

## **Ensayo de inhibición de la fosfatasa para la detección del riesgo por contaminación con microcistinas en agua**

### **Phosphatase inhibition assay for risk detection due to contamination with microcystins in water**

Liliana María Gomez-Luna<sup>1</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1282-3392>

José Carlos Rodríguez-Tito<sup>2</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3630-6557>

Narvis Cedeño-Soularit<sup>3</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8498-8006>

Yadenis Ortega-Díaz<sup>1</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9674-9785>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Santiago de Cuba, Cuba.

<sup>2</sup> CINTRO S.A., Sede Mella, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

<sup>3</sup> Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Santiago de Cuba, Cuba

Autor para la correspondencia: [lilianag@uo.edu.cu](mailto:lilianag@uo.edu.cu)

Recibido: 12 de diciembre de 2023

Aprobado: 20 de enero de 2024

## **RESUMEN**

Las microcistinas en aguas de consumo han sido identificadas como máxima prioridad a escala global, debido a los efectos tóxicos sobre la salud humana, por lo que se evaluó el ensayo de inhibición de la fosfatasa como método diagnóstico rápido para la detección del riesgo por contaminación con microcistinas en agua. El experimento se realizó a partir de la modelación analógica del ensayo para la determinación de fosfatasa alcalina. En todos los casos estudiados, el porcentaje de inhibición fue desde 65 % hasta el 95 % en las muestras estudiadas, lo que indica que el método utilizado es sensible y válido para este tipo de análisis. Estos resultados se verificaron con la identificación de especies, estudio complementario que permitió confirmar los resultados obtenidos. El protocolo propuesto es válido para la detección del riesgo por contaminación con microcistinas en aguas para consumo humano, mostrando alta sensibilidad.

**Palabras clave:** Cianotoxinas, Fosfatasa, Microcistinas, Calidad del agua.

## **ABSTRACT**

Microcystins in drinking water have been identified as a top priority on a global scale, due to their toxic effects on human health, so the phosphatase inhibition assay was evaluated as a rapid diagnostic method for the detection of the risk of microcystin contamination in water. The assay was performed based on the analog modeling of the alkaline phosphatase assay. In all the cases studied, the percentage of inhibition ranged from 65 % to 95 %, indicating that the method used is sensitive and valid for this analysis. These results were verified by species identification, as a complementary study that confirmed the results obtained. The proposed protocol is valid for the detection of microcystin contamination risk in water for human consumption, showing high sensitivity.

**Keywords:** Cyanotoxins, Phosphatase, Microcystins, Water quality.

## INTRODUCCIÓN

A escala global, uno de los problemas de calidad de agua más extendido es el incremento progresivo de la eutrofización, fundamentalmente relacionada con la presencia de fósforo y nitrógeno en los ambientes acuáticos. Ello ha condicionado una frecuencia cada vez mayor de proliferaciones incontroladas del fitoplancton con efectos ambientales colaterales. Entre las especies formadoras de floraciones algales destacan las cianobacterias, las que además son capaces de producir cianotoxinas, que tiene efectos perjudiciales para la salud e incluso pueden ser letales para animales y humanos.<sup>(1)</sup> Estas floraciones representan en la actualidad una seria amenaza para el uso y la sostenibilidad de los ecosistemas acuáticos, por las afectaciones que produce en sus servicios ambientales, fundamentalmente en lo que respecta al suministro de recursos hídricos.<sup>(2)</sup>

Uno de los grupos de cianotoxinas que ha generado mayor interés investigativo a nivel mundial por sus efectos indeseados en la salud animal y humana, es el de las hepatotoxinas, y dentro de ellas, las microcistinas.

La microcistina-LR (MC-LR) ha sido identificada como una de las toxinas de mayor prioridad debido a los efectos sobre la salud humana, su presencia frecuente en cuerpos de agua, su estabilidad y susceptibilidad de las cianobacterias, que la producen a los tratamientos mecánicos o químicos de las plantas potabilizadoras, con la consiguiente liberación de las toxinas intracelulares.<sup>(3,4)</sup>

Su efecto sobre la salud pública se conoce desde hace décadas en Brasil, Uruguay, Argentina, Corea y otras regiones del mundo, debido a la muerte de seres humanos y animales después de beber agua con contenidos de cianobacterias tóxicas.<sup>(5)</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido provisionalmente un nivel máximo de microcistina-LR en aguas para consumo humano de  $1 \mu\text{gL}^{-1}$ , recomendación que se ha incorporado en países como España, Canadá, Australia y Nueva Zelanda. Sin embargo, en Cuba constituye aún un tema pendiente establecer dichos límites.

Los métodos existentes para la detección y cuantificación de estas toxinas son numerosos, siendo el más sensible la determinación por ELISA.<sup>(6)</sup> No obstante, este resulta muy costoso. Una alternativa es el ensayo de inhibición de la fosfatasa que, si bien no es tan específico, resulta mucho más económico y constituye un método de detección sensible para

microcistinas y nodularinas. Resultando relevante el análisis de la utilidad de los kits disponibles en el mercado.

En Cuba no se considera la determinación de cianotoxinas en los análisis de rutina del agua. Sin embargo, el riesgo por su presencia es cada vez mayor,<sup>(7)</sup> asociado ello a cambios de variables, climáticas y contenido de materia orgánica en las aguas,<sup>(8,9)</sup> por lo que es imprescindible desarrollar métodos de diagnósticos rápidos para la detección del riesgo de contaminación con cianotoxinas, específicamente de microcistinas en aguas para consumo humano, y establecer sistemas de vigilancia que contribuyan a minimizar los efectos negativos de este fenómeno.

Los hallazgos realizados hasta la fecha permiten definir la necesidad de proponer un método diagnóstico que facilite la identificación rápida del riesgo ante la presencia de cianotoxinas, cuya detección no forma parte de la normativa vigente para los análisis de calidad de agua, ni en fuentes de abasto, ni en plantas potabilizadoras destinadas al consumo humano. El objetivo de la presente investigación es evaluar la utilidad del ensayo de inhibición de la fosfatasa con el uso del kit HELFA DIAGNÓSTICOS, de producción nacional, como método diagnóstico rápido para la detección del riesgo por contaminación con microcistinas en muestras ambientales, específicamente en agua cruda y potable, realizando las modificaciones pertinentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron por duplicado, muestras integradas de la columna de agua en cada uno de los puntos de muestreo, definidos *a priori* en los diferentes ecosistemas, según protocolos de muestreos del fitoplancton, en horas de la mañana (9:00-10:00 a.m.), a profundidades entre 15 y 30 cm en los ecosistemas.<sup>(7)</sup> Para los muestreos se utilizan envases de borosilicato estériles de 250 mL, con tapas de rosca. En los puntos de toma de agua se colectó el agua a la salida del grifo. Las muestras analizadas proceden de diferentes puntos y/o sitios (n= 7): embalse Parada (Pa), embalse Chalons (Ch), del río San Juan (SJ), de la salida de la planta de tratamiento de Quintero (Qui), de la micropresa La Campana (LC), así como aguas servidas de casas particulares en el Poblado Caney y del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio en completa oscuridad, guardando las medidas sépticas

pertinentes para no propiciar la contaminación de estas, procediéndose de inmediato a su recuento y análisis en fresco.<sup>(10)</sup>

### Ensayo de inhibición de la fosfatasa alcalina

Se realiza a partir de la modelación analógica del ensayo para la determinación de fosfatasa alcalina (FAL test) (HELFA DIAGNÓSTICOS, Cuba). Se determinó el porcentaje de inhibición a través de la cinética de la fosfatasa alcalina sérica, cuya actividad es proporcional al p-nitrofenol producido por hidrólisis del p-nitrofenilfosfato 50 mmL<sup>-1</sup> (sustrato; reactivo II), utilizando el kit de referencia, según el método recomendado por Bessey *et al.*, modificado.<sup>(11)</sup>

El desarrollo del color se logró por reacción con dietanolamina de concentración 1,427 molL<sup>-1</sup> (reactivo 1) con p-nitrofenilfosfato. La fuente de la enzima es el Spinrol (suero de control multiparamétrico ELITech; suero humano liofilizado). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1 min, determinándose la variación de densidad óptica por min, a 405 nm, durante 3 min, contra un blanco reactivo preparado con agua bidestilada filtrada. La actividad enzimática se calculó mediante la siguiente ecuación (1):

$$\text{Actividad(UL}^{-1}\text{)} = \Delta\text{DO}_{\text{min}} - 1 \cdot 2750 \quad (1)$$

donde: 2 750 es el factor de actividad enzimática

DO: Densidad Óptica

Para el desarrollo del ensayo, se filtró un volumen total del 5 mL de cada muestra, sin enriquecimiento previo de nutrientes, y de los controles, mediante un filtro de jeringa de microfibra de vidrio ALBET JFV-25 de 0,25 μm.

Para el desarrollo de la cinética, se mezclaron los reactivos I y II en la proporción (4:1, v:v), añadiendo 2 mL de dicha mezcla a 2 mL de cada muestra. Se añaden entonces 40 μL de suero reconstituido y comienza el desarrollo de la cinética por 3 min. El porcentaje de inhibición se calcula a partir de los datos de máxima actividad enzimática.

### Curva de calibración de microcistinas

La curva de calibración de microcistinas se realizó a partir de estándares de Abraxis (EE. UU), previamente diluidos con agua MilliQ, hasta lograr las siguientes concentraciones:

- a. Microcistina C1- 0,037 5 ppb
- b. Microcistina C2- 0,10 ppb = 1μgL<sup>-1</sup> o 1 ngmL<sup>-1</sup>
- c. Microcistina C3- 0,25 ppb. Microcistina C4- 0,5 ppb

d. Microcistina C5- 1,25 ppb

e. Microcistina C6- (0,187 5 ± 0,018 5) ppb (Control de calidad)

Se desarrollaron los mismos pasos del protocolo del ensayo de inhibición de la fosfatasa, estableciendo porcentajes relativos calculados a partir de los datos de máxima actividad enzimática.

### Análisis físicoquímicos complementarios

Los procedimientos y técnicas empleados fueron los establecidos para estudios de calidad de agua en el Laboratorio de Ecotoxicología y Servicios Ambientales (LESA) del CNEA. Los indicadores determinados fueron seleccionados teniendo en cuenta los requisitos de las normas cubanas NC:827-2012, y NC:1021:2014.<sup>(12, 13)</sup>

Para estas determinaciones, se utilizaron diferentes equipos: fluorímetro Alga Torch (bbe Moldankee/ATO U6-074) para detección de pigmentos *in vivo*; un medidor multiparamétrico de pH/Conductividad (Mettler Toledo/ Seven Go Duo); un medidor de OD (Mettler Toledo/ Seven Go), y un turbidímetro Turbiquant 3000T; todos calibrados según las normas empleadas para evaluar la calidad de las aguas<sup>(12, 13)</sup>. Los parámetros determinados en las muestras fueron: pH, conductividad eléctrica (μScm<sup>-2</sup>), sólidos totales disueltos (μgmL<sup>-1</sup>), oxígeno disuelto (μgmL<sup>-1</sup>), turbidez (UNT), salinidad (ups), concentración de clorofila y cianopigmentos (μg<sup>-1</sup>).

### Identificación y cuantificación del fitoplancton

Se realizó primeramente la identificación de las cianobacterias presentes con un microscopio óptico MOTIC, realizando capturas de imágenes por campo, y documentando los hallazgos realizados. Se efectuó recuento celular directo mediante una cámara de recuento hematológico Neubauer mejorada, y se expresó el recuento en número de células por mL x 10<sup>4</sup>. Se efectuaron observaciones en fresco, tanto de las muestras recogidas en frascos como aquellas tomadas con la red, y después de incubación durante siete días en condiciones de luz continua DAY LIGHT, PHILIPS 40 W (TLT 40 W/54 RS), a una intensidad de 58,59 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, a una temperatura de 20 ± 2 °C.

Para la identificación de cianobacterias, se tomaron, al menos, cinco alícuotas de cada muestra para observar características distintivas, utilizando varias claves dicotómicas y criterios taxonómicos, además de consultas *online* con las bases Infoseek, AlgaeBase, Algalterra, "Smithsonian museum",<sup>(1, 14, 15)</sup> entre otras.

## Procesamiento de la información y análisis estadísticos

Se realizan análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, de dos factores con una sola muestra por grupo, con el objetivo de comparar medias. Se realizan, además, análisis de correlación bivariada utilizando el coeficiente de Spearman con una prueba de significación de dos colas, para una probabilidad del 95 %, así como regresiones y ajustes logísticos, utilizando las bondades del SPSS 12.0, el Basic Statistics y del Origin 6.0, tanto para los análisis estadísticos, como para la elaboración de gráficos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Representación gráfica de la relación de la concentración de las microcistinas con la actividad enzimática de la fosfatasa

La curva de calibración resultante se presenta en la figura 1, donde se observa que a medida que aumenta la concentración de microcistinas, disminuye la actividad enzimática, variando esta desde 496,16  $UL^{-1}$  (0,037 5 ppb) hasta 35,75 (1,25 ppb), lo que corrobora que la intensidad o grado de inhibición de la fosfatasa pueda ser usada como medida de la concentración de las toxinas, específicamente como equivalente de toxicidad, referido a las microcistinas, cianotoxinas mayoritarias en embalses de agua dulce, <sup>(10)</sup> y específicamente en reservorios del oriente cubano <sup>(1)</sup>, mostrando además, la validez del kit de HELFA DIAGNÓSTICOS para el análisis de muestras ambientales.

Las hepatotoxinas (microcistinas y nodularinas), comunes en ecosistemas dulceacuícolas, causan daño hepático por inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A. Las microcistinas entran a través del intestino, probablemente vía sistémica del transporte de ácidos biliares. Desde la sangre, se enlazan al tejido hepático, donde forman complejos con proteínas serín-fosfatasas 1 y 2 A, resultando en la inhibición de estas importantes enzimas vitales para varios procesos como el crecimiento celular y supresión tumoral, por lo que se consideran potentes promotores de cáncer. La principal ruta de exposición del hombre a las cianobacterias tóxicas es el consumo de agua contaminada, y en menor proporción la exposición debida a la actividad recreacional en lagos y ríos.<sup>(16)</sup> Uno de los primeros síntomas por envenenamiento agudo con microcistinas, que se manifiesta entre los 15 a 30 min, es la elevación en la concentración de ácidos biliares, alteración de la actividad de enzimas como la fosfatasa alcalina, gamma-glutamyl-transferasa y la aspartato amino-

transferasa,<sup>(16)</sup> de aquí la relevancia del método propuesto.

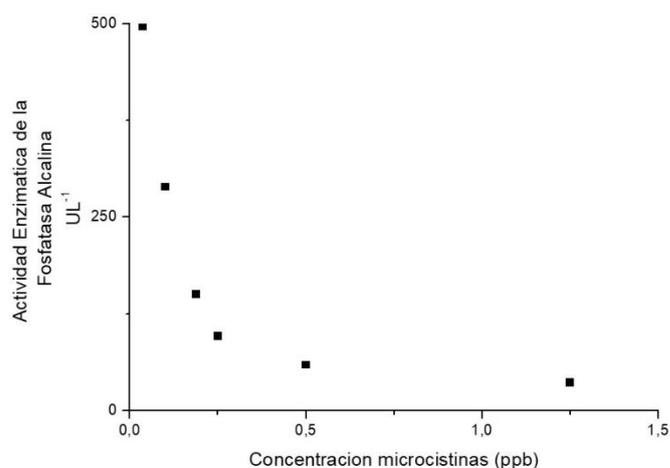


Fig. 1. Relación de la concentración de las microcistinas con la actividad enzimática de la fosfatasa.

### Modificaciones del ensayo de inhibición de la fosfatasa alcalina para muestras ambientales: agua

Es importante considerar, que el ensayo de la fosfatasa alcalina fue modificado durante esta investigación, considerando que este ha sido concebido para análisis clínico con suero humano. Las modificaciones realizadas se listan a continuación:

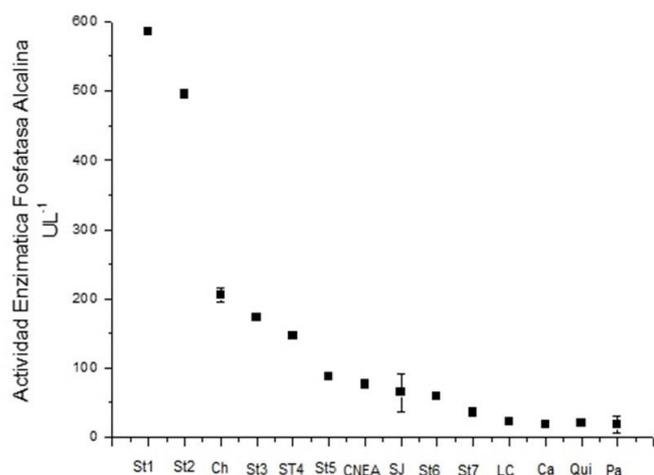
1. La muestra utilizada es agua (considerando un volumen de 2 mL) si bien el kit indica el uso de suero humano.
2. Se añade como fuente de enzimas (40  $\mu L$ ) de Suero Control Multiparamétrico para ensayos de Bioquímica (Spintrol H Normal), para garantizar la presencia de fosfatasa, que en el método original está presente en la propia muestra.
3. El control interno de la calidad se realiza con estándares de microcistina en concentraciones conocidas, y no con suero control para enzimas de origen humano.
4. Se utiliza agua MiliQ en vez de agua destilada, considerando que en esta última puede haber concentraciones detectables de microcistinas.

### Evaluación de la inhibición de la actividad enzimática en las muestras

La actividad enzimática constituye una de las determinaciones de mayor relevancia para la evaluación de métodos diagnósticos. En este caso, han sido consideradas muestras de aguas crudas, procedentes de lagunas, embalses o micropresas; y potable, que son las aguas sometidas a algún tratamiento para su potabilización en función de ponerlas a disposición del consumo humano, para

realizar el ensayo. A estas muestras se les realizaron, además, análisis complementarios. Los resultados del ensayo de la fosfatasa, considerando la actividad enzimática (AE) integrada de patrones y muestras se presentan en la figura 2.

Una de las primeras observaciones es que solo las muestras procedentes de Chalons, CNEA y San Juan, estuvieron dentro del rango ensayado con los patrones de microcistinas empleados (0,04-1,25 ppb), siendo la menos contaminada la del embalse Chalons, que es además, la única que está por debajo de los límites establecidos por la OMS (1 ppb).<sup>(16)</sup>



**Fig. 2.** Variación de la actividad enzimática (AE) de la fosfatasa alcalina en estándares de microcistinas (St1=0 ppb; St2=0,0375 ppb; St3=0,1ppb; St4=0,1875ppb; St5= 0,25ppb; St6=0,5ppb y St7=1,25 ppb) muestras de agua cruda (Ch: Chalons, SJ: San Juan, LC: La Campana, Pa: Paradas) y potable (CNEA, Ca: Caney, Qui: Quintero) de diferente procedencia.

Las aguas del embalse Parada resultaron ser las más contaminadas, además de las de la potabilizadora de Quintero, las aguas servidas del Caney y la micropresa La Campana, encontrándose estas por encima de 1,25 ppb. En el caso de Parada, estudios previos realizados en el Laboratorio de Ecotoxicología del CNEA durante los años 2008, 2009 y 2010, destacan su vulnerabilidad respecto a la presencia y diversidad de cianobacterias tóxicas, reportándose además alta densidad fitoplanctónica en las diferentes estaciones de muestreo.<sup>(1,9)</sup>

En las agua servidas del Caney y de la potabilizadora de Quintero, los resultados parecen indicar que los tratamientos a que se somete el agua para su potabilización, podrían estar produciendo lisis de las cianobacterias productoras de microcistinas, exponiéndose el contenido celular, lo que resulta en un aumento de los niveles de contaminación con microcistinas. Lo anterior ha sido reportado previamente por varios autores, al explicar la necesidad

de rediseñar los sistemas de tratamiento cuando hay presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas.<sup>(17)</sup> En el Caney, poblado que se sirve de La Campana, los niveles del agua servida están por encima que las del acuatorio. Esta situación puede verse agravada por la presencia de cisternas, o bien tanques y reservorios que reciben luz solar, donde las condiciones son propicias para el crecimiento de estos microorganismos, o bien por rotura mecánica de las células de cianobacterias y exposición de las toxinas. Las muestras de agua de La Campana, Quintero, Caney y Parada están por encima de los niveles límites establecidos hasta la fecha por la OMS ( $\geq 1$  ppb),<sup>(16)</sup> lo que significa que no es un agua segura que requiere tratamientos específicos para reducir los niveles de microcistinas. Esta evidencia permite alertar sobre un riesgo sanitario inminente debido la presencia de cianotoxinas, específicamente de microcistinas en todas las muestras de agua analizadas; situación que indica que hay una presencia estable de estas toxinas, por lo que resulta evidente la necesidad de establecer estrategias para la prevención y control de floraciones de cianobacterias, en función de preservar la salud humana, y de incluir en la normativa cubana el límite para cianotoxinas en agua potable, el cual debe ser  $\geq 1$  ppb.

Deben implementarse medidas que garanticen un manejo adecuado, no solo de la calidad del agua, sino del riesgo que representa la presencia de cianobacterias tóxicas en embalses de agua.<sup>(18)</sup> Es necesario, además, advertir a tomadores de decisión, así como alertar, sensibilizar y capacitar a las autoridades sanitarias e involucradas en la gestión del agua potable, sobre este tipo especial de contaminación emergente, para implementar controles con el uso de métodos diagnósticos, que permitan confirmar el riesgo; considerando, además, la búsqueda de alternativas tecnológicas efectivas, ya que en presencia de cianobacterias tóxicas, hay que rediseñar los sistemas de tratamiento del agua.<sup>(19)</sup>

Si se analizan los resultados en función del porcentaje de inhibición de la fosfatasa, se hace evidente que en todos los casos el por ciento de inhibición es mayor del 65, llegando a ser más del 95 % en las muestras más afectadas, lo que indica que el método utilizado es sensible y válido para este tipo de análisis.

### Resultados de análisis complementarios

Para conocer las características físicoquímicas de las muestras de aguas, se determinaron los valores medios para los diferentes parámetros estudiados (tabla 1). Los resultados obtenidos fueron comparados con la NC vigente para agua potable, y con la NC para Higiene

Comunal. Fuentes de abastecimiento de agua.<sup>(12,13)</sup> Respecto a los valores de oxígeno disuelto (OD), el control de agua destilada y las muestras de Chalons, Quintero y Parada, son las que superan límite mínimo 4 mgL<sup>-1</sup>, clasificándose el resto de calidad mala.<sup>(13)</sup> Según esta norma, dichas aguas requieren tratamiento convencional para ser empleadas. Los bajos valores de

OD pueden deberse, fundamentalmente, a la presencia de contaminación orgánica, y al estancamiento en los reservorios destinados al abasto de agua. Las peores condiciones respecto a este parámetro las tiene el agua servida del CNEA, lo que puede deberse al estado del agua-sedimento en el reservorio de almacenamiento.

**Tabla 1.** Resultados de los análisis físicoquímicos de las muestras estudiadas

Muestras (Designación)	Oxígeno disuelto (mgL <sup>-1</sup> )	Conductividad a 25°C (µScm <sup>-1</sup> )	pH	Salinidad (ups)	STD (mgL <sup>-1</sup> )	Clorofila <i>a</i> (µgL <sup>-1</sup> )	Ciano pigmentos (µgL <sup>-1</sup> )	Turbidez UNT
Agua destilada	13,23±0,01	25,21±1,00	9,75±0,02	0,06±0,00	47,66±0,50	0,22±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00
Chalons	6,23±0,14	459,07±1,73	8,18±0,01	0,22±0,00	229,38±1,15	43,81±0,15	3,45±0,02	51,60±0,64
CNEA	0,68±0,00	371,01±1,73	7,25±0,01	0,18±3,39	185,54±0,7	3,46±0,55	0,07±0,05	157,91±20,85
Río San Juan	3,37±0,08	716,00±2,64	7,20±0,01	0,35±6,79	357,67±1,15	0,43±0,20	0,06±0,01	134,46±12,95
La Campana	3,41±0,00	372,09±0,00	8,46±0,00	0,18±0,94	186,61±1,69	10,4±0,00	0,76±0,06	125,00±4,96
Caney	3,01±0,00	31,019±0,00	7,28±0,02	0,15±0,61	159,70±0,94	88,41±1,74	0,13±0,00	46,91±0,00
Quintero	4,39±0,01	279,35±0,56	7,41±0,10	0,13±0,05	139,63±0,23	3,95±0,65	0,00±0,00	188,09±19,08
Parada	4,04±0,04	697,00±3,46	7,61±0,00	0,34±0,00	348,00±1,72	7,70±0,51	9,06±0,15	37,83±2,08

Leyenda:

STD: Sólidos Totales disueltos; UNT: Unidades nefelométricas de turbidez.

Chalons presenta los mejores valores de OD (6,23 ± 0,14 mgL<sup>-1</sup>), después del control de agua destilada. Es notorio, que es la muestra con menores concentraciones de microcistinas.

Respecto a la conductividad, los mayores valores se detectan en el punto del río San Juan 716,00 ± 2,64 µScm<sup>-2</sup>. Estas aguas se caracterizan por cierta salobridad al gusto, debido a la presencia de sales. Parada también presenta altos valores 697,00 ± 3,46 µScm<sup>-2</sup>. Los menores valores se presentan en la muestra de aguas servidas del Caney y de la potabilizadora de Quintero, lo que se debe, fundamentalmente, a los procesos de potabilización.

La conductividad, no se considera entre los parámetros normados para agua potable. Estos valores están en el rango de los normales en aguas dulces, comprendidos de 100 a 2 000 µScm<sup>-2</sup>, excepto los del agua destilada y/o tratada o desalinizada, lo que se justifica por el fundamento del tratamiento que recibe.<sup>(20)</sup>

Los valores de pH se pueden considerar dentro de los límites máximos establecidos por la NC 827-2012 y la NC 1021:2014<sup>(12,13)</sup> (6,5 - 8,5 unidades), siendo ligeramente alcalinas en Chalons y La Campana. Los valores de salinidad son prácticamente iguales (p ≤ 0,05) en todas las muestras, excepto para San Juan y Parada, con valores máximos (≥ 0,3), lo que coincide con los resultados obtenidos para la conductividad.

La turbidez se ve afectada en todas las muestras de agua tratadas. En general los valores no son aceptables,

ya que exceden el límite máximo admisible (LMA) por la NC 827: 2012<sup>(12,13)</sup> equivalente a 5 UNT<sup>(12)</sup> y 10 UNT. En el caso de las muestras procedentes de los reservorios, según NC 1021:2014,<sup>(13)</sup> resultando más afectadas las aguas de La Campana. Las partículas insolubles responsables de esta turbidez pueden ser aportadas tanto por procesos de arrastre, como de remoción de tierra, presencia de células en suspensión y en general, sólidos totales disueltos (STD). En las aguas servidas puede haber contaminación proveniente de las tuberías o contaminación por roturas. Los valores máximos de este parámetro se registran en la potabilizadora Quintero (188,09 ± 19,08 UNT), seguido por aguas servidas del CNEA, San Juan y La Campana.

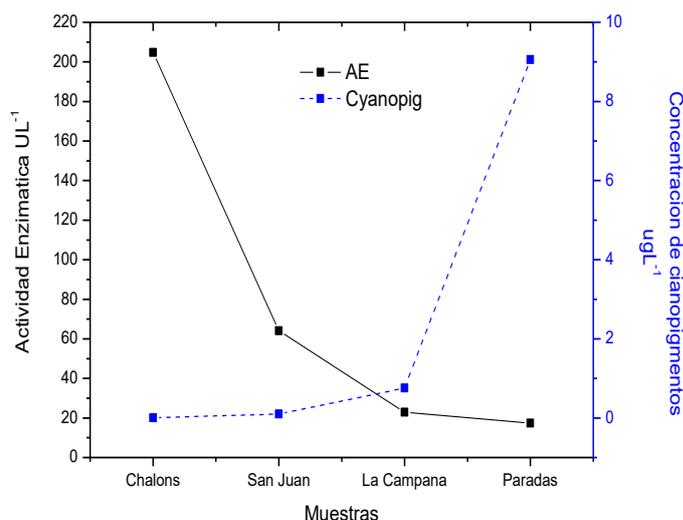
Todos los contaminantes presentes en el agua, a excepción de los gases disueltos, contribuyen a la "carga de sólidos". Los sólidos pueden ser orgánicos y/o inorgánicos, y pueden provenir de diferentes actividades domésticas, comerciales e industriales. En este estudio, los STD se encuentran en valores aceptables según la NC 1021:2014 (1 000 mgL<sup>-1</sup>),<sup>(13)</sup> lo que indica, en gran medida, que prevalecen en estas muestras de agua los compuestos orgánicos. Las mayores concentraciones de STD se registran en San Juan (357,67 ± 1,15 mgL<sup>-1</sup>), seguido por Parada, Chalón y La Campana, siendo menores en la planta potabilizadora de Quintero.

Por otra parte, los valores de clorofila son elevados en Caney y Chalons ( $88,41 \pm 1,74$  y  $43,81 \pm 0,15 \mu\text{gL}^{-1}$ , respectivamente). Resulta contradictorio que un agua servida del Caney tenga valores significativamente mayores de clorofila ( $p \leq 0,05$ ). Este hecho corrobora que: o bien los filtros no garantizan la eliminación total de las células en suspensión, o las condiciones de almacenamiento contribuyen al crecimiento de microorganismos fotosintetizadores. Las muestras de La Campana y Parada también presentan altos valores de clorofila ( $10,4 \pm 0,00$  y  $7,70 \pm 0,51 \mu\text{gL}^{-1}$ , respectivamente); aunque significativamente menores que los anteriores ( $p \leq 0,05$ ).

Los cianopigmentos, por su parte, son significativamente mayores en Parada  $9,06 \pm 0,15 \mu\text{gL}^{-1}$  ( $p \leq 0,05$ ), respecto al resto de las muestras, lo que indica que estas aguas la presencia de cianobacterias es mayor, y puede relacionarse con la presencia de cianotoxinas.

Al correlacionar los valores de cianopigmentos, con los obtenidos en el ensayo de inhibición de la fosfatasa alcalina (figura 3), los resultados muestran una correlación inversa, de lo que se infiere la sensibilidad de esta enzima a las cianotoxinas y la utilidad de la concentración de cianopigmentos para el seguimiento de eventos de riesgos por presencia de cianotoxinas, específicamente microcistinas. De esta gráfica se excluyen las muestras sometidas a potabilización, debido a que reciben tratamiento y, en la mayoría de los casos la presencia de cianopigmentos es baja o nula,

si bien puede haber presencia de cianotoxinas, ya que se eliminan las células, no así las toxinas.



**Fig. 3.** Gráfico de correlación entre la actividad enzimática de la fosfatasa y la concentración de cianopigmentos ( $r=-1$ , Spearman) en muestras de agua cruda.

En el caso del Caney, esta muestra presenta altos valores de clorofila y bajos de cianopigmentos ( $88,41 \pm 1,74/ 0,13 \pm 0,00 \mu\text{gL}^{-1}$ ). En el CNEA hay valores medios de clorofila y bajos de cianopigmentos ( $3,46 \pm 0,557/ 0,07 \pm 0,05 \mu\text{gL}^{-1}$ ), lo que indica que existen problemas de tratamiento o almacenamiento; mientras que Quintero es la única que no presenta cianopigmentos, y los valores de clorofila son medios ( $3,95 \pm 0,65/ 0,00 \pm 0,00 \mu\text{gL}^{-1}$ ), explicación que será complementada con los resultados de los análisis al microscopio óptico (tabla 2).

Tabla 2. Especies de cianobacterias presentes en las muestras de agua estudiadas.

	La Campana	Chalons	Parada	San Juan	CNEA	Caney	Quintero
<i>Anabaena sp.</i>	X						
<i>Aphanizomenom flos-aquae</i>	X*					X*	
<i>Aphanothece minutissima</i>						X	
<i>Chroococcus sp.</i>	X	X	X				
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>			X**				
<i>Merismopedia glauca</i>	X	X					
<i>Microcystis aeruginosa</i>	X*			X	X	X	X
<i>Microcystis sp.</i>				X	X		
<i>Microcystis viridis</i>						X	
<i>Oscillatoria limosa</i>	X						
<i>Oscillatoria chalybea</i>	X						
<i>Planktothrix sp.</i>	X						
<i>Synechocystis aquatilis</i>	X*	X	X	X	X	X*	X

x: indica presencia \*: presencia de floraciones. \*\*: floración unialgal a muy altas concentraciones. Se resaltan en negritas las cianobacterias tóxicas.

Resulta evidente, que para las muestras de los acuatorios (aguas crudas), la inhibición de la fosfatasa tiene relación con la presencia de cianobacterias tóxicas y sus cianotoxinas; mientras que para las aguas

tratadas tiene más sentido la determinación de las cianotoxinas directamente, si bien el ensayo de la fosfatasa advierte sobre el riesgo, por lo que resulta funcional para todos los tipos de agua muestreadas.

Estos resultados se verifican, finalmente, con la identificación de especies al microscopio óptico; ensayo complementario que permite confirmar los resultados obtenidos.

**Confirmación de presencia de cianobacterias tóxicas en las muestras estudiadas**

Los resultados de la identificación de especies de cianobacterias tóxicas permiten corroborar la utilidad del método diagnóstico desarrollado. Las aguas servidas, excepto Quintero presentan especies de microalgas y/o cianobacterias, como se aprecia en la tabla 2. En la muestra de Quintero se identifican dos cianobacterias potencialmente tóxicas: *Synechocystis aquatilis* y *Microcystis aeruginosa*, pero no se detectan proliferaciones de estas, si bien existen abundantes células de *Chlorella vulgaris* y *Desmodesmus communis*, que son microalgas clorofíceas de mayor tamaño, cuya presencia en las fuentes primarias de abasto es común. Esta muestra de agua presenta altos niveles de cianotoxinas (1,306 2 ppb), específicamente de microcistinas, relacionado con las dos especies identificadas (figura 2).

En el caso de Parada destaca la presencia de una floración de *Cylindrospermopsis raciborskii*, con alta densidad celular ( $\geq 50\ 000\ \text{cél mL}^{-1}$ ). Esta cianobacteria se asocia a la producción de microcistinas y cilindrospermopsinas <sup>(21)</sup>, de aquí los altos niveles de cianopigmentos y el alto porcentaje de inhibición de la fosfatasa alcalina.

En el caso de las aguas servidas del Caney, se destaca la presencia de abundantes amebas y alta concentración de las cianobacterias *Synechocystis aquatilis* y *Aphanizomenum flos-aquae*, y de la microalga clorofita *Ankistrodesmus* sp. Se identifican, además, varias especies de *Microcystis*. Estas aguas provienen de La Campana, donde se identifica un bloom mixto con elevadas concentraciones de *A. flos-aquae*, por lo que al parecer los mecanismos de potabilización no garantizan la eliminación de las cianobacterias tóxicas y sus toxinas.

En las muestras de Chalons, San Juan y CNEA, hay presencia de cianobacterias, pero sus concentraciones son menores de  $3\ 000\ \text{cél mL}^{-1}$ .

En todas las muestras, excepto en el agua destilada, hay cianobacterias tóxicas. Sin embargo, en Chalons la cianobacteria potencialmente tóxica *Synechocystis aquatilis*, aparece en muy bajas concentraciones. Estos resultados confirman los del ensayo de la fosfatasa alcalina, donde las aguas procedentes de Chalons son las que muestran la mínima inhibición. Esta posee, además, varias especies de clorofitas (*Chlorella*

*vulgaris*, *Desmodesmus communis*, *Cosmarium* sp., *Dictyosphaerium pulchellum*), lo que justifica los valores de clorofila obtenidos. Las especies de *Microcystis* fueron identificadas en prácticamente todas las muestras, lo que coincide con reportes previos<sup>(7)</sup>, así como *Synechocystis aquatilis*.

En la tabla 3 se presenta la relación entre las cianotoxinas y los géneros de cianobacterias productores por excelencia, entre las que destacan *Anabaena*, *Microcystis*, y *Oscillatoria*, detectadas todas en La Campana.

*Microcystis* spp. aparece en cuatro de las muestras analizadas; *Anabaena* solo en La Campana, al igual que las especies de *Oscillatoria*. Sin embargo, se conoce la toxicidad de otras especies, productoras no solo de microcistinas, sino de cilindrospermopsina, como *C. raciborskii*, identificada en Parada en altas concentraciones.

Es importante destacar, que el género *Anabaena*, está relacionado con la producción de cuatro cianotoxinas, de lo que se infiere que su potencial tóxico no solo se debe a la microcistina, ya que fue la cianotoxina usada como patrón, además de ser mayoritaria en muestras tropicales.

**Tabla 3** Clasificación de las cianotoxinas por sistema u órgano blanco. Fuente: OMS, <sup>(22)</sup>

Toxinas	Sistema u órgano blanco	Géneros productores
Microcistina	Hepatotoxina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenom</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Nostoc</i>
Nodularina	Hepatotoxina	<i>Nodularia</i>
Anatoxina	Neurotoxina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenom</i>
Saxitoxina	Neurotoxina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenom</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>
Cilindrospermopsina	Citotoxina general	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenom</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>
Aplisiatoxina	Dermatotoxina	<i>Lyngbya</i>
Lyngbyatoxina	Posible gastro intestinal	<i>Lyngbya</i>

Fuente: OMS<sup>(22)</sup>

El conocimiento sobre la presencia de cianobacterias y cianotoxinas ha estado fuertemente limitado, por la falta de métodos adecuados para su detección y vigilancia. En muchos casos ha sido evidente la incapacidad de prevenir y hacer frente a una intoxicación masiva por cianobacterias tóxicas, debido, fundamentalmente, al desconocimiento del fenómeno por las instituciones involucradas y a la falta de investigaciones rigurosas, que demuestren la existencia de cianobacterias toxigénicas, y presenten los niveles de cianotoxinas.<sup>(7)</sup>

A nivel mundial, existen documentos normativos que regulan los aspectos relacionados con la protección y uso de los recursos hídricos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde su fundación en 1948, se ha ocupado de la gestión de los recursos hídricos, publicando varios documentos relativos a la seguridad del medio acuático y su importancia para la salud, dentro de los que pueden encontrarse: "Directrices para la calidad del agua potable", y las "Directrices para el uso seguro de aguas residuales y excretadas en la agricultura y la acuicultura".<sup>(18,23)</sup> Estos documentos son destinados a proporcionar una base para la elaboración de normas adaptadas a cada contexto, para ayudar al proceso de toma de decisiones y al desarrollo de estrategias para el control de los riesgos para la salud en función del cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, en específico el relacionado con la sanidad, la calidad del agua, el consumo responsable y el bienestar humano.

Desde la primera edición de sus guías, la OMS ha publicado información sobre criterios de salud, que describen los métodos utilizados en la obtención de valores de referencia y la presentación de reseñas críticas, así como evaluaciones de los efectos de las sustancias o contaminantes examinados en el agua potable sobre la salud humana,<sup>(18)</sup> incluyendo las cianotoxinas. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos de la OMS, existen países, que aún no han implementado a escala nacional la detección de alguna cianotoxina de forma obligatoria para definir la calidad al menos del agua potable, si bien se reconoce su impacto en alimentos; por lo que cualquier esfuerzo en este sentido es relevante, unido ello a los esfuerzos necesarios para llenar estos vacíos del conocimiento científico y legal, para contribuir al desarrollo presente y futuro.

Los hallazgos de esta investigación demuestran, que la presencia de cianobacterias tóxicas y sus cianotoxinas representan un riesgo en ecosistemas acuáticos tropicales insulares, en específico de Santiago de Cuba, que repercuten en la calidad del agua potable servida, por lo que se hace necesario desarrollar mecanismos para su detección y estrategias para minimizar su impacto sobre la salud humana, incluyendo la introducción de tecnologías que permitan minimizar este riesgo. Los sistemas y métodos de tratamiento deben ser revisados y adaptados a la situación real que presentan los acuatorios que abastecen agua, la que debe ser segura.

Esta investigación demuestra la utilidad del ensayo de inhibición de la fosfatasa alcalina HELFA DIAGNÓSTICOS, de producción nacional, para

muestras de agua, y recomienda su uso con la metodología presentada para el seguimiento del riesgo por presencia de cianobacterias tóxicas, con las modificaciones propuestas. Se recomienda, además, que se asuma como valor límite para Cuba el que establece la OMS ( $1 \mu\text{gL}^{-1}$ ).

## CONCLUSIONES

El ensayo de la fosfatasa alcalina con las modificaciones propuestas permite evaluar el riesgo por contaminación con cianotoxinas en aguas crudas y para consumo humano, con alta sensibilidad a la concentración de microcistinas. Los resultados constituyen una evidencia de la presencia de microcistinas en aguas servidas, y la necesaria implementación de análisis para su seguimiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gomez Luna, L., et al., *Cianobacterias: un riesgo emergente en embalses de agua de Santiago de Cuba*, ed. E. Universitaria. 2011, Santiago de Cuba: Universidad de Oriente. 76 ISBN: 978-959-207-418-7.
2. Huisman, J., et al., *Cyanobacterial blooms*. Nature Reviews Microbiology, 2018. **16**(8): p. 471-483 ISSN: 1740-1534.
3. Lu, T., et al., *Pollutant toxicology with respect to microalgae and cyanobacteria*. J Journal of Environmental Sciences, 2021. **99**: p. 175-186 ISSN: 1001-0742.
4. Raffoul, M., et al., *Assessing the potential health risk of cyanobacteria and cyanotoxins in Lake Naivasha, Kenya*. J Hydrobiologia, 2020. **847**(4): p. 1041-1056 ISSN: 1573-5117.
5. Svirčev, Z., et al., *Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings*. Archives of Toxicology, 2019. **93**(9): p. 2429-2481 ISSN: 1432-0738.
6. Massey, I.Y., et al., *A mini-review on detection methods of microcystins*. Toxins, 2020. **12**(10): p. 641 ISSN: ISSN 2072-6651.
7. Gomez, L.M., B. Álamo, and J.C. Rodríguez Tito, *Riesgo de contaminación con cianobacterias en tres embalses de agua de Santiago de Cuba*. Medisan (online), 2010. **14**(2) ISSN: 1029-3019.
8. Rodríguez Tito, J.C., et al., *Evaluación química y microbiológica de los embalses Chalons y Parada de Santiago de Cuba*. Rev. Cubana Quím., 2017. **29**(3): p. 302-307 ISSN: 2224-5421.
9. Rodríguez Tito, J.C. and L.M. Gómez L., *Estado trófico de 24 embalses de agua en el oriente de*

- Cuba. Revista Cubana de Química., 2020. **32**(1): p. 136-153 ISSN: 2224-5421.
10. Tito, J.C.R., et al., *First Report on Microcystin-LR Occurrence in Water Reservoirs of Eastern Cuba, and Environmental Trigger Factors*. Toxins, 2022.**14**(3): p. 209 ISSN: 2072-6651.
  11. Bessey, O.A., O.H. Lowry, and M.J. Brock, *A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum*. Journal of Biological Chemistry, 1946. **164**: p. 321-9.
  12. Oficina Nacional de Normalización, *Norma Cubana. Agua Potable-Requisitos sanitarios*, in NC:8272012, Oficina Nacional de Normalización: La Habana, Cuba.
  13. Oficina Nacional de Normalización, *Norma Cubana Higiene comunal — fuentes de abastecimiento de agua — calidad y protección sanitaria* in NC:10212014, Oficina Nacional de Normalización: La Habana, Cuba.
  14. Guiry, M. and G. Guiry, *AlgaeBase. World-wide electronic publication*. Galway: National University of Ireland, 2014. <http://www.algaebase.org>, revisado diciembre 2023
  15. Guiry, M.D. and G.M. Guiry, *AlgaeBase. Synechocystis Sauvageau, 1892: cxv*, in *World-wide electronic publication* 2014, National University of Ireland: Galway. <http://www.algaebase.org>, visitado diciembre 2023
  16. WHO, *Guidelines for Drinking-water Quality*, 2017, 4<sup>th</sup> Edition, p. 1-631. ISBN 97 8-92-4-155001-7.
  17. Giani, A., et al., *Comparing key drivers of cyanobacteria biomass in temperate and tropical systems*. J Harmful Algae, 2020. **97**: p. 101859 ISSN: 1568-9883.
  18. Chorus, I., *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Federal Environment Agency, Germany, 2012. 63: p 1-147.
  19. Sudhakaran, S., S. Lattemann, and G.L. Amy, *Appropriate drinking water treatment processes for organic micropollutants removal based on experimental and model studies—a multi-criteria analysis study*. Science of the Total Environment, 2013. **442**: p. 478-488 ISSN: 0048-9697.
  20. Barros, M.U.G., et al., *Environmental factors associated with toxic cyanobacterial blooms across 20 drinking water reservoirs in a semi-arid region of Brazil*. Harmful Algae, 2019(86): p. 128–137 ISSN: 1878-1470.
  21. Brito, M.T.S., P.J. Duarte-Neto, and R.J.R. Molica, *Cylindrospermopsis raciborskii and Microcystis aeruginosa competing under different conditions of pH and inorganic carbon*. Hydrobiologia, 2018(815): p. 253–266 ISSN: 0018-8158.
  22. Gómez, S.C. and A.Q. de Corral, *Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas*. 2011: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Secretaria General Técnica, Centro de Publicaciones, España, 1ra Edición, ISBN: 978-84-491-1072-6.
  23. Chorus, I. and J. Bartram, eds. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. ed. F.F. Spon. Vol. 30. 1999, WHO: London and New York. 211-234 ISBN: 0-419-23930-8.

## DECLARACIÓN CONFLICTO DE INTERESES

Los autores expresan que no existe conflicto de intereses.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

### Liliana María Gomez Luna

Realizó la concepción general de la investigación, la definición de los métodos y técnicas para análisis. Participó en la obtención y procesamiento bibliométrico. Participó en la parte experimental de la investigación. Participó en los muestreos. Diseñó el plan de muestreo y participó en la selección de los sitios. Concibió y estructuró el artículo científico. Participó en el análisis de la data experimental, la

redacción del artículo, discusión de los resultados y la revisión final. Realizó el resumen graficado.

### José Carlos Rodríguez-Tito

Participó en la definición de los métodos y técnicas para análisis. Participó en el diseño del plan de muestreo, en el análisis de la data experimental, en la redacción del artículo, discusión de los resultados y su revisión final.

### Narvis Cedeño-Soularit

Desarrolló la parte experimental de la investigación. Participó en la discusión de los resultados. Participó en la revisión final del artículo.

### Yadenis Ortega-Díaz

Participó en la parte experimental de la investigación y en el diseño del plan de muestreo. Colaboró en la revisión final del artículo.