estrés pueden estimular su producción, a su vez, puede suceder que para la misma especie de cianobacteria algunas cepas produzcan toxinas y otras no (Bonilla, 2009, p.29).

Varias cianotoxinas están presentes en el interior de la célula (endotoxinas), siendo liberadas al medio en situaciones de lisis o ruptura celular, lo que ocurre en el proceso de senescencia natural o por acción de factores ambientales. Por ejemplo, las floraciones de cianobacterias pueden tener una duración de pocos días y sobre el final de la floración, cuando las células comienzan a morir, se pueden registrar los máximos de cianotoxinas disueltas en el agua. Por este motivo, los métodos de remoción de cianobacterias que impliquen lisis celular pueden ser contraproducentes ya que favorecen la liberación de las toxinas al medio acuático. Una vez liberadas al ambiente, las cianotoxinas tienen una persistencia variable (pocos días a meses) antes de ser biodegradadas o destruidas mediante fotólisis o biodegradación por bacterias (Berrendero, 2008, p.22; Capos & Lisperguer, 2005, p.75).

Las cianotoxinas pueden ser de muy diversa naturaleza química: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos, aunque normalmente se clasifican por los efectos que producen: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas irritantes (Bartram, 1999, p.22).

Las neurotoxinas son producidas principalmente por especies y cepas de los géneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* y *Cylindrospermopsis*. Se conocen más de cinco neurotoxinas. La anatoxina-a, fue la primera en ser química y funcionalmente definida, se trata de un importante bloqueador neuromuscular post-sináptico que impide la degradación de la acetilcolina ligada a los receptores. Un mecanismo semejante tiene la anatoxina-a (s),

estructuralmente caracterizada. Otras neurotoxinas del tipo PSP (“Paralytic Shellfish Poisoning”), inicialmente caracterizadas en dinoflagelados marinos causantes de las mareas rojas, han sido aisladas en cepas de cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbia* y *Cylindrospermopsis*. Las neurotoxinas del grupo de las PSP, inhiben la conducción nerviosa bloqueando los canales celulares de sodio. La acción de las neurotoxinas es rápida, causan la muerte por parada respiratoria a los pocos minutos de la exposición. La mayoría han sido identificadas como alcaloides o compuestos organofosforados neurotóxicos. Dosis orales producen la muerte aguda sólo en concentraciones elevadas, aunque la toxicidad de las células de las cianobacterias es alta, y los animales pueden ingerir una dosis letal al beber unos pocos mililitros de agua conteniendo altas concentraciones de cianobacterias procedentes de las acumulaciones superficiales (“mantas”, “scum”) de los blooms remansados en las orillas (Anexo 10) (Capos & Lisperguer 2005, p.76-77).

Las Hepatotoxinas ocasionan el tipo más común de intoxicación relacionado con las cianobacterias. De acción más lenta, causan la muerte en horas o a los pocos días, son péptidos, y fueron caracterizadas como heptapéptidos cíclicos (microcistinas), y como pentapéptidos (nodularinas). Actualmente son conocidas más de 8 nodularinas distintas, clasificadas de acuerdo con las variaciones en su grado de metilación, composición e isomerización de sus aminoácidos (Capos & Lisperguer, 2005, p.77). Las especies identificadas como productoras están incluidas en los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* y *Cylindrospermopsis*. Las hepatotoxinas llegan a los hepatocitos por medio de los receptores de los ácidos biliares y provocan una retracción de los hepatocitos y una pérdida de contacto entre ellos y las células que forman los capilares sinusoides, provocando que el hígado pierda su arquitectura y desarrolle graves lesiones internas, ya que la pérdida de contacto entre las células origina espacios internos (vacuolización) que provoca la afluencia de sangre capilar, lo que ocasiona un edema hepático (hepatomegalia) acompañado de la anastomosis de los vasos sanguíneos (Anexo 10). Otro alcaloide hepatotóxico, denominado cilindrospermosina, fue aislado en algunas especies de cianobacterias (especialmente en climas tropicales y templados): *Cylindrospermopsis raciborskii* y en *Umenzaquia natans*, su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica, causando daños severos en las células renales de los animales ensayados. A través del estudio de los mecanismos de acción de esas hepatotoxinas, se ha demostrado que varias microcistinas y nodularinas son potentes inhibidores de las fosfatasa tipo 1 y 2A de las células

eucariontes, por lo que han resultado ser potentes promotores de tumores hepáticos (Bartram, 1999, p.25).

El grupo de las citotoxinas está representado fundamentalmente por una toxina, la cilindrospermopsina. Su naturaleza química es alcaloidea, y sus mecanismos de acción aún no son conocidos en toda su magnitud, pero se considera citotóxica ya que afecta a una gran diversidad de líneas celulares y entre sus órganos diana tiene una gran diversidad de estos (hígado, bazo, riñones, timo y corazón). Se han descrito organismos productores dentro de las especies *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum* y del género *Raphidiopsis*. Esta toxina aunque está apareciendo en muchos cuerpos de agua es más sensible a los oxidantes y los tratamientos tradicionales la destruyen (Bartram, 1999, p.27).

Las dermatotoxinas son normalmente alcaloides como aplisiatoxina y lyngbyatoxina, producen dermatitis severa con el simple contacto cutáneo. En caso de ingestión accidental producen inflamación gastrointestinal. Son producidas por *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Schizothrix*.

Estas cianotoxinas también son potentes promotores de tumores, activadores de la proteína quinasa C (Capos & Lisperguer, 2005, p.78).

Las toxinas irritantes, son de naturaleza lipopolisacáridica (LPS). Es la parte lipídica de esta molécula la que produce unos efectos irritantes o alergénicos en los mamíferos expuestos. Generalmente los LPS de las cianobacterias son menos tóxicos que los LPS de algunas bacterias patógenas (como Salmonella). En presencia de estos compuestos los vertebrados disparan la producción de interferón e interleucinas (Bartram, 1999, p.28).

#### **a. Vías de exposición**

Los seres humanos se exponen a las cianotoxinas por diversas vías. La más relevante es la vía oral, ya sea por ingestión de agua de consumo, alimentos, suplementos dietéticos o por ingestión durante actividades recreativas (Pérez y otros, 2008, p.53). Otras vías de exposición pueden ser el contacto directo de partes del cuerpo (ejemplo: en baños de recreación) o por inhalación de agua con toxinas o células de cianobacterias. Debido a su carácter hidrofílico, en general, las cianotoxinas no penetran a través de la piel pero pueden producir irritación de piel y mucosas. El consumo de suplementos dietarios algales contaminados con toxinas también es un riesgo (Bonilla, 2009, p.30).

Algunos de los síntomas más comunes, que pueden deberse a la exposición a una o varias toxinas son muy inespecíficos e incluyen: vómitos, diarreas, irritaciones en la piel y mucosas, dolor abdominal y cefaleas (Bonilla, 2009, p.30).

#### **b. Niveles de referencia**

La toxicidad de las cianotoxinas es muy variada, oscilando entre 10 µg/kg de animal en algunas saxitoxinas hasta 70,000 µg/kg en los lipopolisacáridos. Sin embargo, por desgracia la cianotoxina más habitual, la microcistina LR presenta una toxicidad muy elevada, de unos 50 µg/kg de ratón, por lo que, para que se pueda comparar indica que es el doble de tóxico que el gas sarín usado en las guerras, o unas 100,000 veces más tóxico que el pesticida atrazina, que recientemente ha contaminado algunas masas de agua españolas. Con estos valores conviene remarcar que las cianotoxinas se consideran los compuestos más tóxicos y más preocupantes en las masas de agua tanto por su amplia distribución como por su elevada toxicidad (Bartram, 1999, p.40).

### **B. Departamento de Sololá**

De las ocho regiones en que se divide la República de Guatemala, el departamento de Sololá pertenece a la Región VI, Sur occidente, junto a los departamentos de San Marcos, Quetzaltenango, Totonicapán, Retalhuleu y Suchitepéquez. Esta Región ocupa el 11% del territorio nacional, con una extensión de 12,230 kilómetros cuadrados, con los siguientes límites departamentales: al Norte con Totonicapán y Quiché, al Sur con Suchitepéquez, al Este con Chimaltenango; y al Oeste Suchitepéquez y Quetzaltenango (Castellanos, 2002, p.66). Se ubica en la latitud 14°46'26" y longitud 91°11'15", está a 2,113.50 metros sobre el nivel del mar y a una distancia de 140 kilómetros de la Ciudad Capital de Guatemala (Anexo 11). Su precipitación pluvial es de 2,895.9 mm., con un clima generalmente frío, aunque el departamento posee una variedad de climas debido a su topografía, por lo que su suelo es naturalmente fértil, inmejorable para toda clase de cultivos (Culujay, 2008, p.24).

En la mayoría, la población pertenece a los grupos étnicos: quiché, cakchiquel, mam, tzutuhil y sipakap. Los indicadores de pobreza sugieren que Sololá es uno de los departamentos más pobres del país, donde el 74.6% de la población es pobre y el 25.4% extremadamente pobre (Culujay, 2008, p.25).

El departamento de Sololá agrupa 19 municipios, en una extensión territorial de 1,061 kilómetros cuadrados, dentro de los cuales 125.7 kilómetros cuadrados pertenecen al lago de Atitlán, segundo más grande del país (Culujay, 2008, p.25).

El Centro turístico de mayor atracción para este departamento son las playas a la Orilla del Lago de Atitlán, ubicadas en los siguientes poblados: Panajachel, Santiago Atitlán, San Lucas Tolimán, San Antonio Palopó, y otros pueblos situados en la ribera del lago el cual es visitado constantemente por turistas nacionales y extranjeros (Culujay, 2008, p.26).

## **1. Lago de Atitlán**

El lago de Atitlán es el lago más profundo de Centro América y se ubica en una caldera volcánica llamada “Los Chocoyos”, que hace aproximados 84,000 años fue formada por una tremenda erupción volcánica.

Se considera que es una caldera volcánica debido a la forma y geología del lago. La parte norte está formada por material terciario, incluyendo tobas y coladas de lava, material lahárico, y sedimentos volcánicos, cubierto en parte por material cuaternario de relleno de cenizas pómez de origen diverso. En su mayoría, la parte sur está formada por rocas volcánicas, material lahárico, y tobas (Marn, 2009, p.4).

Cientos de miles de habitantes, descendientes de las culturas tzutuhil y kakchiquel, han vivido en el área durante siglos debido a las múltiples riquezas de ella. El turismo local y extranjero ha sido atraído no solo por el hermoso paisaje, sino por las claras y azules aguas del lago, entre otras cualidades. Dentro de la cuenca del lago se encuentran asentados quince municipios cuya población se estima de 140,200 habitantes (INE, 1994). A orillas del lago están asentadas diez comunidades y arriba de las faldas de la cuenca esta el resto. Todos estos habitantes, residentes, y población flotante, dependen del lago y los ríos dentro de la cuenca como fuente de agua para diversos usos (pesca, agricultura, recreación, consumo, etc.) (Marn, 2009, p.5).

### **a. Características**

En las márgenes del lago se alzan los volcanes de Atitlán, Tolimán y San Pedro. El lago está situado a 5,000 pies de altura y tiene 18 km de longitud (Culujay, 2008, p.27).

El nivel del agua del lago tiene una fluctuación natural debido a cambios al azar de su drenaje subterráneo. Estos cambios son influenciados por movimientos sísmicos y por rápidos incrementos de volumen de agua por tormentas de lluvia, como sucedió en 1,998 con el huracán Mitch (Castellanos, 2002, p.42).

Atitlán es un lago muy profundo, alcanzando un máximo de 342 metros de profundidad. La profundidad promedio del lago es de 220 metros. El área de superficie del lago fluctúa entre 125 y 130 Km<sup>2</sup>, y su volumen de agua entre 24 y 25 Km<sup>3</sup> (Culujay, 2008, p.27).

La cuenca del lago es toda el área geográfica desde donde baja agua hacia el lago. El área de la cuenca es de 548 Km<sup>2</sup> (Castellanos, 2002, p.43).

El lago no tiene desagüe visible. Una de las características propias del lago es un viento fuerte conocido como Xocomil, que se produce generalmente a medio día, cuando los vientos cálidos procedentes del sur, chocan con las masas de aire más frías que provienen del altiplano, formando remolinos que agitan las aguas del lago convirtiéndolas en olas muy fuertes que pueden hacer zozobrar las embarcaciones (Culujay, 2008, p.28).

#### **b. Perfil ambiental del lago y su cuenca**

Como se mencionó anteriormente, la cuenca del Lago de Atitlán tiene un origen volcánico, lo cual provoca que se tenga un 79% del suelo no apto para cultivos agrícolas (Castellanos, 2006, p.45). Asimismo, el territorio de la cuenca, presenta alta vulnerabilidad socioambiental, con una densidad demográfica de 340 habitantes por Km<sup>2</sup> (Castellanos, 2006, p.46). Los 15 municipios de la Cuenca del Lago de Atitlán y su entorno generan 150 toneladas métricas de desechos sólidos al día (Culujay, 2008, p.29).

La cuenca del lago y el lago sufre los siguientes problemas de contaminación de aguas:

- Contaminación química: fertilizantes agrícolas, plaguicidas, jabones y detergentes, tintas para textiles, aceites, lubricantes y combustibles.
- Contaminación biológica: desechos humanos y de animales domésticos, aguas mieles del beneficiado de café, desechos de rastros, desechos clínicos-hospitalarios, desechos de proyectos de acuicultura, plantas de tratamiento, fuga de fosas sépticas, escurrimiento de áreas de pastoreo, etc.
- Contaminación física: desechos sólidos y ripio.

### **c. Situación del Lago de Atitlán**

El 29 de octubre del 2009, un florecimiento de cianobacteria apareció en el lago como un alga verde. Normalmente la bacteria está presente en estado dormido, pero cuando la temperatura del lago se incrementa (lo que sucedió ese año debido al aire caliente producido por El Niño) el florecimiento de la bacteria se tornó visible (Castellanos, 2002, p.46).

El florecimiento excesivo de la cianobacteria, identificada como *Lyngbya hieronymussi*, es la herencia que se tiene hoy día, derivado de los impactos acumulativos provocados en el tiempo, por el mal uso y manejo de los bienes y servicios naturales de este ecosistema hídrico (Castellanos, 2002, p.47). Se han detectado florecimientos cada año, siendo los más evidentes en noviembre 2010, mayo 2011 y el último florecimiento encontrado en mayo 2012.

La presencia de la cianobacteria se encuentra documentada desde 1976. El incremento de la población de estos microorganismos en el Lago de Atitlán obedece a tres causas: la pérdida de la cadena alimenticia por la introducción de la lobina negra, pez depredador agresivo introducido en 1958, la cual desplazó a especies endémicas que contribuyen a mantener el equilibrio ecológico.; la entrada excesiva de nutrientes y basura al lago y al aumento de la temperatura inducida por el cambio climático (Castellanos, 2002, p.48). El ingreso de nutrientes se encuentra acelerado por fenómenos hidrometeorológicos extremos, como la tormenta tropical Stan en 2005, la descarga de aguas residuales, el uso inadecuado de agroquímicos y jabones contaminantes y al movimiento de tierras producto de la infraestructura. El crecimiento de las colonias de cianobacterias también es inducido por el aumento en la temperatura del agua, por arriba del rango 23° C a 25° C producido por la variabilidad climática, provocada por el cambio climático global (Culujay, 2008, p.30).

Monitoreos recientes en el lago revelan que Atitlán tiene 2% de oxígeno, cuando lo normal y sano en un manto de agua como este debe ser de 8%, esto se debe a que la cianobacteria está extendida por todo el lago (Anexo 12) (Marn, 2009, p.11).

Según los informes de médicos guatemaltecos y extranjeros, los pobladores de los diferentes municipios que rodean el Lago de Atitlán en Sololá, podrían estar en riesgo, esto debido a que aún no se sabe si las floraciones de cianobacterias son tóxicas (Culujay, 2008, p.30).

Los primeros estudios realizados por la Universidad de California (EE.UU.) junto con la Universidad del Valle, indican que las afloraciones detectadas los últimos años en el lago no son tóxicas y por lo tanto no presentan ningún tipo de riesgo para los habitantes de la zona; sin

embargo, es importante mencionar que *L. hieronymussi* es una especie bastante rara, y por lo tanto, hay pocas investigaciones acerca de su toxicidad, por lo que es importante realizar nuevos estudios, ya que en algunos países hay reportes de daños en el cuerpo humano (hígado), por la exposición continua a este tipo de microorganismo, es por ello, que las personas deben ser cautelosas mientras hayan florecimientos en el manto (Castellanos, 2002, p.49). En estos momentos el agua de lago no es buena para beber, cocinar y lavar, además, se recomienda usar protección a quienes entren en contacto directo con ella (Marn, 2009, p.10).

## **C. Pruebas del Estudio**

### **1. Test *Allium cepa* según Fiskesjo**

*Allium cepa* es un organismo que ofrece un buen modelo experimental *in vivo* para evaluar la toxicidad y genotoxicidad de sustancias y mezclas complejas (Andrioli, Wulf & Mudry, 2006, p.13).

#### **a. Principio**

Cuando un bulbo de cebolla (*Allium* sp.) se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz, y por tanto su elongación (Castillo, 2004, p.33).

### **2. Citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina***

El ensayo de citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina* es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas de *Artemia* spp. y de esta manera predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (Steven, 1993, p.53).

*Artemia* spp. son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz. Se encuentran distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Las hembras producen huevos que, en condiciones

externas favorables, eclosionan produciendo larvas o nauplii de un tamaño aproximado de 1 mm (Steven, 1993, p.54). Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. Las artemias se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7mm. Hasta la fecha *Artemia* es el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico está disponible comercialmente, esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos (Us Environmental Protection Agency, 1985, p.26).

#### **a. Principio**

El bioensayo se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte en un 50% de los nauplios de *Artemia* en 24 horas bajo las condiciones adecuadas. Esta concentración es conocida como CL<sub>50</sub> (Meyen, Ferrighi & Putnam, 1982, p. 32).

### **3. Actividad antibacteriana *in vitro***

Los cultivos microbianos se hacen con diversos propósitos, un ejemplo de ello, es su utilización para la evaluación del crecimiento de bacterias inoculadas en la superficie de medios conteniendo moléculas bioactivas (en el caso de plantas medicinales, del extracto) (Rojas, 2003, p.199). Los resultados son reportados como actividad negativa (crecimiento homogéneo a lo largo del inoculo) o positiva (sin crecimiento homogéneo a lo largo del inoculo) (España, 1994, p.274).

#### **a. Principio**

La evaluación de la actividad antibacteriana consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de una bacteria determinada en condiciones estándar con una concentración previamente determinada como punto de corte (500 – 1,000 mg/mL) de un extracto, fracción o compuesto obtenido del vegetal a ensayar (Mitscher, Leu, Bathala, Wu, Beal & White, 1972, p.158).

### **4. Actividad larvicida**

Existen aproximadamente 3,200 especies de mosquitos, siendo *Anopheles* y *Stegomyia*, vectores de dos de las más importantes enfermedades en el mundo, paludismo y dengue, respectivamente, por lo que en el pasado han sido probados compuestos naturales puros con

actividad larvicida, como una alternativa contra dichas enfermedades (Thangam & Kathiresan, 1997, p.70).

Las larvas pertenecientes a *Anopheles* y *Stegomyia*, al igual que las demás especies de mosquitos pasan por cuatro fases de mudas denominadas estadio, las formas que adquieren cada una de estas fases se llaman “instars” o estadios y son morfológicamente similares excepto por el incremento secuencial del tamaño (Arana 2002, p. 32).

#### **a. Principio**

Los diferentes estadios de las larvas se pueden enfrentar a diluciones de extractos para determinar su actividad larvicida en un modelo *in vitro* usando una concentración definida de extracto para el tamizaje y concentraciones decrecientes para determinar la dosis larvicida. (Maradufu, Lubega & Dorn, 1978, p.181).

### **5. Actividad antilevadura *in vitro***

Las levaduras son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 48-72 horas en medios artificiales específicamente diseñados, tales características permiten poner de manifiesto la inhibición del crecimiento del hongo levaduriforme por moléculas bioactivas del extracto a ensayar (Cáceres, Lopez, Gonzales, Berger, Talda & Maki, 1998, p.195).

#### **a. Principio**

El tamizaje de la actividad antilevadura evidencia *in vitro* como un extracto vegetal inhibe o no el crecimiento de un hongo levaduriforme en condiciones estándar, manejando una concentración previamente determinada conocida como punto de corte (500 – 1,000 mg/mL) (Burlingame & Reddish, 1973, p.650).

### **6. Actividad antimicótica *in vitro***

Los hongos son un reino de seres vivos unicelulares o pluricelulares que no forman tejidos y cuyas células se agrupan formando un cuerpo filamentosos muy ramificado, tienen curvas de crecimiento máximo de 7-28 días en medios artificiales específicamente diseñados. La evaluación de la actividad antimicótica pone de manifiesto la inhibición del crecimiento de un hongo bajo condiciones estándar (Mac Rae, Hudson & Towes, 1988, p.144).

### **a. Principio**

El tamizaje de la actividad antimicótica consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de un hongo, determinada en condiciones estándar con una concentración previamente determinada como punto de corte (entre 500-1,000 mg/mL) de un extracto a ensayar, el crecimiento de hongos filamentosos inoculados en medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar (Brancato & Golging, 1983, p.848).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El Lago de Atitlán es el recurso natural alrededor del cual gira la vida de Sololá, ya que provee de agua a la mayor parte de pobladores de la cuenca, además constituye un recurso para la pesca y el turismo; sus usos van desde la agricultura hasta el consumo humano.

Sin embargo, en estas últimas décadas, a causa de la alta contaminación producida por las aguas negras no tratadas, el exceso de detergentes y fertilizantes utilizados en la cuenca del lago y la tierra arrastrada al lago procedente de carreteras y construcciones, se ha generado un exceso de fósforo, lo cual ha permitido el florecimiento excesivo de cianobacterias.

El riesgo de la presencia de cianobacterias en el lago reside en que estas producen cianotoxinas, compuestos químicos que pueden bioacumularse en organismos acuáticos como peces, crustáceos y zooplancton, lo que puede ser un peligro para los animales y personas que los consumen.

La importancia de esta investigación radica en que actualmente no se ha comprobado el riesgo de toxicidad o usos que pueda causar a los pobladores de los alrededores del lago la presencia de estas afloraciones de cianobacterias, por lo que, los resultados de este estudio pueden presentar nuevos conocimientos beneficiando de esta manera a la población guatemalteca.

## V. OBJETIVOS

### A. Objetivo General

Determinar la actividad biocida y la toxicidad de extractos de cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el lago de Atitlán.

### B. Objetivos Específicos

1. Evaluar la actividad antibacteriana mediante bioensayos *in vitro* sobre especies de *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Establecer el nivel de toxicidad, CL<sub>50</sub>, del extracto mediante el ensayo de *Artemia salina*.
3. Evaluar el efecto tóxico y genotóxico del extracto utilizando el Test *Allium cepa*.
4. Evaluar la actividad larvicida del extracto sobre especies de *Anopheles albimanus* y *Stegomyia aegypti*.
5. Evaluar la actividad antimicótica mediante bioensayos *in vitro* sobre especies de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*.
6. Evaluar la actividad antilevadadura del extracto sobre la especie *Candida albicans*.

## **VI. HIPÓTESIS**

El extracto etanólico obtenido de afloraciones de cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el Lago de Atitlán poseen actividad biocida y citotóxica.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. Universo de Trabajo**

Cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el lago de Atitlán, ubicado en el centro del departamento de Sololá, Guatemala, a unos 160 kilómetros al oeste de la capital guatemalteca (Florecimiento de mayo 2011).

### **B. Muestra**

Extracto de cianobacterias colectadas del lago de Atitlán en los siguientes puntos:

- Centro del lago
- Frente la bomba de agua San Pedro
- Frente San Buenaventura, Panajachel

### **C. Recursos**

#### **1. Humanos**

- Seminaristas: Br. Paola Elizabeth Mora Recinos  
Br. Skarlet Pamela Ruiz
- Asesora: Licda. Margarita Paz Morales de Ramírez
- Revisora: Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández

#### **2. Físicos**

##### **a. Materiales**

- Bolsas herméticas
- Medias con poro diámetro 0.5mm
- Hieleras
- Erlenmeyers
- Beakers
- Viales con tapa de rosca
- Marcador indeleble

- Percoladores
- Tubos de ensayo
- Pipetas automáticas con puntas desechables
- Cajas de petri de plástico
- Cajas cuadriplate
- Gradilla
- Papel parafilm
- Papel filtro
- Pinzas
- Cepas de *Salmonella typhi* ATCC 14028
- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- Cepas de *Candida albicans* ATCC 597
- Cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 113 2000
- Cepas de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972
- Cepas de *Microsporum gypseum* ATCC 115 2000
- Cepas de *Microsporum canis* ATCC 36299
- Cepas de *Aspergillus oryzae* ATCC 29293
- Cepas de *Aspergillus niger* ATCC 4576
- Cepas de *Aspergillus flavus* ATCC 204304
- Larvas de *Anopheles albimanus*, Ministerio de salud publica y asistencia social, Programa de Malaria
- Larvas de *Stegomyia aegypti*, Ministerio de salud publica y assistência social, Programa de Malaria
- Huevos de *Artemia salina*
- Bulbos de *Allium* sp.
- Bisturí
- Placas de 96 pozos
- Microplacas
- Puntas amarillas de 200µL

- Puntas azules de 1000 $\mu$ L
- Papel craft
- Cinta testigo
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pecera para cultivo
- Vaso de precipitar de 2L
- Asa de nicromo en argolla
- Asa de nicromo en punta
- Camara de Neubauer
- Campanillas de Durham
- Viales

**b. Equipo**

- Rotavapor
- Autoclave
- Refrigerador
- Balanza semianalítica
- Incubadora a 37°C
- Incubadora a 25°C
- Estereoscopio
- Microscopio óptico
- Agitador tipo Vortex
- Estufa
- Campana bacteriológica con flujo laminar
- Bomba de oxígeno para pecera
- Lámpara de luz blanca
- Mechero

**c. Reactivos**

- Agua destilada

- Agua desionizada
- Sal de mar
- Etanol 70%
- Agar Sabouraud
- Agar Mueller Hinton
- Caldo tripticasa soya
- Agar-Agar
- Dextrosa
- Fosfato diácido de potasio
- Peptona
- Sulfato de sodio
- Etanol al 50%
- Solución salina
- Temefoz ®
- Furosemida ®
- Paraquat ®

#### **d. Muestra**

Extracto etanólico de cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el lago de Atitlán (Florecimiento de mayo 2011).

### **3. Institucionales**

Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

## **D. Metodología**

### **1. Recolección y toma de muestra**

Las muestras fueron recolectadas en bolsas herméticas, utilizando medias de nylon con poros de diámetro 0.5mm, asegurando el muestrear únicamente las manchas verdes o verdes-azules observadas en la superficie del Lago. La toma de muestra se realizó a varios metros de la orilla

del lago en los poblados de San Pedro la Laguna y San Buenaventura (Panajachel); además se muestreó el centro del lago.

Las bolsas con las muestras fueron mantenidas a -4 °C hasta realizar el procesamiento. Se hizo una observación microscópica para comprobar la recolección de únicamente cianobacterias, así como para describir morfología y confirmar la especie de cianobacteria recolectada.

## **2. Obtención del extracto orgánico**

Las muestras obtenidas fueron filtradas a fin de descartar el excedente de agua obtenido. Una vez filtrado, las muestras fueron secadas a una temperatura constante de 25°C, durante 2 horas, utilizando para ello una deshidratadora (deshidratadora marca CLATRONIC). A partir de la muestra deshidratada se llevó a cabo el procedimiento de extracción.

El proceso de extracción de los compuestos bioactivos de las cianobacterias se inició con la molienda de la materia prima, teniendo como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la especie para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de cianotoxinas ha sido llevada a cabo con etanol al 70%, utilizando para ello un rotavapor.

El extracto obtenido se almacenó en un frasco ámbar de 5mL para luego ser utilizado para la realización de los diferentes bioensayos.

## **3. Prueba de *Allium cepa* según Fiskesjo**

### **a. Procedimiento**

#### **i. Limpieza de los bulbos de cebolla**

- Previo al montaje de la prueba, los bulbos fueron limpiados eliminando la epidermis seca y removiendo, con un bisturí, los restos de tejido y raíces del área radicular. Es importante no dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejido, fue conveniente colocar los bulbos en agua destilada por 2 horas y dejar secar.

#### **ii. Evaluación del efecto tóxico**

- Se preparó una concentración del extracto a ensayar de 1 mg/mL con agua destilada, como control negativo se utilizó agua salvavidas y como control positivo se utilizó Paraquat en

concentraciones de 40, 4, 0.4, 0.04, 0.004, 0.0004 mg/mL; cada una de las muestras con 5 réplicas ( $p = 0.05$ ).

- El ensayo se inició con el llenado de los tubos con cada uno de los extractos y controles; este llenado hecho hasta el borde del tubo. A continuación se colocaron los bulbos limpios sobre la boca del tubo, cuidando que la zona radicular quedara inmersa en el líquido (si se trabaja con bulbos de diámetro pequeño, las pruebas se realizan en tubos de ensayo de 10 cm de longitud x 1.5 cm de ancho. En el caso de bulbos de mayor diámetro pueden utilizarse tubos o recipientes de mayor volumen, dependiendo del tamaño de los mismos. Es importante destacar que la profundidad de los recipientes debe ser tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcance el fondo del recipiente).
- Los tubos se colocaron en una gradilla, la cual se localizó sobre una mesa que no presentara vibraciones y se mantuvieron a temperatura ambiente durante un período de 48 horas, evitando la iluminación directa.
- Dos veces al día durante el período de prueba fue necesario reponer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para reponer este volumen se utilizó la muestra o dilución correspondiente, inclinando el bulbo sin sacar las raíces del tubo, adicionando cuidadosamente el volumen con ayuda de una pipeta Pasteur.

### **iii. Evaluación del efecto genotóxico**

- Una vez finalizada las 48 horas de exposición de las raíces en cada solución, se cortaron, con la ayuda de un bisturí, los meristemas de dos raíces y se colocaron en un portaobjetos con una gota de Orceína, cubriendo con un cubreobjetos. Con ayuda de un lápiz se extendieron las raíces procurando dejar una capa fina de células extendidas.
- Se fijaron las muestras con gelatina.
- Se prepararon como mínimo 5 muestras por cada solución del ensayo.
- Se observó al microscopio con objetivo 100X contando 1000 células por muestra anotando el número de células observadas en los diferentes estadios celulares (profase, metafase, anafase y telofase) y el número de células con alteraciones y aberraciones cromosómicas.

## **b. Interpretación**

El efecto de toxicidad se determinó en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al extracto a ensayar contra las de cebollas no expuestas, luego de un período de 48 horas de prueba. La cuantificación del efecto se realizó estableciendo la longitud del crecimiento de los ápices y se calculó el promedio de crecimiento del total de ápices de cada cebolla (Castillo, 2004, p.39).

El efecto genotóxico se determinó calculando el índice mitótico en cada tratamiento, haciendo uso de la ecuación: número de células en ciclo celular/ total de células observadas \* 100. Así mismo, se realizó una descripción de las aberraciones nucleares y cromosómicas encontradas en las cebollas después del contacto con los tratamientos (Andrioli y otros, 2006, p.12; Castillo, 2004, p.40).

## **4. Citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina***

### **a. Procedimiento**

#### **i. Preparación del agua de mar**

- En un vaso de precipitar, se disolvieron 35 g de sal de mar en un litro de agua destilada.
- Se realizó una marca en el vaso para indicar el volumen de agua.
- Se hirvió por 30 minutos y se completo el volumen que se evaporo según la marca.
- Se filtró y refrigeró hasta el momento de usar, temperatura de 6 - 8°C.

#### **ii. Cultivo de *Artemia salina***

- Se forro la mitad de la pecera con plástico oscuro
- Se colocó en un vaso de precipitar 200 mL del agua de mar y se aireó por 30 minutos.
- Se colocó el agua en la pecera y se agregó aproximadamente 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro).
- Se incubó por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios pasan al área abierta de la pecera (lado con luz).

### **iii. Determinación de la citotoxicidad**

- Se pesaron 4 mg del extracto a ensayar y se disolvieron con 2 mL de agua de mar.
- Se agregó por cuádruple en una microplaca 100  $\mu$ L del extracto disuelto + 100  $\mu$ L de agua de mar con 10 – 15 nauplios.
- Control negativo: 100  $\mu$ L de agua de mar + 100  $\mu$ L de agua de mar con 10 – 15 nauplios.
- Control positivo: 100  $\mu$ L de Furosemida, disuelta en agua de mar (concentración 2 mg/mL) + 100  $\mu$ L de agua de mar con 10 – 15 nauplios.
- Se incubó a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
- Se conto en el estereoscopio el número de nauplios muertos. Y se agregó metanol a los pozos, se esperaron 15 minutos y se contaron de nuevo todos los nauplios. El observar nauplios muertos en el control negativo invalida la prueba.

### **b. Interpretación**

Se calculó el porcentaje de nauplios muertos: sumando el número de nauplios muertos en los cuatro pozos (X), sumando el número total de nauplios en los cuatro pozos (Y) y dividiendo X dentro de Y multiplicado por 100. Al observar un porcentaje de nauplios muertos mayor del 50%, fue necesario repetir la prueba utilizando concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/mL (Cáceres y otros, 1998, p.37; Meyer y otros, 1982, p.45).

Se obtuvieron los valores de X y Y en cada concentración y se determinó el valor de concentración letal media ( $CL_{50}$ ). Los datos se analizaron con Statgraphics, que muestra los resultados del ajuste de un modelo de regresión tipo Probit para describir la relación entre el porcentaje de mortalidad y la variable independiente concentración (Cáceres y otros, 1998, p.37; Meyer y otros, 1982, p.45).

## **5. Actividad antibacteriana *in vitro***

### **a. Procedimiento**

#### **i. Preparación del agar-planta**

- Se prepararon tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton (dos tubos por cada extracto o compuesto a trabajar), se esterilizaron y dejaron enfriar a 50°C.

- En una caja de petri se agregó 1.0 mL de la solución del extracto disuelto, concentrado a 10 mg/mL, y los 9.0 mL de agar Mueller Hinton. La concentración final que se obtuvo fue de 1 mg/mL. Se dejó solidificar e incubar a 36°C por 24 horas para comprobar esterilidad.

## **ii. Preparación del inóculo**

El microorganismo a ensayar fue purificado en una caja de petri con agar Trypticasa Soya. Una asada del inóculo puro fue inoculada en un tubo con 5.0 mL de caldo Trypticasa Soya e incubado a 36°C durante 24 horas. 0.05 mL de la suspensión fue diluida en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% a fin de alcanzar una dilución 1:100 (Mitscher, Leu, Bathala, Wu, Beal & White, 1972, p.158).

## **iii. Demostración de la actividad antibacteriana**

Las cajas de agar-Planta fueron inoculadas con una asada de cada microorganismo a evaluar siguiendo el patrón de la plantilla. Se dejó reposar durante 5-10 min y se incubó a 36°C durante 24 horas. Se utilizó como control negativo 9.0 mL de agar Muller Hinton mezclándolo con 1.0 mL de etanol al 50% (Mitscher y otros, 1972, p.158).

### **b. Interpretación**

Se tomó como actividad negativa si las placas de agar-planta mostraban un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, actividad positiva si no hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, y como contaminación a la presencia de microorganismos fuera de la inoculación (Mitscher y otros, 1972, p.158).

## **6. Actividad larvicida**

### **a. Procedimiento**

- 1mg de extracto a ensayar se disolvió en 1mL de agua de chorro reposada.
- En una microplaca se agregó por triplicado: 100 µL del extracto disuelto + 100 µL de agua de chorro reposada con 10-15 larvas.
- Control negativo: 100 µL de agua de chorro reposada con 10-15 larvas.

- Control positivo: 100  $\mu$ L de Temefoz, disuelto en agua de chorro (concentración 0.005 mg/mL) + 100  $\mu$ L de agua de chorro reposada con 10 – 15 larvas.
- Se incubó a temperatura ambiente (25-28°C) en un lugar oscuro durante 24 horas (Thangam & Kathiresan, 1997, p.70).

## **b. Interpretación**

La prueba de tamizaje se consideró como positiva si todas las larvas se encontraban muertas. Si el porcentaje de larvas muertas era del 100 % se calculó la CL<sub>100</sub>, para ello se repitió la prueba utilizando concentraciones de 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/mL (Maradufu y otros, 1978, p.182; Thangam & Kathiresan, 1997, p.70).

## **7. Actividad antilevadura *in vitro***

### **a. Procedimiento**

#### **i. Preparación del medio de cultivo**

- Se prepararon tubos con 9 mL de agar Mueller Hinton, se esterilizaron y dejaron enfriar a 50°C. Posteriormente se agregó 1 mL del extracto a evaluar (dilución 1:10). La concentración final que se obtuvo fue de 1 mg/mL.
- El medio de cultivo se vertió en cajas de petri estériles, se dejó solidificar y se incubó a 36°C durante 24 horas para comprobar su esterilidad.

#### **ii. Preparación del inóculo**

Un inóculo fresco de la cepa a evaluar fue sembrado en 5 mL de caldo Tripticasa Soya, se incubó de 24-48 horas. Pasado ese tiempo se preparó una dilución 1:10 tomando 0.5 mL de la suspensión anterior y 4.5 mL de solución salina estéril (Burlingame & Reddish, 1973, p.650).

#### **iii. Inoculación de levaduras en placa**

Se inoculó la suspensión de levaduras en cada sección según la plantilla y se incubó a 36°C por 48 horas. Como control negativo se sembró por estrías las levaduras en una caja con agar Sabouraud (Burlingame & Reddish, 1973, p.650).

## **b. Interpretación**

Se tomó como actividad negativa aquellas placas que mostraron un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, actividad positiva si no hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, y como contaminación a la presencia de microorganismos fuera de la inoculación (Mitscher y otros, 1972, p.158).

## **8. Actividad antimicótica *in vitro***

### **a. Procedimiento**

#### **i. Preparación del medio de cultivo**

- Se prepararon tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud, se esterilizaron y se dejaron enfriar a 50°C. Posteriormente se agregó 1.5 mL del extracto a probar (dilución 1:10). La concentración final que se obtuvo es de 1 mg/mL
- El medio de cultivo se vertió en cajas de petri estériles, se dejó solidificar y se incubó a 36°C durante 24 horas para verificar la esterilidad.

#### **ii. Preparación del inóculo**

Se preparó el medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes: dextrosa 0.6 g, sulfato de sodio (NaSO<sub>4</sub>) 0.3 g, fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.3 g, peptona 0.3 g, y agar-agar 6.0 g. Se agregó 300 mL de agua, y se vertió 6 mL en tubos con tapón de rosca, se esterilizaron en autoclave y se dejaron solidificar con el mayor declive posible. Se incubó durante 48 horas a 25°C para descartar contaminación (Brancato & Golging, 1983, p. 849; Mac Rae y otros, 1988, p.145).

Se sembraron en este medio los hongos a ensayar y se incubaron a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo. Se agregó a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y se desprendió el hongo con ayuda de una varilla. Se trasvasó el material a viales con tapa rosca. Se agitó 1 minuto y se hizo un conteo de esporas en cámara de Neubauer. Se llevó la suspensión a 100 esporas/ $\mu$ L =  $1 \times 10^5$  esporas/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y se almacenó en viales estériles en refrigeración (Brancato & Golging, 1983, p. 849; Mac Rae y otros, 1988, p.145).

### **iii. Inoculación de hongos filamentosos en placa**

Se abrieron agujeros en las cajas de agar-planta, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro. Se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas y se depositaron en los agujeros. Se incubaron las cajas inoculadas a 27 °C por 14 días. Las cajas control constituyeron cajas de agar Sabouraud (13.5 mL) con 1.5 mL de alcohol al 70%. (Brancato & Golging, 1983, p. 849; Mac Rae y otros, 1988, p.145).

#### **a. Interpretación**

Se midió el diámetro de la colonia del hongo en milímetros, se calculó el porcentaje de inhibición comparando el diámetro con el de las colonias en las cajas control. Se tomó como positivo el extracto que redujo el diámetro de la colonia en un 75%. En el caso en el que el extracto mostró un efecto inhibitorio significativo se determinó la concentración inhibitoria mínima. (Brancato & Golging, 1983, p. 849; Mac Rae y otros, 1988, p.145).

### **E. Diseño de la investigación**

#### **1. Tipo de estudio**

Se realizó un estudio experimental, cuyo tipo para cada bioensayo es detallado en el inciso F (Análisis estadístico).

#### **2. Variables**

- a. Variable independiente:** extracto etanólico de cianobacterias obtenido de tres puntos clave del Lago de Atitlán (Florecimiento mayo 2011).
- b. Variable dependiente:** Actividad biocida, evaluada por la actividad antibacteriana, antimicótica, antilevadura y larvicida; potencial tóxico, genotóxico y actividad citotóxica.

## **F. Análisis estadístico**

### **1. Efecto tóxico y genotóxico**

El potencial efecto tóxico y genotóxico del extracto se evaluó con bulbos de cebolla *Allium cepa* mediante la evaluación del crecimiento promedio de raíces y alteraciones mitóticas respectivamente.

Se realizó un estudio experimental totalmente al azar. Donde se expusieron bulbos de cebolla al extracto de estudio, un control positivo con Paraquat y control negativo con agua salvavidas en cinco réplicas por cada uno. Se evaluó el crecimiento longitudinal de los ápices de *Allium cepa*, en contacto con los tratamientos. Se midió la longitud del crecimiento de los ápices y se calculó el promedio de crecimiento del total de ápices de cada cebolla (*Allium cepa*). Así mismo, para la evaluación del efecto genotóxico se calcularon cinco índices mitóticos por cada tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza de una vía. De encontrarse diferencia significativa, se compararían los extractos y el control negativo, frente al control positivo por medio de la prueba de Dunnett ( $\alpha = 0.05$ ). En el caso del efecto genotóxico se realizó una descripción de las aberraciones nucleares y cromosómicas encontradas en las cebollas después del contacto con el extracto.

### **2. Actividad antibacteriana, antimicótica y antilevadura.**

Se realizaron diversos ensayos biocidas para comprobar la capacidad que presenta el extracto de una eventual actividad antibacteriana, antilevadura, y antimicótica, mediante bioensayos in vitro sobre cuatro especies bacterianas *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.; un tipo de levaduras *Candida albicans*, y siete cepas de hongos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*.

En el caso de la actividad antibacteriana se realizó un diseño experimental de bloques completos al azar, para la actividad antimicótica el diseño fue experimental de bloques incompletos al azar y en el caso de la actividad antilevadura, por ser solo una cepa a ensayar, no tuvo diseño.

Para cada análisis se realizó una prueba de hipótesis binomial, en el caso en el que el extracto mostro un efecto inhibitorio significativo se determinó la concentración inhibitoria mínima.

Para la prueba de hipótesis binomial se requirieron cinco réplicas como mínimo para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  (según la tabla de distribución binomial) esperando que las cinco réplicas dieran el mismo resultado.

Se realizó una prueba de hipótesis binomial donde:

Ho:  $p \leq 0.5$  (No tiene efecto significativo)

Ha:  $p > 0.5$  (Si tiene efecto significativo)

Para rechazar “Ho” y concluir que el extracto tiene efecto en los cinco ensayos (replicas), todos tienen que ser exitosos. En caso de un fracaso, es necesario repetir el ensayo.

### **3. Actividad larvicida y citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina***

La actividad citotóxica de los extractos de cianobacterias se analizó mediante el bioensayo de *Artemia salina*, expresando dicha actividad como CL<sub>50</sub> o concentración letal media, es decir, la concentración que mata el 50 % de los nauplios. De igual forma la actividad larvicida se analizó sobre larvas de *Anopheles albimanus* y *Stegomyia aegypti*, expresando dicha actividad como CL<sub>100</sub>, concentración que mata el 100% de las larvas.

En el caso de la actividad citotóxica el diseño del estudio se basó en una concentración inicial de 2 mg/mL del extracto contra 10-15 nauplios de *A. salina*, en caso de mostrar toxicidad fue necesario evaluar concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/mL del extracto a fin de encontrar la CL<sub>50</sub>. Para la actividad larvicida el diseño del estudio fue basado en una concentración inicial de 1mg/mL del extracto contra 10-15 larvas de *Anopheles albimanus* y *Stegomyia aegypti* en su diferentes estadios, en caso de mostrar un efecto larvicida se evaluarían concentraciones de 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/mL del extracto a fin de encontrar la CL<sub>100</sub>.

En ambos casos, para el análisis de los datos se realizó un análisis de regresión no paramétrico con base en transformación probítica, con un intervalo de confianza del 95%, y se determinó la CL<sub>50</sub>, en la actividad citotóxica, y la CL<sub>100</sub>, en la actividad larvicida, por el método de Finney. Los datos se analizaron con Statgraphics, que muestra los resultados del ajuste de un modelo de regresión tipo Probit para describir la relación entre el porcentaje de mortalidad y la variable independiente concentración.

## VIII. RESULTADOS

### 1. Porcentaje de Rendimiento

**Tabla 1.** Áreas de muestreo del Lago de Atitlán (florecimiento mes de mayo de 2011)

	<b>Coordenadas</b>	<b>Altura (mts sobre el nivel del mar)</b>	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>Muestra recolectada</b>
<b>Centro del lago</b>	14°42'02" N 91°11'19"	1558	28	140 g
<b>Frente la bomba de agua San Pedro</b>	14°42'9" N 91°15'44"	1558	26.5	128 g
<b>Frente San Buenaventura Panajachel</b>	14°44'44 N 91°10'2"	1558	26	132 g

mts = metros, ° C = grados Celsius. Fuente: Datos experimentales muestreo en el Lago de Atitlán

En la tabla 1 se puede observar la ubicación exacta de los tres puntos muestreados del lago de Atitlán: centro del lago, frente la bomba de agua San Pedro y frente San Buenaventura, Panajachel.

**Tabla 2.** Rendimiento del extracto etanólico de cianobacterias.

	<b>Peso (g)</b>	<b>Porcentaje de rendimiento</b>
<b>Extracto etanólico</b>	0.74	10.88 %

Fuente: Datos experimentales.

En la tabla 2 se muestra el porcentaje de rendimiento (10.88%) del extracto etanólico al 70% de cianobacteria, en base a peso seco de muestra recolectada en los tres puntos clave del lago de Atitlán. El extracto fue obtenido por percolación, deshidratación y reconcentración por rotavaporación de la mezcla de las muestras obtenidas de los tres puntos clave del lago.

Las muestras fueron mezcladas para la obtención del extracto etanolico debido al objetivo del estudio de evaluar la toxicidad en general de las muestras en el lago.

## 2. Prueba de *Allium cepa* según Fiskesjo

El test de *Allium cepa* permitió la evaluación de la actividad citotóxica y genotóxica del extracto etanólico en estudio frente a ápices de cebolla con 48 horas de tratamiento en agua. En la tabla 3 se puede observar que el extracto no presentó diferencia significativa con respecto al control negativo ( $p > 0.05$ ), indicando que no presenta actividad citotóxica pues se obtuvo un alto porcentaje de crecimiento (94.5%). El análisis de varianza y la prueba de Dunnett indicaron que solamente el Paracuat® presentó efecto citotóxico significativo ( $p < 0.0001$ ) y que el extracto no tuvo efecto significativo ( $p = 0.258$ ) (Anexo 13).

En la tabla 3, también se puede observar que al evaluar la actividad genotóxica del extracto no se observó diferencia significativa con respecto al control negativo ( $p > 0.05$ ), indicándose que el extracto presenta un efecto reductor mínimo del índice mitótico (IM) en un 4.40%. El análisis de varianza y la prueba de Dunnett indicaron que solamente el Paracuat® presentó efecto genotóxico significativo ( $p < 0.0001$ ) y que el extracto no tuvo efecto significativo ( $p = 0.834$ ) (Anexo 14).

**Tabla 3.** Actividad citotóxica y genotóxica en ápices de *Allium cepa*

Solución en exposición	Citotoxicidad		Genotoxicidad	
	Promedio de crecimiento (mm)	%CRE	IM	% IN
Agua de Chorro	31.1 ± 0.76	100	20.46 ± 0.80	0
Paracuat® (0.04 mg/mL)	9.58 ± 1.90	30.8	2.52 ± 1.76	86.18
Extracto (1mg/mL)	29.4 ± 1.08*	94.5	19.56 ± 1.05*	4.40

\*  $p > 0.05$ ; Agua de Chorro: control negativo; Paracuat®: control positivo; DS= Desviación Estándar, % CRE: Porcentaje de crecimiento respecto al control negativo; IM: Índice Mitótico; % IN: Porcentaje de inhibición respecto al control negativo. Fuente: Datos experimentales.

## 3. Actividad antibacteriana y antilevadura *in vitro*

Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico contra una especie de bacteria Gram positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y tres especies de bacterias Gram negativo (*Salmonella typhi* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 25922). La actividad antilevadura se evaluó contra una especie de levadura, *Candida*

*albicans* ATCC 597. Cuando el crecimiento del microorganismo es inhibido se considera que el extracto tiene actividad positiva y cuando existe crecimiento se considera que el extracto tiene actividad negativa.

**Tabla 4.** Tamizaje de la actividad antibacteriana y antilevadura a una concentración de 1mg/mL del extracto etanólico en estudio.

<b>Microorganismo</b>	<b>Actividad antibacteriana/antilevadura</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Negativa*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Negativa*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativa*
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028	Negativa*
<i>Candida albicans</i> ATCC 597	Negativa*

\*  $p > 0.05$ ; Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inoculo. Fuente: Datos experimentales.

En la tabla 4 se puede observar que el extracto no presentó actividad significativa ( $p > 0.05$ ) contra todas las especies bacterianas y levaduriformes analizadas. El ensayo fue validado, ya que el control interno negativo, constituido por agar Muller Hinton con etanol al 50%, no mostró ninguna inhibición. El crecimiento de todos los microorganismos fue homogéneo y no se encontró contaminación en ninguna de las placas estudiadas.

#### **4. Actividad antimicótica *in vitro***

En el tamizaje antifúngico preliminar se determinó la actividad del extracto etanólico obtenido contra la fase miceliar de cuatro hongos dermatofitos (*Microsporum gypseum* ATCC 115 2000, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Trichophyton rubrum* ATCC 113 2000, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972) y tres hongos saprófitos (*Aspergillus niger* ATCC 4576, *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Aspergillus oryzae* ATCC 29293), en donde se observó que el extracto mostró actividad significativa ( $p = 0.0312$ ) contra *Trichophyton mentagrophytes*, presentando un porcentaje de inhibición del 100%. Mientras que con los otros seis hongos evaluados no presentó actividad significativa ( $p > 0.05$ ) con un porcentaje de inhibición del 0% (Tabla 5).

**Tabla 5.** Tamizaje de la actividad antifúngica a una concentración de 1mg/mL del extracto etanólico en estudio.

<b>Especie de hongo</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>	<b>(CIM) mg/mL</b>
<i>Microsporium gypseum</i> ATCC 115 2000	0 %	>1
<i>Microsporium canis</i> ATCC 36299	0%	>1
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 113 2000	0%	>1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9972	100% *	1
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 4576	0%	>1
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	0%	>1
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 29293	0%	>1

\* p = 0.0312; CIM = concentración inhibitoria mínima  
Fuente: Datos experimentales.

Para evaluar la actividad antifúngica, se calculó el porcentaje de inhibición tomándose como positivo el extracto que redujo el diámetro de la colonia en un 75%. El ensayo fue validado, ya que el control interno negativo, constituido por agar planta con etanol al 50%, no mostró ninguna inhibición. El crecimiento de los microorganismos fue homogéneo y no se encontró contaminación en ninguna de las placas estudiadas.

En el caso en el que el extracto mostró un efecto inhibitorio significativo se determinó la concentración inhibitoria mínima, como puede observarse en la tabla 5 la CIM obtenida para *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972 demuestra actividad antifúngica hasta una concentración de 1 mg/mL.

## **5. Actividad larvicida**

El tamizaje de la actividad larvicida se realizó con el extracto etanólico de cianobacterias contra larvas de los mosquitos *Stegomyia aegypti* y *Anopheles albimanus* de los cuatro estadios de vida, mediante un ensayo en placa y por cuadruplicado. Se consideró actividad positiva si el extracto en estudio provocaba la muerte del 100% de las larvas presentes en los pozos de la placa.

**Tabla 6.** Tamizaje de la actividad larvicida a una concentración de 1mg/mL del extracto etanólico en estudio sobre *Stegomyia aegypti* y *Anopheles albimanus*.

Larva	<i>Stegomyia aegypti</i>				<i>Anopheles albimanus</i>			
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
Estadio pupal								
Extracto etanólico	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Control negativo = agua de chorro reposada, \*\* Control positivo = Temefoz 0.005mg/mL; (-) no se observó muerte en el 100% de las larvas; (+) muerte del 100 % de las larvas.

Fuente: Datos experimentales.

En la tabla 6, se puede observar que la Concentración Letal (CL<sub>100</sub>) del extracto es mayor de 1 mg/mL, ya que no presento actividad larvicida significativa. Para validar el método se utilizó como control negativo agua de chorro reposada donde se observó que en todos los estadios sobrevivió el 100% de las larvas y como control positivo se utilizó Temefoz (0.005mg/mL) con lo que se observó el 100% de mortalidad en los primeros tres estadios pupales.

## 6. Citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina*

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en el bioensayo para la evaluación de la toxicidad contra *A. salina* del extracto etanólico en estudio. Se puede observar que el extracto presentó actividad citotóxica menor a 2 mg/mL, por lo que se realizó nuevamente la prueba utilizando concentraciones de 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/mL, para obtener a través del programa Finney la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), la cual fue de 0.84 mg/mL. Para validar este método se utilizó como control positivo, Furosemida, y se obtuvo una CL<sub>50</sub> de 0.72 mg/mL. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado por lo que el valor obtenido es el promedio de los cuatro pozos de la prueba, si el porcentaje es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL.

**Tabla 7.** Evaluación de la actividad citotóxica y determinación de la CL<sub>50</sub> del extracto en estudio contra Nauplios de *Artemia salina*.

<b>Extracto Etanólico en Estudio</b>	
<b>Dosis (mg/mL)</b>	<b>% de Nauplios muertos por dosis</b>
2	100
1	68
0.50	18
0.25	15
0.125	12
0.0625	5
0.03125	3
<b>CL<sub>50</sub> = 0.84*</b>	<b>50</b>

\*Intervalo de confianza al 95%: 0.63-1.02 mg/mL

Fuente: Datos experimentales.

## XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Es difícil indicar una fecha específica para que sucedan los florecimientos de cianobacterias en el lago de Atitlán, debido a que tienen que converger en el tiempo todos los factores que los promueven, la mayoría de los florecimientos del año 2009 a la fecha sucedieron entre los meses de octubre a diciembre, a excepción del registrado en el año 2011 que sucedió en el mes de mayo. Este último florecimiento fue evaluado en este estudio. La Universidad de San Pablo de Brasil identificó tres especies de cianobacteria que florecieron durante el año 2011, dominando en un 99% *Lyngbya hironymusii*, seguida de la *Microcystis* con un 0.98% y por la *Rivularia* en 0.02%, ésta última es la primera vez que se identifica en el lago de Atitlán y se identificó en un solo punto de monitoreo al centro del lago. Es importante mencionar que las dos últimas cianobacterias a las que se hace referencia en otras latitudes pueden ocasionar florecimientos peligrosos para la salud humana por el nivel de cianotoxinas que pueden producir (Domingo & Romero, 2011, p. 06).

La obtención del extracto etanólico de cianobacteria de las muestras obtenidas de tres puntos clave del lago de Atitlán (centro del lago, frente la bomba de agua San Pedro y frente San Buenaventura, Panajachel (Tabla 1), se realizó por medio de percolación con etanol al 70%, deshidratación y concentración por rotavaporación, presentándose un rendimiento de 10.88% (Tabla 2), resultado que depende del grado de humedad del material, proceso de secado y el método de extracción. Porcentaje de rendimiento aceptable, ya que últimos estudios han demostrado que con las cianotoxinas más hidrofóbicas el etanol ha sido más efectivo, mientras que también fue efectivo con las hidrofílicas; se ha demostrado también que al disminuir el contenido de etanol decrece la recuperación de las cianotoxinas más hidrofóbicas por lo que el uso de etanol al 70% es recomendado para la extracción de las mismas (Alonso, 2008).

La citotoxicidad del extracto etanólico obtenido, fue evaluada por medio de dos métodos, el test de *Allium cepa* y el test de *Artemia salina*.

*Allium cepa* es un organismo que ofrece un buen modelo experimental *in vivo* para evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad de sustancias y mezclas complejas. Este test permitió la evaluación del extracto etanólico en estudio frente a ápices de cebolla con 48 horas de tratamiento en agua. En la tabla 3 se puede observar que el extracto no presentó actividad citotóxica significativa ( $p > 0.05$ ) pues tiene un alto porcentaje de crecimiento (94.5%) con

respecto al control negativo (agua de chorro), también se puede observar que al evaluar la actividad genotóxica no presenta diferencia significativa con respecto al control negativo ( $p > 0.05$ ) observándose que el extracto presenta un efecto reductor mínimo del índice mitótico (IM) en un 4.40% (Tabla 3).

En el ensayo *in vitro*, para evaluar la actividad biocida contra bacterias, hongos levaduriformes y hongos filamentosos en la fase de tamizaje, se utilizaron microorganismos que representaran los principales géneros y especies patógenos al hombre, esto debido a que las cianobacterias gracias a tener un metabolismo secundario muy activo pueden producir compuestos orgánicos de gran potencial para el desarrollo de medicamentos (Domingo & Romero, 2011, p. 06).

El ensayo bactericida y antilevadura, determinó que el extracto en estudio no presenta actividad significativa ( $p > 0.05$ ) contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, o *Candida albicans* (Tabla 4).

El ensayo antimicótico determinó que el extracto evaluado no presentó una actividad significativa ( $p > 0.05$ ) contra *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, ya que el porcentaje de inhibición del crecimiento determinado fue del 0%. Por otro lado, el extracto presentó una actividad significativa ( $p=0.0312$ ) (porcentaje de inhibición del crecimiento del 100%) contra *Trichophyton mentagrophytes* (Tabla 5).

En el caso de *Trichophyton mentagrophytes*, ya que el extracto mostró un efecto inhibitorio significativo se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y se determinó que el extracto demuestra actividad contra este hongo hasta una concentración de 1 mg/mL (Tabla 5). Esto podría tener importancia clínica por ser una de las especies más comunes en la producción de dermatofitosis; adicionalmente, estos resultados son prometedores y enfatiza la importancia de la investigación etnofarmacológica en búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, si se considera que los antimicóticos de uso clínico son escasos, las micosis causadas por hongos dematiáceos constituyen enfermedades emergentes y en general tienen creciente importancia como agentes oportunistas en pacientes inmunocomprometidos e incluso inmunocompetentes, a lo cual hay que agregar el incremento de la resistencia al escaso número de antifúngicos existentes (Alvarez, Isaza & Acosta, 2005, p.41).

Los resultados de la evaluación larvicida del extracto en estudio contra larvas de *S. aegypti* y *A. albimanus* mostraron que el extracto evaluado posee actividad larvicida contra las dos especies de los mosquitos ensayados y sus diferentes estadios a una concentración mayor de 1 mg/mL ( $CL_{100} > 1 \text{ mg/mL}$ ) (Tabla 6).

Para obtener un perfil citotóxico más completo del comportamiento del extracto, se determinó a través de nauplios de *A. salina* que este presenta una toxicidad menor a 1 mg/mL, es decir que sí posee actividad citotóxica con una concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de 0.84 mg/mL (Tabla 7). Esta citotoxicidad pudo deberse a que en el florecimiento de cianobacteria del año 2011 se detectó en las células de cianobacteria la cianotoxina Saxitoxina STX (neurotoxina), sin embargo, las concentraciones detectadas fueron tan bajas que no presentaron ningún riesgo para la salud de las personas, ni para las especies animales del lago, los niveles presentes de STX fueron equivalentes al 0.075% de los niveles máximos permisibles para el agua potable establecidos por la OMS, eso sin considerar el gran volumen de agua del lago de Atitlán (24,400 millones de metros cúbicos de agua) que diluiría tanto la cianotoxina presente que ésta hubiera desaparecido (Domingo & Romero, 2011, p. 06).

## IX. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de cianobacteria evaluado no presenta actividad significativa contra *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
2. El extracto etanólico de cianobacteria en estudio presentó actividad citotóxica contra los nauplios de *Artemia salina* menor a 1mg/mL (CL<sub>50</sub> 0.84 mg/mL).
3. El extracto en estudio no presenta algún grado de citotoxicidad ni genotoxicidad significativo frente a la especie de *Allium cepa*, ya que presentó un alto porcentaje de crecimiento (94.5%) y un efecto reductor mínimo del índice mitótico (IM) correspondiente a un 4.40%.
4. El extracto etanólico de cianobacteria en estudio no tiene actividad larvicida contra las larvas de *Stegomyia aegypti* y *Anopheles albimanus* (CL<sub>100</sub> > 1mg/mL).
5. El extracto etanólico de cianobacteria en estudio no presenta actividad antimicótica significativa contra *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus flavus*, así mismo, presenta actividad significativativa (p = 0.0312) contra *Trichophyton mentagrophytes* (CIM 1 mg/mL).
6. El extracto etanólico de cianobacteria evaluado no presenta actividad antilevadura significativa contra *Candida albicans*.

## X. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos biocidas similares a los del presente estudio, con extractos de cianobacterias de futuros florecimientos en el lago de Atitlan y en otros lagos en los que representen un riesgo para la salud de los habitantes de sus alrededores.
2. Realizar estudios que evalúen la composición de los compuestos orgánicos del extracto etanólico de cianobacteria responsables de la inhibición del crecimiento de la especie micótica *Tricophyton mentagrophytes*.
3. Continuar con estudios que amplíen la información sobre los riesgos de la cianobacteria de generar un posible efecto toxico con el aumento de la contaminación y la aparición anual del florecimiento en el lago de Atitlán.
4. Recientemente se ha encontrado que varias especies de cianobacterias presentan una gran variedad de metabolitos que tienen actividad antibacteriana y antifúngica, por lo que sería conveniente el estudio de estos metabolitos en los florecimientos del Lago de Atitlán y otros cuerpos de agua en Guatemala.
5. Realizar monitoreos periódicos de las aguas del lago de Atitlán, ya que en florecimientos recientes se ha identificado la presencia de tres especies de cianobacteria, entre ellas *Microcystis* y *Rivularia*, cuyos florecimientos son peligrosos para la salud humana por el nivel de cianotoxinas que pueden producir.

## XI. REFERENCIAS

- Alonso, C. (2008). *Problemas de las cianobacterias en aguas de recreo y aguas de consumo*. Recuperado de: <http://hispagua.cedex.es/documentacion/documentos/Cianobacterias.pdf>.
- Alvarez, M., Isaza, G. & Acosta, S. (2005). Actividad antimicótica de diversas especies medicinales sobre diferentes especies de hongos dermatofitos. *Biosalud 14* (1), 38-45
- Andrioli, N., Wulf, A. & Mudry, M. (2006). *Allium cepa* como biomotor de toxicidad y genotoxicidad de Metronidazol. *Teoría, ciencia, arte y humanidades*, 15(002), 9-16.
- Arana, S. (2002). Determinación de la Actividad Larvicida de 18 especies de Plantas detectadas por Etnobotánica y Bioprospección en Guatemala. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Atkins, R., Rose, T., Brown, R. S. & Robb, M. (2000). The *Microcystis* cyanobacteria bloom in the Swan River. *Water Sci Tech*, 43, 107-114.
- Bartram, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their public health consequences monitoring and management. In *Behalf of WHO*. London.
- Berrendero, E. (2008). *Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, España.
- Bonilla, S. (2009). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión* (Documento técnico N° 16). Uruguay: Programa Hidrológico Internacional (PHI) de la Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República.

- Brancato, F. & Golding, N. (1983). The diameter of the mould as a reliable measure of growth. *J. Mycol*, 45, 848-863.
- Burlingame, E. & Reddish, G. (1973). Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *Clin. Med.*, 14, 649-653.
- Cáceres, A., Lopez, B., Gonzales, S., Berger, I., Talda, I. & Maki, J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. 1 Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Ethnopharmacol*, 62, 195-202.
- Capos, V. & Lisperguer, S. (2005). Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile. *Boletín Micológico*, 20, 73 – 81.
- Carrasco, D. (2007). *Cianobacterias planctónicas y Cianotoxinas en embalses españoles*. España: Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.
- Castellanos, E. (2002). Calidad del agua del Lago de Atitlán. Guatemala. *Universidad del Valle de Guatemala (UVG), Asociación Vivamos Mejor, Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) y The Nature Conservancy (TNC)*.
- Castenholz, R. (2001). General characteristics of the Cyanobacteria. *Springer, New York*, 1, 474-487.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Canadá: IDRC, IMTA.
- Chorus, I. (2007). *Riesgos a la salud causados por cianobacterias y algas de agua dulce en aguas recreacionales*. Recuperado de: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/peru/percca023.pdf>.

- Chow, S. (2003). *Encyclopedia of biopharmaceutical statistics* (2th Ed.). United States: Health Care.
- Cohen-Bazire, G. & Bryant, D. (1982). Phycobilisomes: composition and structure. *Blackwall Scientific Publications*, 19, 143-191.
- Culujay, F. (2008). *Diagnóstico socioeconómico, potencialidades productivas y propuestas de inversión: Municipio de Santa Catarina Palopó, Departamento de Sololá* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Económicas. Guatemala.
- De León, L. (2002). Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. En A. Domínguez, y R. G. Prieto (Ed), *Perfil Ambiental del Uruguay 2002* (pp. 28-37). Montevideo: Nordan-Comunidad.
- Díaz, C. (1997). *Abundancia de cianobacterias en la corriente de California y Cuenca Delfin y Absorción de luz estimada por Synechococcus DC-Z WH7803 como modelo*. La paz: Centro Intedisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR).
- Domingo, P. & Romero, M. (2011). La cianobacteria caso: Lago De Atitlan. AMSCLAE. Recuperado de: <http://amsclae.gob.gt/publicaciones/publicaciones-cinetificas/>
- España, S. (1994). Plants used in Guatemala for treatment of gastrointestinal disorders. 5. Vibriocidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia*, 65, 273-274.
- Falch, B., Konig, G. & Wright, A. (1995). Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Med*, 61, 321-328.
- Forján, E. (2008). Cianoalerta: estrategia para predecir el desarrollo de cianobacterias tóxicas en embalses. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, 17(1), 37-45.

- Friedman, E. (1980). Endolithic microbial life in hot and cold deserts. *Orig Life Evol Biosp.* 10(3), 223-235
- Ludeña, Y. (2007). *Cianobacterias en la Bahía de Mayagüez: abundancia, distribución y su relación con las propiedades bio-ópticas*. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.
- Mac Rae, W., Hudson, J. & Towers, G. (1988). Studies on the pharmacological activity of *Amazonian Euphorbiaceae*. *Ethnopharmacol*, 22, 173-172.
- Maldener, I., Fiedler, G., Ernst, A., Fernández-Piñas, F. & Wolk, C. P. (1994). Characterisation of devA, a gene required for the maturation of proheterocysts in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol*, 176, 543-549.
- Maradufu, A., Lubega R. & Dorn, F. (1978). Isolation of (5-E)-ocinonea mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. *Lloydia* 41, 181-183.
- Marn, A. (2009). *Plan de Acción Integral para la Recuperación del Lago de Atilán y su Entorno*. Guatemala.
- Massaut, L. & Ortiz, J. (2003). Aislamiento y Cultivo de Cianobacterias con Potencial de Toxicidad sobre Postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. *El mundo acuícola*, 9(40), 15-18.
- Meyer, B., Ferrigni, N. & Putnam, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45, 31-34.
- Michael, A., Thompson, C. & Abramovitz, M. (1956). *Artemia Salina* as a test organism for bioassay. *Science*, 123, 464.
- Mitscher, L., Leu, R., Bathala, M., Wu, W., Beal, J. & White, R. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, 35, 157-166.

- Oliver, R. & Ganf, G. (2000). The ecology of Cyanobacteria: their Diversity in Time and Space. In: B. Whitton, & M. Potts (Ed.), *Freshwater blooms*. (pp. 149-194). New York: Kluwer Academic Publishers.
- Pérez, D., Soraci, A. & Tapia, M. (2008). Cianobacterias y cianotoxinas: Rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. *Revista Analecta Veterinaria*, 28(1), 48-56.
- Perry, L. & Metzger, J. (1980). *Medicinal Plants of east and Southeast of Asia*. MIT Press, Cambridge.
- Pino, O. & Lazo, J. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal*, 25(1), 101-275.
- Prudente, E. (2008). *Cianobacterias*. Brasil: Universidad de Lisboa, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Animal.
- Reed, R., Warr, S., Kerby, N. & Stewart, W. (1986). Osmotic shock-induced release of low molecular weight metabolites from free-living and immobilized cyanobacteria. *Enzyme Microb Technol*, 8, 51-56.
- Riolobos R. & Martínez J. (1994). Estudio de los procesos de eutrofización de las aguas embalsadas, Riesgos para la salud, Modelo de vigilancia. En *Boletín de la Sociedad Española de Sanidad Ambiental: N° 2* (27-33). Valencia: Universidad Internacional Menéndez Pelayo.
- Rojas R. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Jethpharm* 88,199-204.
- Roset, J., Aguayo, S. & Muñoz M. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. *Revista Toxicología*, 18, 65-71.

Sánchez, D. (2002). Spatial and temporal heterogeneity in succession of cyanobacterial blooms in a Spanish reservoir. *Ann Limnol-Int J Lim*, 38(3), 173-183.

Sarukhán, J. (2004). *Microbiología Ambiental*. México: Editorial Programe.

Steven, M. (1993). *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*. United States: CRC Press Inc.

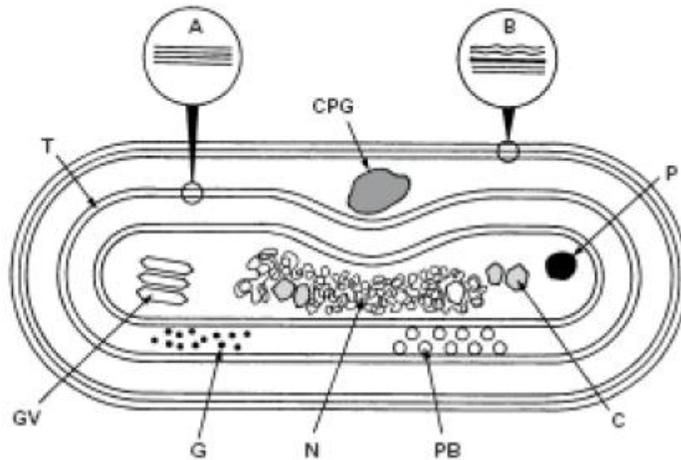
Thangam, T. & Kathiresan, K. (1997). Mosquito larvicidal activity of mangrove plant extracts and synergistic activity of *Rhizophora apiculata* with pyrethrum against *Culex quinquefasciatus*. *International Journal Pharmacology*. 3, 69-71.

Torres, A. (2004). Uso de cianobacterias en la producción de antibióticos. *Ciencia y Mar*, 9(60), 43-52.

Us Enviroment Protection Agency. (1985). Methodos for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. In B. Witton, B. & M. Potts (Eds.), *The biology of Cyanobacteria* (pp.24 - 28). Estados Unidos: Blackwell, Oxford.

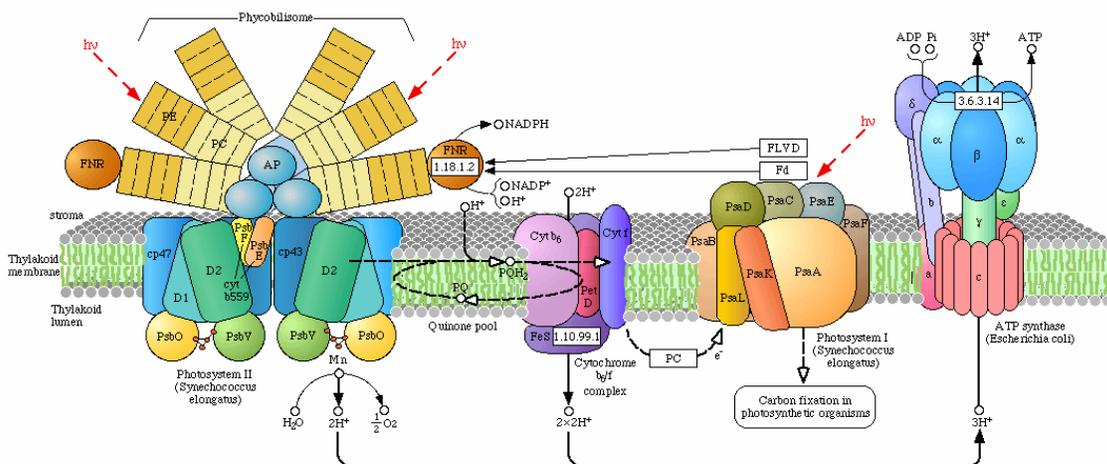
## XII. ANEXOS

**Anexo 1.** Esquema de la sección de una célula vegetativa de cianobacteria. A. detalle del tilacoide mostrando las membranas tilacoidales; B.- detalle de la envoltura celular mostrando la membrana externa, la capa de peptidoglucano y la membrana citoplasmática; C.- corboxisoma; CPG.- granulo de cianoficina; T.- tilacoide; P.- gránulo de polifosfato; N.- región nucleoplásmica; G.- gránulos de glucógeno; PB.- ficobilisoma; GV. Vésicula de gas.



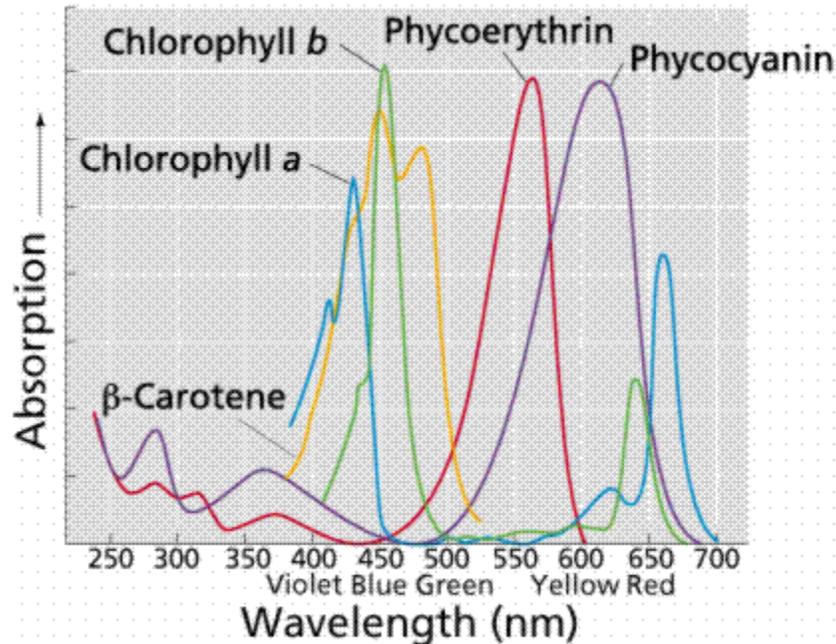
Fuente: Berrendero, E. (2008). *Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, España.

**Anexo 2.** Cadena fotosintética presente en las cianobacterias.



Fuente: Carrasco, D. (2007). *Cianobacterias planctónicas y Cianotoxinas en embalses españoles*. España: Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

**Anexo 3.** Espectro de absorción de los principales pigmentos fotosintéticos.



Fuente: Carrasco, D. (2007). *Cianobacterias planctónicas y Cianotoxinas en embalses españoles*. España: Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.

**Anexo 4.** Resumen de la taxonomía botánica de la nueva aproximación de las cianofitas según Komárek y Anagnostidis (1989, 1999, 2005).

ORDEN	FAMILIA	ALGUNOS GÉNEROS	
CHROOCOCALES	Synechococcaceae	<i>Cyanothece</i>	<i>Aphanothece</i>
	Merismope	<i>Merismopedia</i>	<i>Synechocystis</i>
		<i>Aphanocapsa</i>	
	Mycrocystaceae	<i>Eucapsis</i>	
	Chroococcaceae	<i>Chroococcus</i>	
	Entophysalidaceae	<i>Siphononema</i>	<i>Entophysalis</i>
	Hydrococcaceae	<i>Hydrococcus</i>	
	Chamaesiphonaceae	<i>Chamaesiphon</i>	<i>Chamaecalyx</i>
	Dermocarpellaceae	<i>Cyanocystis</i>	<i>Stanieria</i>
	Xenococcaceae	<i>Xenococcus</i>	<i>Chroococcidiopsis</i>
<i>Chroococcidium</i>			
Hyellaceae	<i>Hyella</i>	<i>Pleurocapsa</i>	

<b>ORDEN</b>	<b>FAMILIA</b>	<b>ALGUNOS GÉNEROS</b>	
OSCILLATORIALES	Borziaceae	<i>Borzia</i>	<i>Komvophoron</i>
	Pseudanabaenaceae	<i>Pseudanabaena</i>	<i>Leptolyngbya</i>
		<i>Limnothrix</i>	
	Schizotrichaceae	<i>Schizotrix</i>	
	Phormidiaceae	<i>Phormidium</i>	<i>Trichodesmium</i>
		<i>Arthrospira</i>	<i>Microcoleus</i>
	Oscillatoriaceae	<i>Oscillatoria</i>	<i>Plectonema</i>
<i>Lyngbya</i>		<i>Homeothrix</i>	
Gomontiellaceae	<i>Katagnymene</i>	<i>Gomontiella</i>	
NOSTOCALES	Scytonemataceae	<i>Scytonema</i>	<i>Scytonemetopsis</i>
	Microchaetaceae	<i>Microchaete</i>	<i>Tolypothrix</i>
		<i>Pentalonema</i>	<i>Hassallina</i>
	Rivulariaceae	<i>Calothrix</i>	<i>Rivularia</i>
		<i>Gloetrichia</i>	
	Nostocaceae	<i>Cilindrospermum</i>	<i>Nodularia</i>
<i>Anabaena</i>		<i>Nostoc</i>	
STIGONEMATALES	Chlorogloeopsaceae	<i>Chlorogloeopsis</i>	
	Capsosiraceae	<i>Capsoria</i>	<i>Desmosiphon</i>
	Stigonemataceae	<i>Pulvinularia</i>	<i>Stigonema</i>
	Fischerellaceae	<i>Fischerella</i>	<i>Doliocatella</i>
	Bourzinemateceae	<i>Borzinema</i>	<i>Seguenzaea</i>
	Loriellaceae	<i>Geitleria</i>	<i>Loriella</i>
	Nostochopsaceae	<i>Nostochopsis</i>	<i>Mastigocoleus</i>
	Mastigocladaceae	<i>Bachytrichia</i>	<i>Mastigocladus</i>

Fuente Berrendero, E. (2008). *Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, España.

**Anexo 5.** Resumen de la taxonomía de las cianobacterias según el Código Bacteriológico de Nomenclatura.

<b>SECCIÓN I</b>			
Unicelulares	División por fisión binaria	<i>Glerobacter</i> <i>Gloeothece</i> <i>Synechococcus</i>	<i>Gloeocapsa</i> <i>Synechocystis</i>
	División por gemación	<i>Chamaesiphon</i>	
	<hr/>		
<b>SECCIÓN II</b>			
Unicelulares con reproducción por fisión múltiple	División por fisión múltiple	<i>Dermocarpa</i>	<i>Xenococcus</i>
	División por fisión múltiple y binaria	<i>Dermocapella</i> <i>Mysosarcina</i>	<i>Chrococidiopsis</i> Grupo <i>Pleurocapsa</i>
	<hr/>		
<b>SECCIÓN III</b>			
Filamentos sin heterocistos y división en un solo plano	Tricoma helicoidal		<i>Spirulina</i>
	Tricomas rectos	<i>Oscillatoria</i> Grupo <i>LPP A</i>	<i>Pseudanabaena</i> Grupo <i>LPP B</i>
	<hr/>		
<b>SECCIÓN IV</b>			
Filamentos con heterocistos y división en un solo plano	Sin homogonios	<i>Anabaena</i> <i>Nodularia</i>	<i>Cylindrospermum</i>
	Con homogonios	<i>Nostoc</i> <i>Scytonema</i>	<i>Calothrix</i>
	<hr/>		
<b>SECCIÓN V</b>			
Filamentos con heterocistos, división en más de un plano		<i>Chlorogloeopsis</i>	<i>Fischerella</i>

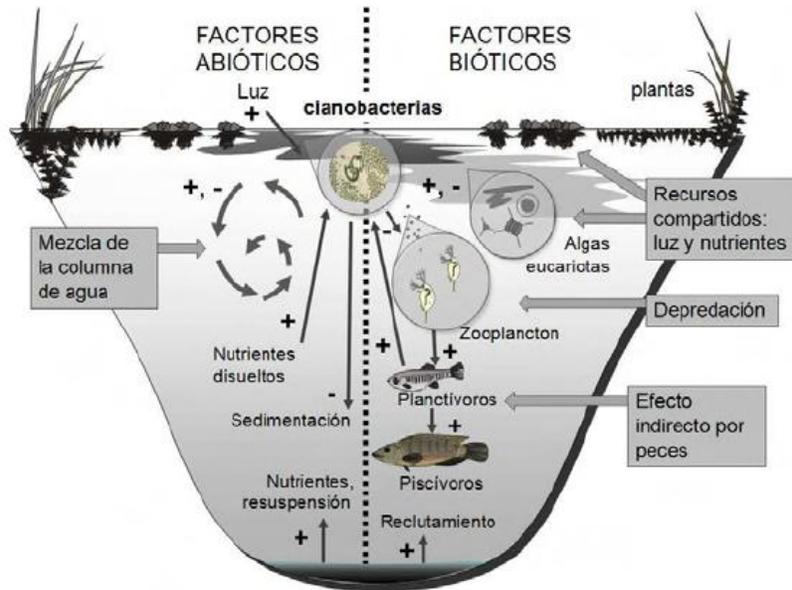
Fuente: Berrendero, E. (2008). *Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, España.

**Anexo 6.** Clasificación de cianobacterias según Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Boone y Castenholz, 2001). Los nombres en paréntesis se corresponden con los nombres de los taxones según el sistema botánico.

CLASE	Subsección	Parte	Géneros
<b>CIA NOBACTERIA</b>	I (Chroococcales)	I	<i>Chamaesiphon, Chroococcus, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanothece, Dactylocopsis, Gloeobacter, Gloecapsa, Gloeotheca, Microcystis, Prochlorococcus, Prochloron, Synechococcus, Synechocystis.</i>
	II (Pleurocapsales)	I	<i>Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria, Xenococcus</i>
		II	<i>Chroococidiopsis, Myxosarcina, Pleurocapsa</i>
	III (Oscillatoriales)	I	<i>Arthrospira, Borzia, Crinalium, Geitlerinema, Halospirulina, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Planktothrix, Prochlorothrix, Pseudanabaena, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema</i>
	IV (Nostpcales)	I	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira, Cylindrospermopsis, Cylindrospermum, Nodularia, Nostoc, Scytonema</i>
		II	<i>Calothrix, Rivularia, Gloeotrichia, Tolypothrix, Microchaete</i>
V (Stigonematales)	I	<i>Chlorogloeopsis, Fischerella, Geitleria, Iyengariella, Nostochopsis, Mastigocladopsis, Westiella, Stigonema, Doliocatella</i>	

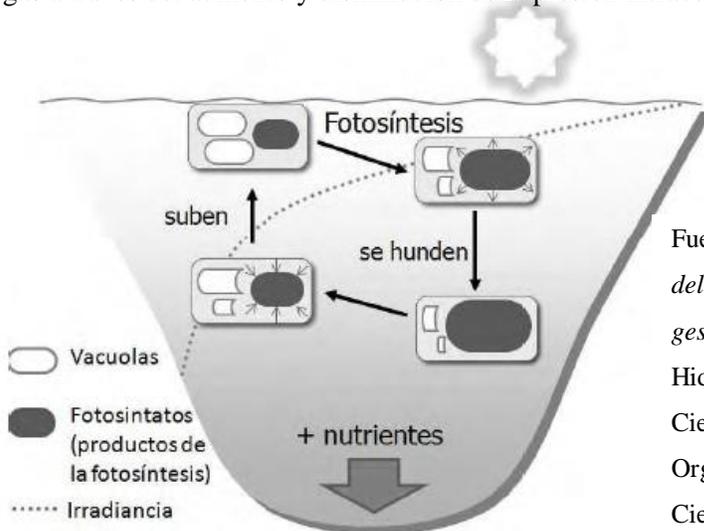
Fuente: Berrendero, E. (2008). *Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, España.

**Anexo 7.** Efecto de los factores abióticos y bióticos, simplificados como positivos (+) y negativos (-), en el crecimiento de las cianobacterias planctónicas de los ecosistemas límnicos.



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

**Anexo 8.** Ciclo simplificado de flotación y hundimiento de las cianobacterias planctónicas con vesículas de gas a través del aumento y disminución de la presión intracelular provocado por la fotosíntesis.



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

**Anexo 9.** Algunas diferencias típicas entre ambientes acuáticos oligotróficos y eutróficos.

<b>Características</b>	<b>Oligotróficos</b>	<b>Eutróficos</b>
<b>Abióticas</b>		
Contenido de oxígeno en el fondo	Alto todo el año	Bajo o ausente en verano
Fósforo total ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	4.9 - 13.3*	4.8 – 189*
Nitrógeno total ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	371 – 1180*	861 – 4081*
Transparencia (Disco de Secchi, m)	5.9 – 16.5 *	1.5 – 4.0 *
<b>Biológicas</b>		
Productividad algal y plantas	Baja	Alta
Biomasa fitoplanctónica (Clorofila <i>a</i> , $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0.8 – 3.4 *	6.7 – 31 *
Diversidad de especies	Alta	Medio a baja
Floraciones algales	Rara	Frecuente
Cantidad relativa de cianobacterias	Baja	Alta
Grupos de fitoplancton característicos	Eucariotas (Algas verdes, Diatomeas, otros)	Cianobacterias
Vegetación litoral	Macrófitas sumergidas	Algas filamentosas
Biodiversidad del ecosistema	Baja a Alta	Baja
<b>Uso humano del recurso</b>		
Calidad de agua para recreación	Buena	Mala
Potabilización	Sencilla	Costosa; Compleja

\*Promedio  $\pm$  1 desvió estándar del rango de valores del estado trófico para lagos templados (Ryding & Rast 1992)

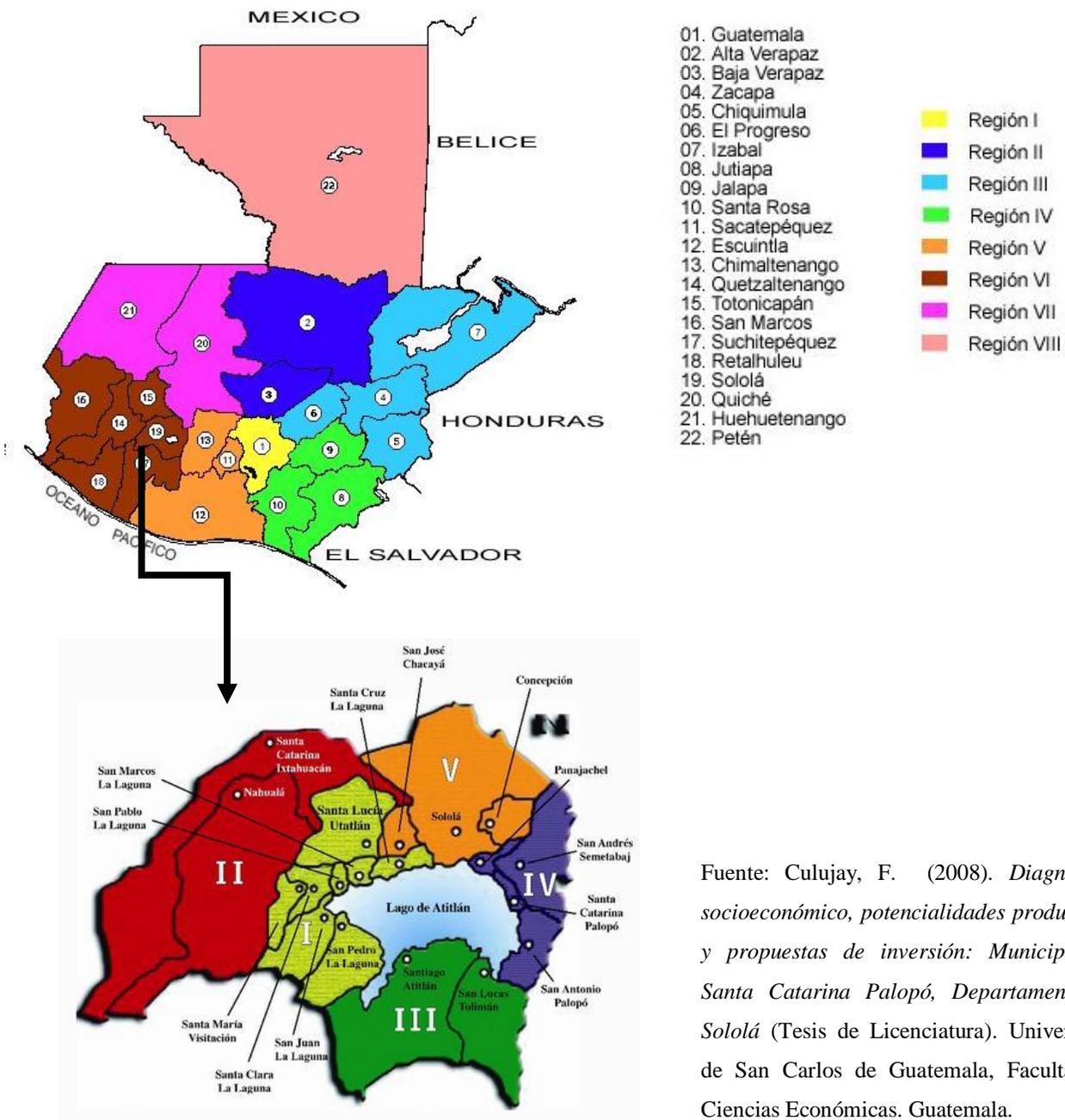
Fuente: Bonilla, S. (2009). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión* (Documento técnico N° 16). Uruguay: Programa Hidrológico Internacional (PHI) de la Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe de la Organización de las Naciones Unidas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

**Anexo 10.** Características de las hepatotoxinas y neurotoxinas producidas por cianobacterias de ambientes acuáticos continentales. Se indican el número de variantes químicas conocidas y los géneros que producen cada grupo de toxinas. Aprox.: aproximadamente.

<b>Toxinas</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Principales géneros</b>
<b>Hepatotoxinas</b>			
<b>Microcistinas</b>	Heptapéptidos cíclicos (más de 80 variantes)	Inhiben las proteínas fosfatasas hepáticas, inducen la hiperfosforilación de filamentos del citoesqueleto Daños hepáticos	<i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Aphanocapsa</i>
<b>Nodularina</b>	Pentapéptido cíclico (aprox. 8 variantes)	Similar a las microcistinas	<i>Nodularina</i>
<b>Cylindrospermopsina</b> (algunos autores la clasifican como “citotoxina”)	Alcaloide guanidinico cíclico (aprox. 3 variantes)	Inhibe la síntesis proteica. Efecto predominante hepatotóxico. Produce severas lesiones necróticas en hígado, riñón, pulmón, bazo e intestino de mamíferos.	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Raphidiopsis</i> <i>Lyngbya</i>
<b>Neurotoxinas</b>			
<b>Saxitoxinas</b>	Alcaloides carbamatos no sulfatados (saxitoxinas), monosulfatados (goniautoxinas) o disulfatados (C-toxinas) (aprox. 20 variantes)	Inhibe la transmisión nerviosa a través de bloqueo de los canales de sodio en las células incidiendo parálisis muscular.	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i> <i>Raphidiopsis</i>
<b>Anatoxina – a/ Homoanatoxina a</b>	Alcaloides (2 variantes)	Bloqueo de los receptores nicotínicos y colinérgicos post-sinápticos neuromusculares Mimetizan la acción de la acetilcolina	<i>Planktothrix</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Phormidium</i> <i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Raphidiopsis</i>
<b>Anatoxina – a (S)</b>	Organofosforado natural	Inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa, mas toxica que la anatoxina- a	<i>Anabaena</i>

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

**Anexo 11.** El departamento de Sololá pertenece a la Región VI, Sur occidente, junto a los departamentos de San Marcos, Quetzaltenango, Totonicapán, Retalhuleu y Suchitepéquez. Esta Región ocupa el 11% del territorio nacional, con una extensión de 12,230 kilómetros cuadrados, con los siguientes límites departamentales: al Norte con Totonicapán y Quiché, al Sur con Suchitepéquez, al Este con Chimaltenango; y al Oeste Suchitepéquez y Quetzaltenango. Se ubica en la latitud 14°46'26" y longitud 91°11'15", está a 2,113.50 metros sobre el nivel del mar y a una distancia de 140 kilómetros de la Ciudad Capital de Guatemala.



Fuente: Culujay, F. (2008). *Diagnóstico socioeconómico, potencialidades productivas y propuestas de inversión: Municipio de Santa Catarina Palopó, Departamento de Sololá* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Económicas. Guatemala.

Anexo 12

# Contaminación por Cianobacteria Lago Atitlán

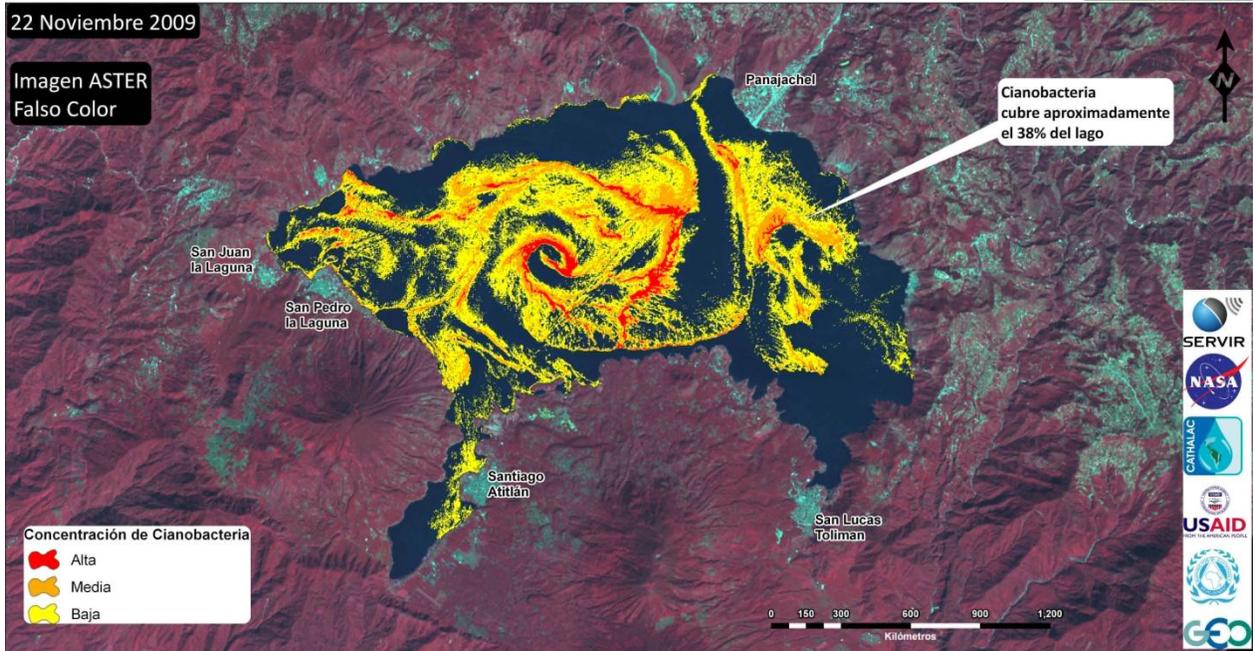
Elaborado por CATHALAC,  
24 de noviembre 2009



Sololá, Guatemala

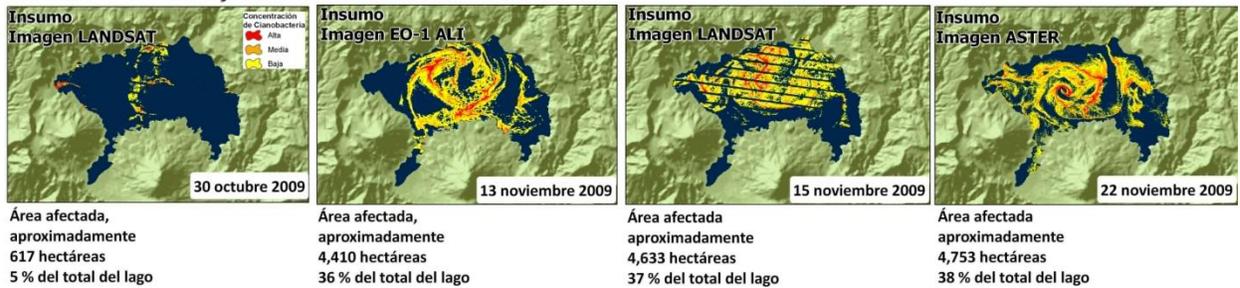
22 Noviembre 2009

Imagen ASTER  
Falso Color



Cianobacteria cubre aproximadamente el 38% del lago

## Monitoreo Temporal de la Cianobacteria



Crédito de las imágenes: SERVIR/CATHALAC/NASA/USAID/GEO

Para mayor información visite [www.servir.net](http://www.servir.net)

Fuente: Contaminación del Lago de Atitlán. Recuperado de: [http://www.servir.net/contaminacion\\_lago\\_atitlan\\_cianobacteria](http://www.servir.net/contaminacion_lago_atitlan_cianobacteria).

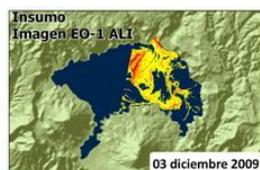
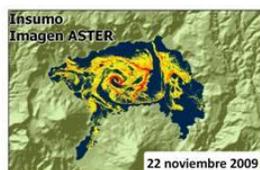
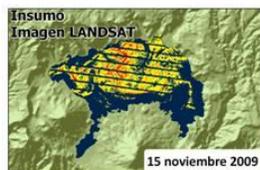
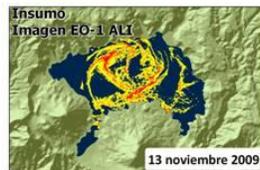
# Monitoreo Temporal del Lago Atitlán, octubre - diciembre 2009

Sololá, Guatemala

Elaborado por CATHALAC,  
05 diciembre 2009



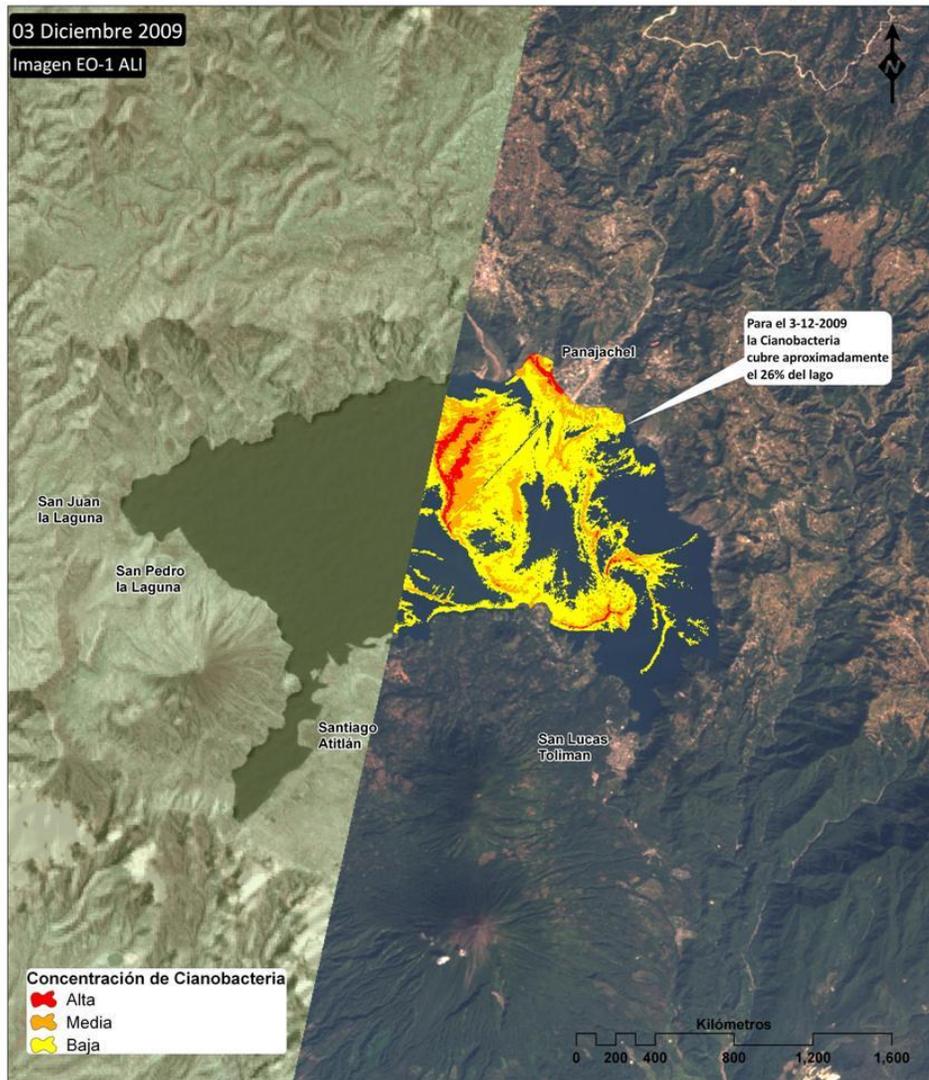
## Serie temporal de cobertura de Cianobacteria



Crédito de las imágenes:  
SERVIR/CATHALAC/NASA/USAID/GEO

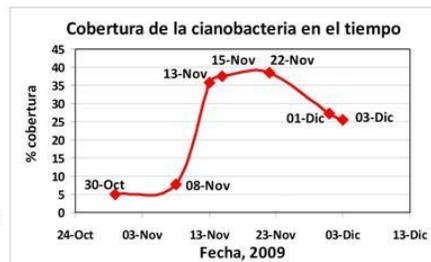


Para mayor información visite  
[www.servir.net](http://www.servir.net)



Según el análisis temporal realizado, la primera identificación de la Cianobacteria fue visualizada el 30 de octubre, con una cobertura aproximada del 5 % del lago.

Posteriormente la proliferación de cianobacteria fue aumentando, llegando a su punto máximo el 22 de noviembre, cubriendo el 38% del área total del lago. La última imagen adquirida, corresponde al 3 de diciembre. Esta imagen cubre el 55% del área total del lago. De esta cobertura un área de 3,153 hectáreas fue identificado con cianobacteria, lo que equivale al 26 % del área total del lago.



Fuente: Contaminación del Lago de Atitlán. Recuperado de:

[http://www.servir.net/contaminacion\\_lago\\_atitlan\\_cianobacteria](http://www.servir.net/contaminacion_lago_atitlan_cianobacteria)

**Anexo 13.** Test de *Allium cepa*. Tablas de análisis de varianza y prueba de dunnett de la actividad citotóxica del extracto etanólico de cianobacteria del Lago de Atitlán.

En las tablas 8 y 9 se puede observar que el análisis de varianza y la prueba de Dunnett indicaron que solamente el Paracuat® presentó efecto citotóxico significativo ( $p < 0.0001$ ) y que el extracto no tuvo efecto significativo ( $p = 0.258$ )

**Tabla 8.** Análisis de Varianza de la actividad citotóxica del extracto etanólico en estudio.

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1198,305 <sup>a</sup>	2	599,153	264,364	0,000
Intercept	6444,967	1	6444,967	2,844E3	0,000
Tratam	1198,305	2	599,153	264,364	0,000
Error	20,397	9	2,266		
Total	7663,670	12			
Corrected Total	1218,703	11			

R Squared = 0,983 (Adjusted R Squared = 0,980)

Fuente: Datos experimentales

**Tabla 9.** Prueba de Dunnett de la actividad citotóxica del extracto etanólico en estudio.

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Paracuat	Agua	-21,975*	1,0645	0,000	-24,758	-19,192
Extracto	Agua	-1,650	1,0645	0,258	-4,433	1,133

The error term is Mean Square(Error) = 2,266.

\*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Fuente: Datos Experimentales

**Anexo 14.** Test de *Allium cepa*. Tablas de análisis de varianza y prueba de dunnett de la actividad citotóxica del extracto etanólico de cianobacteria del Lago de Atitlán

En las tablas 10 y 11 se puede observar que el análisis de varianza y la prueba de Dunnett indicaron que solamente el Paracuat® presentó efecto genotoxico significativo ( $p < 0.0001$ ) y que el extracto no tuvo efecto significativo ( $p = 0.834$ )

**Tabla 10.** Análisis de Varianza de la actividad genotóxica del extracto etanólico en estudio

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	816,412 <sup>a</sup>	2	408,206	115,551	0,000
Intercept	2412,302	1	2412,302	682,849	0,000
Tratam	816,412	2	408,206	115,551	0,000
Error	31,794	9	3,533		
Total	3260,508	12			
Corrected Total	848,206	11			

R Squared = 0,963 (Adjusted R Squared = 0,954)

Fuente: Datos experimentales

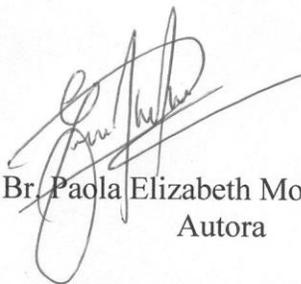
**Tabla 11.** Prueba de Dunnett de la actividad genotóxica del extracto etanólico en estudio

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Paracuat	Agua	-17,8250*	1,32904	0,000	-21,2990	-14,3510
Extracto	Agua	-,6750	1,32904	0,834	-4,1490	2,7990

The error term is Mean Square(Error) = 3,533.

\*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Fuente: Datos Experimentales



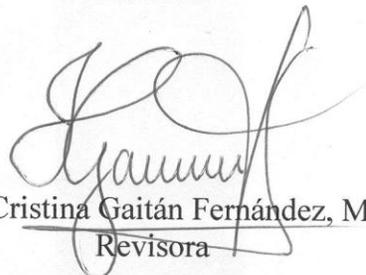
Br. Paola Elizabeth Mora Recinos  
Autora



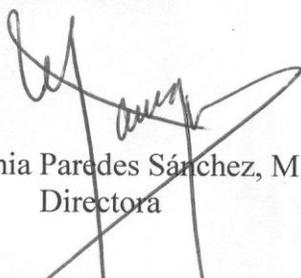
Br. Skarlet Pamela Ruíz  
Autora



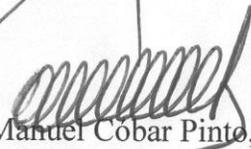
Margarita Paz Morales de Ramírez, M.A.  
Asesora



Isabel Cristina Gaitán Fernández, M.A.  
Revisora



María Eugenia Paredes Sánchez, M.A.  
Directora



Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.  
Decano