



INFORME CIENTÍFICO-TÉCNICO

NUEVOS RIESGOS PARA EL AGUA POTABLE:

MICROCISTINA



Mejora de la calidad del agua de consumo por eliminación de toxinas.

Presentado por:

OX-CTA S.L.
Yolanda Vergara
Armando Moya

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza
María Luisa Peleato Sánchez
Emma Sevilla
Sara López

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. El agua como recurso	4
1.2. El problema de las algas: Efectos indeseados de las algas y las cianobacterias en aguas dulces.....	5
1.3. La cianotoxina microcistina.....	7
2. OBJETIVO GENERAL	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4. EFECTO DE BIOCIDAS SOBRE FITOPLANCTON	17
4.1. INTRODUCCIÓN	17
4.2. EFECTO SOBRE ANABAENA PCC 7120.....	17
4.2.1. Características de <i>Anabaena</i> PCC 7120.....	17
4.2.2. Efecto de OX-VIRIN sobre <i>Anabaena</i> PCC 7120	17
4.2.3. Efecto de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN sobre <i>Anabaena</i> PCC 7120	21
4.2.4. Efecto de OX-AGUA sobre <i>Anabaena</i> PCC 7120.....	25
4.3. EFECTOS DE SOBRE <i>MICROCYSTIS</i> PCC 7005.....	29
4.3.1. Características de <i>Microcystis</i> PCC 7005	29
4.3.2. Efecto de OX-VIRIN sobre <i>Microcystis</i> PCC 7005.....	29
4.3.3. Efecto de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN sobre <i>Microcystis</i> PCC	33
4.3.4. Efecto de OX-AGUA sobre <i>Microcystis</i> PCC 7005	37
4.4. EFECTOS SOBRE <i>CHLORELLA FUSCA</i>	41
4.4.1. Características de <i>Chlorella fusca</i>	41
4.4.2. Efecto de OX-VIRIN sobre <i>Chlorella fusca</i>	41
4.4.3. Efecto de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN sobre <i>Chlorella Fusca</i>	45
4.4.4. Efecto de OX-AGUA sobre <i>Chlorella Fusca</i>	49
4.5. FOTOGRAFÍAS.....	54
4.5.1. Efecto de OX-VIRIN sobre <i>Anabaena</i> PCC 7120	54
4.5.2. Efecto de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN sobre <i>Microcystis</i> PCC 7005	58
4.5.3. Efecto de OX-AGUA sobre <i>Chlorella fusca</i>	61
5. EFECTO DE OX-VIRIN SOBRE MICROCISTINA.....	64
5.1. INTRODUCCIÓN	64
5.2. RESULTADOS.....	64
5.2.1. Efecto de OX-VIRIN sobre albúmina bovina	64
5.2.2. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR	65
5.2.2.1. Determinación de microcistina por HPLC.....	65
5.2.2.1.1. Recta de calibrado	65
5.2.2.1.2. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR tras 1 hora de tratamiento	66
5.2.2.1.3. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR en 24 horas de tratamiento	66
5.2.2.1.4. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR en 48 horas de tratamiento	67
5.2.2.1.5. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR en 72 horas de tratamiento	67
5.2.2.2. Determinación de microcistina por espectrometría de masas.....	68
5.2.2.3. Determinación de microcistina por ensayo de inhibición de protein-fosfatasa.....	70
5.2.2.3.1. Ensayo de protein-fosfatasa con OX-VIRIN neutralizado	70
5.2.2.3.2. Ensayo de inhibición de protein-fosfatasa con microcistina tratada con OX-VIRIN	71
5.2.2.3.3. Estudio de la dosis de 3% de OX-VIRIN	72
5.2.3. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina de cultivos de cianobacterias	73
5.2.3.1. Determinación de microcistina	73
5.2.3.2. Determinación de estrés oxidativo	74

6. ESTUDIO DE LA EFICACIA FRENTE A MICROCISTINA DE OX-VIRIN POTENCIADO CON DIFERENTES SALES DE HIERRO.....	75
6.1. Estudio de la eficacia de diversas concentraciones de OX-VIRIN con cloruro ferroso.....	75
6.2. Estudio de la eficacia de 1% OX-VIRIN con diversas sales de hierro	77
7. REALIZACIÓN DE ENSAYOS DE DESTRUCCIÓN DE MICROCISTINAS UTILIZANDO OX-VIRIN ENRIQUECIDO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	82
8. ESTUDIO DE LA EFICACIA COMO AGENTE ELIMINADOR DE MICROCISTINAS DE OX-AGUA 2ª GENERACIÓN.....	85
9. ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA COMO POTENCIADOR DE LA ACCIÓN OXIDANTE DE OX-VIRIN Y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN	87
9.1. Efecto del peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta sobre ovoalbúmina.....	87
9.1.1. Visualización de las muestras por SDS-PAGE	87
9.1.2. Medidas espectrofotométricas de las muestras	
9.2. Efecto de peróxido de hidrógeno y de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN potenciados con UV sobre ovoalbúmina, <i>Anabaena sp.</i> y <i>Microcystis sp.</i>	90
9.2.1. SDS-PAGE de las muestras incubadas bajo luz UV	92
9.2.2. Lectura de las placas a 450 nm y 630 nm.....	94
10. ENSAYOS CON SISTEMAS DE ACTIVACIÓN FÍSICOS	100
10.1. Estudio de la eficacia frente a microcistina de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN potenciado con ultravioleta y TiO ₂	100
10.1.1. Microcistina LR= 20 ng/ml	100
10.1.2. Microcistina LR= 200 ng/ml.....	103
10.1.3. Microcistina LR= 2000 ng/ml.....	105
10.2. Estudio de la eficacia frente a microcistina de OX-VIRIN potenciado con ultravioleta y TiO ₂	106
10.2.1. Microcistina LR= 20 ng/ml	107
10.2.2. Microcistina LR= 200 ng/ml	109
10.2.3. Microcistina LR= 2000 ng/ml	111
10.3. Estudio de la eficacia frente a <i>Microcystis sp.</i> PCC 7806 de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN potenciado con ultravioleta y TiO ₂	113
10.4. Estudio de la eficacia frente a <i>Microcystis sp.</i> PCC 7806 de OX-VIRIN potenciado con ultravioleta y TiO ₂	116
11. CONCLUSIONES.....	117

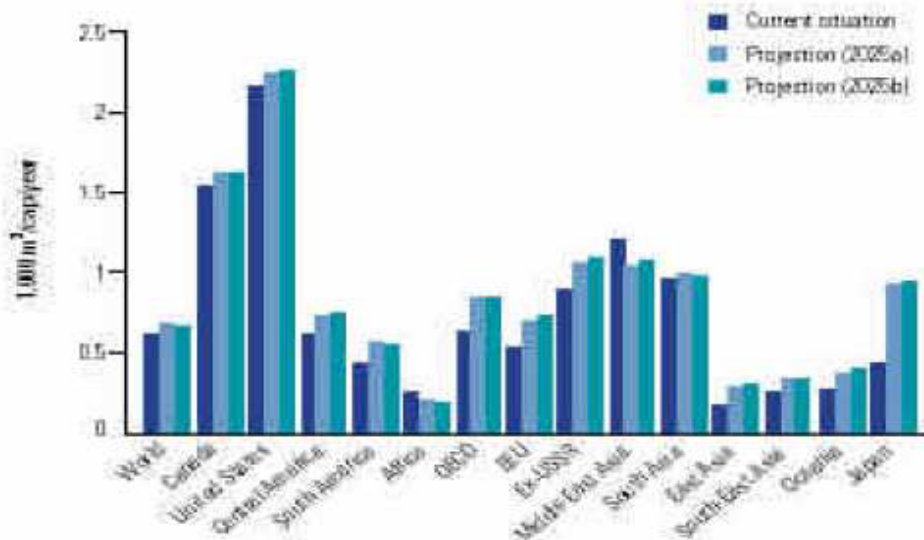
1. INTRODUCCIÓN

1.1. El agua como recurso

El siglo XXI es el siglo en el que el mayor problema se centrará en la calidad y la gestión del agua (UNESCO, 2003). La gestión del agua ha evolucionado favorablemente, pero en torno a 6.000 personas, la mayoría niños menores de cinco años, mueren diariamente por enfermedades relacionadas con el agua. El agua es, en este siglo, una preocupación de primera magnitud. En esta introducción se intenta dar una visión global sobre la importancia de los recursos hídricos en el mundo; Se muestra desde su disponibilidad y variación del recurso por regiones hasta la relación con los habitantes o el abastecimiento de la población, pasando por enfermedades y desastres naturales provocados por el agua.

Todos dependemos del mismo elemento vital: el agua. Su naturaleza es cambiante, pudiendo encontrarla en estado líquido, sólido o gaseoso, en la atmósfera, en la superficie de la tierra o en el subsuelo, dando forma a una gran cantidad de ecosistemas... Para los habitantes del planeta, su diversidad también significa grandes disparidades en riqueza y desarrollo. Según degradamos la calidad del agua y modificamos los ecosistemas naturales de los que dependen muchas culturas, estamos amenazando nuestra propia supervivencia.

En el siguiente gráfico se indica la demanda de agua dulce en diferentes regiones del mundo en la situación actual y en dos proyecciones alternativas:



En algunas partes del mundo la conexión entre agua, higiene y salud es un hecho indiscutible, pero para la mayoría de la población el acceso a agua limpia y adecuada es una lucha diaria. Uno de los mayores problemas del mundo en el que vivimos es que el 90% de las muertes relacionadas con el agua se deben a la contaminación y no a la escasez. Cada día enfermedades diarreicas causan unas muertes estimadas en más de 5.400 personas, la mayor parte niños menores de cinco años.

En la segunda mitad del pasado siglo la demanda de agua potable se ha incrementado enormemente, debido sobre todo al crecimiento de la población, aunque la disponibilidad de ésta es cada vez menor a causa de la contaminación. Todas estas situaciones han provocado el refuerzo de las técnicas de tratamiento del agua, así como la investigación centrada sobre todos los posibles efectos secundarios causados por la desinfección del agua destinada a consumo humano.

1.2. El problema de las algas: Efectos indeseados de las algas y las cianobacterias en aguas dulces

El agua es un bien común y es un recurso renovable, aunque limitado. Por esta razón, estamos obligados a controlar, además de la disponibilidad, la conservación de los reservorios, controlando la calidad del agua que llega a ellos. En épocas de escasez de agua como la que nos encontramos, hay que rentabilizar los recursos de agua con los que contamos.

De entre todos los problemas se considera de trascendental importancia, ya que puede traer implicaciones importantes, el control de la calidad del agua de boca. Los embalses o reservorios de agua con alto contenido en nutrientes, utilizados como suministro de agua para consumo humano o animal, son ambientes de riesgo para que se den factores ambientales propicios para que cianobacterias presenten sus efectos indeseados:

Las algas producen dos tipos de problemas: proliferaciones indeseadas, con consecuencias de muy diversa índole, obstrucción de conducciones, colapso vital por agotamiento de oxígeno¹, proliferaciones de bacterias que usan como sustrato la biomasa generada... Estos "blooms" o proliferaciones indeseadas son actualmente muy frecuentes debido al creciente enriquecimiento en nutrientes de todos nuestros acuíferos, que se constituyen en un medio de cultivo muy apropiado para organismos de tipo fotoautótrofo, con unos requerimientos nutricionales muy bajos. En el caso de las cianobacterias, algunas de ellas diazotrofas, los mecanismos de supervivencia están especialmente activos, con sistemas de adquisición de hierro (sideróforos) muy eficaces.

El segundo problema que puede originar el fitoplancton es la presencia de toxinas. En este caso la producción de toxinas está originada principalmente por cianobacterias. Hay dos tipos de cianotoxinas: neurotoxinas (alcaloides) y hepatotoxinas (péptidos). Las cianotoxinas más frecuentes son las producidas por el género *Microcystis*, las microcistinas. Los factores ambientales en los que una cianobacteria pasa a expresar toxinas es uno de los aspectos más estudiados por los especialistas, pero dista mucho de estar claro. Parece ser que altas temperaturas, alta luminosidad, poco viento (es decir, aguas tranquilas y no aireadas), además de disponibilidad de nitrógeno y fósforo, podrían ser los factores implicados en que una determinada especie se transforme en tóxica, dando lugar a grandes problemas cuando estas proliferaciones y liberaciones de toxinas se producen en agua para uso urbano o ganadero. Este es un problema creciente en los países del área mediterránea, y en el caso del ganado hay numerosas referencias de muertes por toxicidad procedente de cianobacterias. En el caso de humanos, fue tristemente famoso un caso de fallecimiento de numerosos pacientes sometidos a diálisis en Brasil, y se sospecha que algo parecido ocurrió recientemente en nuestro país. Es de destacar que en nuestro entorno se dio esta situación en La Estanca de Alcañiz (Teruel), que aprovisiona de agua a varios pueblos que tuvieron que buscar fuente alternativa de agua.

Los ambientes de riesgos son particularmente todos los embalses o reservorios de agua con alto contenido en nutrientes, utilizados en suministro de agua para consumo humano o ganado.

A continuación se detalla un muestreo de casos publicados que explican la importancia que pueden tener las intoxicaciones agudas de seres humanos con cianobacterias:

1. Casos atribuidos a cianotoxinas en agua de bebida

1931: EEUU: Un florecimiento masivo de *microcystis* en los ríos de Ohio y Potomac afectó entre 5.000 y 8.000 personas que consumieron agua potable procedente de estos ríos. El tratamiento del agua potable mediante precipitación, filtración y cloración no fue suficiente para eliminar las toxinas (Tisdale, 1931).

1968: Schwimmer y Schwimmer (1968) recopilaron numerosos casos de enfermedad gastrointestinal luego de la exposición a la presencia masiva de cianobacterias.

¹ Colapso vital por agotamiento de oxígeno: daños al ecosistema por agotamiento del oxígeno disuelto.

- 1975:** En Washington DC, el florecimiento de cianobacterias en un reservorio de agua potable produjo un ataque endotóxico a 23 pacientes de diálisis (Hindman y otros, 1975).
- 1979:** Australia: En Palm Island, el tratamiento con sulfato de cobre de un reservorio de agua potable que presentaba un florecimiento de *Cylindrospermopsis raciborskii* produjo la liberación de toxinas de células en el agua, lo cual enfermó gravemente (incluida hospitalización) a 141 personas que se abastecieron de este reservorio (Falconer, 1993,1994).
- 1981:** Australia: En la ciudad de Armidale, los niveles de enzimas hepáticas fueron elevados en la sangre de la población abastecida de agua superficial contaminada con *Microcystis spp* (Falconer y otros, 1983).
- 1985:** EEUU: Carmichael (1994) reunió estudios de casos sobre: náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, infecciones al ojo, oído y garganta luego de la exposición a la presencia masiva de cianobacterias.
- 1993:** China: La incidencia de cáncer de hígado está claramente relacionada con fuentes de agua y es considerablemente mayor en poblaciones que usan aguas superficiales infestadas con cianobacterias que en las que beben aguas subterráneas (Yu, 1995).
- 1993:** Australia: Falconer (1994) estimó que, debido al florecimiento de cianobacterias tóxicas, anualmente se pierden 600.000 jornales en la obtención del agua.
- 1994:** Suecia, cerca de Malmö: El uso ilegal de aguas no tratadas de un río en una fábrica azucarera conllevó a una conexión cruzada accidental con el suministro de agua potable durante un número indeterminado de horas. El agua del río estaba densamente poblada con *Planktothrix agardhii* y las muestras tomadas poco antes y después del incidente mostraron que estas cianobacterias contenían microcistinas. De los 304 habitantes del pueblo, 121 personas (así como algunos perros y gatos) experimentaron vómitos, diarrea, calambres musculares y náuseas (Cronberg y otros, 1997).

2. Casos atribuidos a cianotoxinas en aguas recreativas

- 1959:** Saskatchewan: A pesar de la muerte de ganado y las advertencias sobre su uso recreativo, varias personas se bañaron en un lago infestado de cianobacterias. Trece personas enfermaron (dolores de cabeza, náuseas, dolores musculares y diarreas con dolor). En el excremento de un paciente –un médico que ingirió accidentalmente 300 ml de agua– se identificó claramente varias células de *Microcystis spp.* y algunas tricomas de *Anabaena circinalis* (Dillenberg y Dehnel, 1960).
- 1989:** Reino Unido: Diez de veinte soldados enfermaron luego de nadar y practicar canotaje en aguas con un fuerte florecimiento de *Microcystis spp.*; Dos de ellos desarrollaron una neumonía severa atribuida a la inhalación de la toxina *Microcystis* y tuvieron que ser hospitalizados e ingresar en la unidad de cuidados intensivos (Turner y otros, 1990). Las habilidades de natación y la cantidad de agua ingerida parecen estar relacionadas con la gravedad de la enfermedad.
- 1995:** Australia: La evidencia epidemiológica acerca de los efectos adversos sobre la salud luego del contacto con aguas recreativas obtenida de un estudio prospectivo con 852 personas, mostró una elevada incidencia de diarreas, vómitos, síntomas de gripe, erupciones en la piel, úlceras en la boca, fiebre, irritación de ojos u oídos después de 2 a 7 días de la exposición (Pilotto y otros, 1997). Los síntomas aumentaron significativamente según la duración del contacto con el agua y densidad de células cianobacterianas, pero no estuvieron relacionados con el contenido de cianobacterias conocidas.

3. Casos relacionados con otras vías de exposición

1996: Caruaru (Brasil): De un total de 130 pacientes expuestos a microcistinas a través del agua usada para diálisis murieron 56. Al menos 44 de estas víctimas mostraban los típicos síntomas relacionados con microcistinas, actualmente denominados 'Síndrome de Caruaru' y el contenido de microcistinas en el hígado correspondía al de animales de laboratorio que habían recibido una dosis letal de microcistina (Carmichael, 1996).

1.3. La cianotoxina microcistina

Las cianobacterias producen, en determinadas condiciones, un amplio rango de metabolitos secundarios que tienen carácter tóxico para los organismos eucariotas. Estas toxinas son producidas únicamente por algunos géneros de cianobacterias, entre ellos *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* y otros. Esta capacidad, conservada durante la evolución en algunas cepas, provoca graves problemas sanitarios y medioambientales. Como ya se ha comentado anteriormente, en aguas dulces, la presencia de cianotoxinas se está convirtiendo en un problema acuciante, debido a la imparable eutrofización de los acuíferos.

Una de las cepas más virulenta de las cianobacterias es *Microcystis aeruginosa*, que produce las hepatotoxinas más abundantes, las microcistinas.

Las toxinas producidas son fundamentalmente hepatotóxicas y neurotóxicas, aunque también dan lugar a alteraciones gastrointestinales, reacciones alérgicas o irritación y sintomatología similar a la de la neumonía, aunque el principal riesgo tóxico deriva de su actividad promotora tumoral. Este riesgo se puede producir tras el contacto con la piel durante el baño o tras una exposición prolongada a niveles crónicos y subcrónicos de estas toxinas en el agua de bebida. Los estudios sobre efectos genotóxicos son muy escasos.

La necrosis hepática aguda masiva producida por estas toxinas (microcistinas) produce un cuadro hemorrágico y choque hipovolémico que dan lugar a la muerte. La muerte se puede producir en unas pocas horas o días y viene precedida por un cuadro de choque, es decir, coma, temblor muscular, palidez y dificultad de la respiración. Uno de los primeros efectos que se observan en la intoxicación (tras 15-30 min) es una elevación en los niveles séricos de bilirrubina, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, y alanina aminotransferasa.

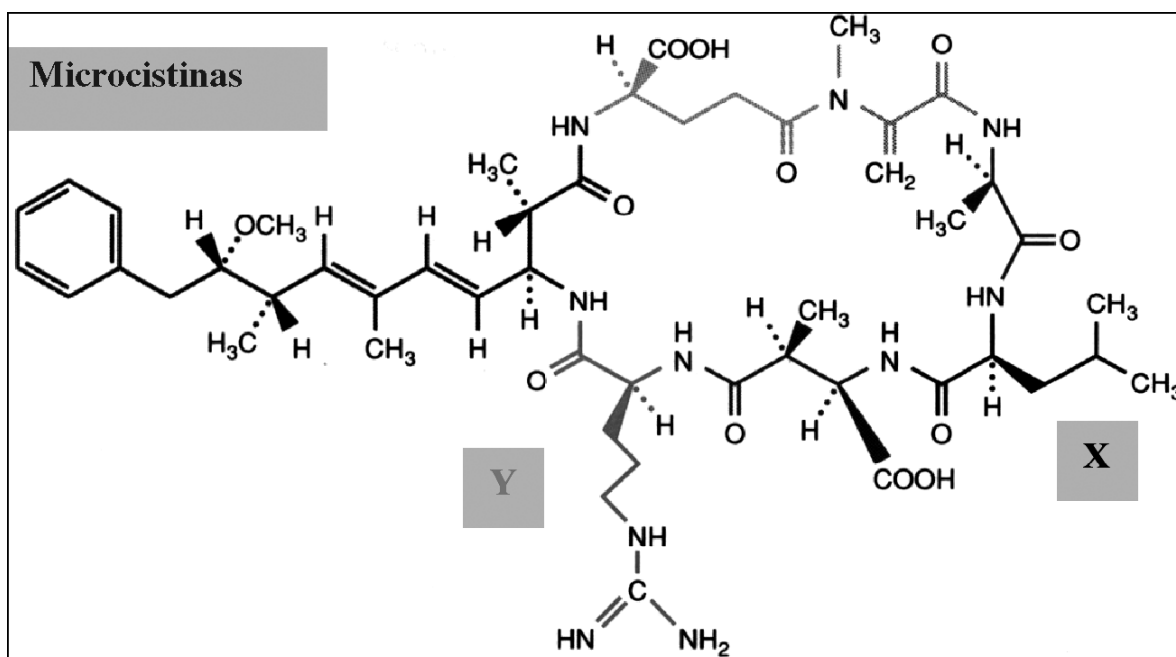
Las microcistinas son metabolitos secundarios hepatotóxicos producidos por ciertas cianobacterias. Se han descrito cerca de un centenar de microcistinas, que son péptidos cíclicos en los que intervienen aminoácidos no proteicos y cuya síntesis no se lleva a cabo mediante ribosomas, sino por enzimas denominadas en general péptido sintetasas, que llevan a cabo los enlaces peptídicos, junto con otras enzimas que modifican las cadenas laterales. Es importante destacar que no es necesario que se produzca una gran proliferación de cianobacterias para que la población presente sea tóxica, ya que las cianotoxinas son uno de los venenos más potentes.

Son fuertes inhibidores de serin-treonin fosfatasas (1 y 2A), que inducen hemorragias hepáticas severas. Recientemente se ha descrito que podrían también afectar a la subunidad β de la ATP-sintasa. Su presencia en aguas dulces está aumentando considerablemente en toda la zona mediterránea, aunque las microcistinas son muy ubicuas y se reconoce como un problema a escala mundial. Las microcistinas han dado lugar a la muerte de animales salvajes y domésticos y fue identificada como la causa de la muerte de enfermos sometidos a hemodiálisis en Brasil (ver tabla anterior). Su ingesta a dosis subletales ha sido relacionada con cáncer de hígado en humanos.

La Organización Mundial de la Salud recomendó hace ya muchos años unos niveles máximos de microcistina en aguas de boca de 1 $\mu\text{g/l}$, cifra que recoge la legislación española en el Real Decreto 140/2003, aunque la obligatoriedad de determinar microcistina se restringe a aguas emergentes de depuradoras, con sospecha de eutrofización en su origen.

Las microcistinas están constituidas por aminoácidos proteicos y no proteicos, cuya fórmula es D-Ala-X-Masp-Z-Adda-D-Glu-Mdha, donde X y Z son L-aminoácidos que varían en función en los distintos tipos de microcistinas. Se conocen más de 70 variantes de microcistina diferentes, las más estudiadas son MC-LR, MC-RR, MC-YR, de las cuales la más abundante es la microcistina LR (X=Leu, Z=Arg). Las microcistinas no se excretan al medio o en muy pequeña tasa, y únicamente se liberan tras la muerte de las células que las contienen. Se ha sugerido que podría haber exportación de estos péptidos al medio, pero la doctrina general es que permanecen en el interior celular.

La estructura molecular es la siguiente:



Las microcistinas se pueden clasificar en 3 grupos de diferente nivel de toxicidad (muy elevada, elevada y moderada), estando la MC-LR en el grupo de toxicidad muy elevada.

Una vez sintetizadas las microcistinas son muy difíciles de eliminar. Los métodos vigentes están desarrollados fundamentalmente a nivel de laboratorio; Se utiliza floculación o filtración, seguido de cloración. Estos procedimientos tan apenas afectan a las microcistinas, salvo que se utilicen filtros de carbón activo, algo inviable en muchos casos. El cloro debe ser empleado en altas concentraciones, dando lugar a metabolitos residuales organoclorados y mal sabor.

Otros procedimientos, como utilización de permanganatos, ozono, luz ultravioleta junto con algún agente inmovilizado como TiO_2 , filtros de arcilla y caolinita pueden ser utilizados pero, o bien la tecnología no está desarrollada a nivel comercial, o los productos de degradación hace que sean incompatibles desde el punto de vista sanitario o ambiental. Según bibliografía (Lawton y Robertson, 1999), el uso de H_2O_2 en aguas es muy limitado y resulta poco efectivo, aunque la presencia de metales como Fe^{++} puede, mediante reacciones de Fenton, generar radicales libres muy activos.

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo propuesto es obtener metodologías de eliminación de cianotoxinas basados en la utilización de agentes químicos con actividad antimicrobiana y alguicida. El control del fitoplancton productor de toxinas es una medida preventiva que puede evitar la producción de toxinas. En nuestro trabajo proponemos desarrollar metodología, utilizando productos biodegradables y respetuosos con el medio ambiente, para destruir controladamente la presencia de cianobacterias tóxicas en determinados ambientes en que pueden desarrollarse, así como sus cianotoxinas, las microcistinas.

Este trabajo se va a desarrollar en distintas partes:

- I. Efecto de diferentes biocidas comercializados por OX-CTA sobre diferentes tipos de fitoplancton;
- II. Efecto de OX-VIRIN sobre la cianotoxina microcistina;
- III. Estudiar la eficacia frente a microcistina de OX-VIRIN potenciado con diferentes sales de hierro en concentraciones catalíticas;
- IV. Realizar ensayos de destrucción de microcistinas utilizando OX-VIRIN enriquecido con peróxido de hidrógeno;
- V. Estudiar la eficacia como agente eliminador de microcistinas de otros sistemas de desinfección basados en el ácido peracético y el peróxido de hidrógeno, como OX-AGUA 2ª GENERACIÓN;
- VI. Estudiar la eficacia de sistemas físicos, tales como la radiación ultravioleta, como potenciadores de la acción oxidante de OX-VIRIN y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN;
- VII. Estudio de la eficacia de sistemas físicos como radiación UV que ofrece sinergia con la acción oxidante de OX-VIRIN y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN y TiO₂.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos y cepas

Para las partes I y II del proyecto se cultivaron tres tipos diferentes de organismos representativos de fitoplancton; Se escogieron como representantes de tipos estructural y morfológicamente distintos:

- *Anabaena* PCC 7120: Procariota, filamentosa representativa de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Se obtuvo del Instituto Pasteur.
- *Microcystis* PCC 7005: Procariota, unicelular y representativa de las cianobacterias potencialmente tóxicas. No fijadora de nitrógeno. Se obtuvo del Instituto Pasteur.
- *Chlorella fusca*: Eucariota, se trata de un alga verde unicelular con una pared especialmente dura. Se obtuvo de la colección de cultivos de Gottingen (Alemania).

Se llevaron a cabo cultivos en placa, para posteriormente establecer cultivos en medio líquido. Se utilizó medio BG11 (Rippka et al., 1979) para las dos cianobacterias, y medio Kessler y Czigan (1970) en el caso de *Chlorella fusca*.

Para estudiar el efecto de los productos OX-VIRIN y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN se utilizaron cultivos de las cianobacterias *Anabaena sp.* PCC 7120 y *Microcystis sp.* PCC 7806 crecidos en medio BG11 (Rippka et al., 1979) con burbujeo de aire estéril. Las cepas de las cianobacterias se obtuvieron del Instituto Pasteur. En la realización de los ensayos se utilizaron cultivos que fueron diluidos en medio BG11 para dejarlos a la concentración de trabajo. La concentración del cultivo se calculó midiendo su absorbancia a 600 nm.

Efecto de los biocidas sobre los organismos

Para cada línea de cultivos se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Se prepararon las correspondientes diluciones de los tres biocidas suministrados por la empresa de manera que, después de mezclarlos con 100 ml de cada uno de los cultivos, queden a las siguientes concentraciones:

- OX-VIRIN: 0,2; 0,5; 1%.
- OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN: 0,003; 0,015; 0,5%.
- OX-AGUA: 0,001 y 3%.

El experimento se realizó con cultivos que presentaban una absorbancia a 700 nm entre 0,250 y 0,350. Los cultivos tratados (con biocida) y el control (sin biocida) se mantuvieron en condiciones normales de crecimiento tomando alícuotas de 10 ml a diferentes tiempos (5 minutos, 1 hora y 24 horas).

Después de incubar 24 horas con el biocida, se toman 10 ml de cada muestra y se resiembran sobre 50 ml de medio fresco. Sobre estos cultivos se midió absorbancia a 3, 6 y 9 días después de la resiembra. De esta forma estudiamos la viabilidad de las células después del tratamiento.

Las alícuotas tomadas a 5 minutos, 1 hora y 24 horas se sometieron a la determinación de los siguientes parámetros:

Determinación de clorofila, determinación de peso húmedo y determinación de proteínas totales.

Determinación de clorofila

Se llevó a cabo según el método de Mackinney (1941): Se toma 1 ml de la alícuota en un eppendorf, se centrifuga 10 minutos a 10.000 rpm, se elimina el sobrenadante y al pellet se le añade 1 ml de metanol. Se agita 30 segundos y se centrifuga 5 minutos a 10.000 rpm. Se toman 600µl y se determina la absorbancia a 665 nm.

Todo este proceso se realiza en ausencia de luz, puesto que la luz degrada la clorofila. La concentración de clorofila se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g clorofila/ml} = \text{Abs } 665\text{nm} \times 13,43$$

Determinación de peso húmedo

Se toma 1 ml en un eppendorf, se centrifuga 15 minutos a 10.000 rpm, se elimina el sobrenadante y, tras la eliminación de todos los restos de líquido de las paredes de los tubos, se pesa. Esta operación se hace por duplicado para hacer media de dos valores. Los valores de peso húmedo expresados en los resultados para *Anabaena* PCC7120 y *Microcystis* PCC 7005 corresponden a 1 ml de cultivo.

Resiembra en medio líquido

Se toman 10 ml de los cultivos tratados (con biocida) y del control (sin biocida) y se añaden sobre 50 ml de medio de cultivo fresco. Se mantienen en condiciones normales de cultivo durante 9 días tomando alícuotas a 3, 6 y 9 días, a las cuales se les determina la absorbancia a 700nm.

Modificaciones en el protocolo para *Chlorella fusca*.

La dureza de la pared de las células intactas de *Chlorella fusca* hizo necesaria la modificación parcial del protocolo. Se tomaban 800 µl de las células y se sometían a 6 ciclos de 45 segundos de sonicación con descansos de 30 segundos. Con esto y la adición de metanol conseguimos la rotura de las células.

Se cogían 250 µl de células rotas y se les añadía 1 ml de metanol. El resto del protocolo es similar al descrito en 2.2.1 para la determinación de clorofila.

Para la determinación del peso húmedo también llevamos a cabo una variación ya que las células de 1 ml del cultivo no se posaban bien, optamos por obtener el peso húmedo correspondiente a 4 ml. Los valores de peso húmedo expresados en los resultados para *Chlorella fusca* corresponden por tanto a 4 ml de cultivo.

Productos químicos

La microcistina LR fue obtenida de Alexis Biochemicals, la protein-fosfatasa 2A (PP2A) de Upstate Biotechnology, y el p-nitrofenilfosfato (p-NPP) de Sigma. OX-VIRIN fue proporcionado por OX-CTA (lote de PP2A 26330).

Dosis y tiempos de exposición a OX-VIRIN

Disoluciones de microcistina LR se sometieron a distintas dosis de OX-VIRIN (típicamente 0,5%, 1%, 3%), durante distintos tiempos de incubación dependiendo del experimento (1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas). Otras dosis y tiempos fueron utilizados según se indica en los experimentos.

HPLC

La cuantificación de microcistina residual tras el tratamiento se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo de la marca Kontron equipado con un detector espectrofotométrico, siguiendo el procedimiento descrito por Lawton (2001).

Se utilizó una columna Waters Symmetry 300, de fase reversa C₁₈, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm. Como solventes se utilizaron: agua milliQ 0,05% ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) y acetonitrilo 0,05% ácido trifluoroacético (TFA) (solvente B). Se llevó a cabo un gradiente lineal de 0-100% de B en 40 minutos y un flujo de 1 ml/min.

Se detectó la microcistina mediante un detector uv-visible a una longitud de onda de 238 nm, el máximo de absorción de la microcistina LR.

Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se utilizaron geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% para valorar el efecto de OX-VIRIN sobre albúmina bovina (BSA). Se utilizó esta técnica (Laemmli, 1970) también para analizar la degradación de ovoalbúmina producida por OX-VIRIN y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN, así como para determinar el efecto producido sobre la proteína total de las cianobacterias.

Es posible visualizar el extracto crudo de las cianobacterias debido a que la preparación de las muestras conlleva diluirlas en un tampón desnaturante y hervirlas a 100° C durante 5 minutos, lo que rompe las membranas celulares. Una vez preparadas las muestras, se cargaron en un gel de poliacrilamida del 17% y tras la electroforesis se visualizaron las bandas de proteínas mediante tinción específica con azul de Coomassie. Se utilizó un patrón de pesos moleculares comercial para poder identificar las proteínas visualizadas.

Cantidades para 1 gel:

	Gel separador	Gel concentrador
Agua	2,35 ml	5,7 ml
Archilamida	5 ml	1,7 ml
Tris	2,5 ml	2,5 ml
SDS (20%)	50 µl	50 µl
TEMED	7 µl	7 µl
Persulfato amónico	200 µl	200 µl

Ensayo de inhibición de protein-fosfatasa 2A

La actividad de la protein-fosfatasa (PP2A) se determina midiendo el color asociado con la producción a 37° C de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenilfosfato (p-NPP), en un lector de placas microtiter a 405 nm. El p-NPP se disuelve en un tampón que contiene 40 mM Tris-HCl, 34 mM MgCl₂, 4 mM EDTA y 4 mM de ditiotreitól, pH 8,3. La PP2A se disuelve en el mismo tampón pero suplementado con 0,5

mg/ml de albúmina bovina. El ensayo se lleva a cabo añadiendo 200 μ l de muestra sobre 50 μ l de buffer 5X en cada pocillo. Se añade 25 μ l de enzima y se incuba 10 minutos a 37° C, entonces se añade 25 μ l de sustrato. La producción de color se mide a 405 nm, después de incubar a 37° C durante 1 hora (Bouaicha *et. al*, 2002). El p-NPP y la enzima se disuelven en un tampón que contiene 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM MgCl₂ y 120 mM EDTA.

En las partes del ensayo III-VI se lleva a cabo añadiendo 50 μ l de muestra diluida 1/100, 10 u de enzima y 90 μ l de sustrato. Es necesario realizar una dilución previa de la muestra debido a que el metanol en el que fue eluída tras los cartuchos C18 interfiere en el ensayo. Esta dilución no se realiza en el caso de muestras con poca concentración de microcistina ya que se evaporó el metanol burbujando con N₂ y se resuspendieron en un tampón que no interfiere en el ensayo. La producción de color se mide a 405 nm, después de incubar a 37° C durante 1 hora (Bouaicha *et al.*, 2002). La absorbancia a 405 nm se transforma en porcentaje de inhibición de la enzima protein-fosfatasa asignando que no existe inhibición en el control negativo de cada ensayo, donde sólo está presente el sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP).

La concentración típica de microcistina en esta parte del ensayo es de 2 μ g/ml, concentración 2.000 veces superior al máximo permitido en aguas de consumo humano según el RD 140/2003. Tras la eliminación del producto oxidante por medio del cartucho C18 queda diluida a la mitad y posteriormente diluida 1/100 antes de la realización del ensayo de la actividad fosfatasa, por lo que la concentración de microcistina final sería de 10 μ g/l.

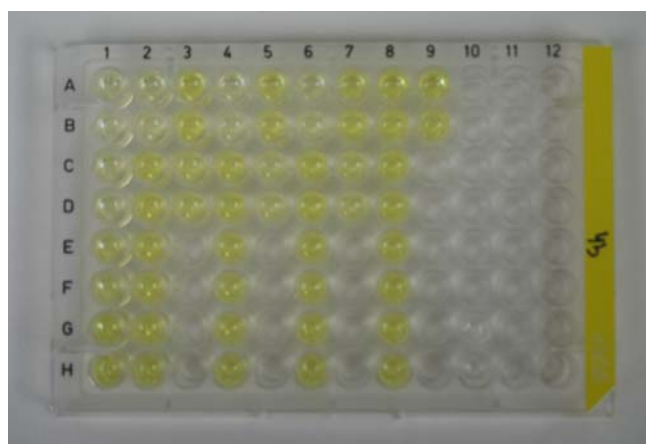


Figura 1.- Ensayo de la actividad de la protein-fosfatasa en placa microtiter.

Medidas espectrofotométricas

La lectura de la absorbancia de las muestras a 280 nm se realizó en un espectrofotómetro Uvikon. Se realizó un espectro de 250 nm a 350 nm para observar el pico de la proteína antes de cuantificar la muestra con el valor de absorbancia a 280 nm. Las muestras se diluyeron 1/10 antes de la medida para estar dentro del rango de detección. Las medidas a 450 nm y 630 nm se realizaron en un lector de placas microtiter.

Espectrometría de masas

El análisis se realizó mediante electrospray (ESI-MS), siendo el volumen de muestra necesario de 50 μ l y la concentración de la muestra 1 mM. El instrumento utilizado fue un espectrómetro de masas ZQ. Fue llevado a cabo en el Servicio de Masas de la Universidad de Barcelona.

Cultivos y extracción de microcistina

Se llevaron a cabo cultivos en placa de *Microcystis* PCC7806, para posteriormente establecer cultivos en medio líquido. Se utilizó medio BG11 (Ripka *et al.*, 1979) para el cultivo de la cianobacteria. La cepa de *Microcystis* PCC7806 se obtuvo del Instituto Pasteur. La extracción de microcistina a partir de alícuotas del cultivo se llevó a cabo mediante una doble extracción con metanol 0,1% TFA según el método descrito por Lawton en 2001.

Medida de estrés oxidativo

Alícuotas del cultivo de *Microcystis* PCC7806 se sonicaron, se tomó el sobrenadante y las proteínas se precipitaron con acetona. El pellet se trató con cloruro de guanidinio y se le añadió BHT (3,5 di-tert-butyl-4 hidroxil tolueno) como antioxidante. Una vez la muestra preparada se le añade una mezcla de agua, ácido sulfúrico, naranja de xileno, sorbitol y Fe^{2+} que producirá color que mediremos espectrofotométricamente a 560nm.

Eliminación de OX-VIRIN

- Neutralización de OX-VIRIN para determinación de microcistina por ensayo de inhibición de protein-fosfatasa

Se le añade a las muestras que contienen 0,5% y 1% de OX-VIRIN 20 μ l de una disolución 0,7 M de NaOH, y a las muestras que contienen 3% de OX-VIRIN 60 μ l de una disolución 0,7 M de NaOH. Se incubó 10 minutos y posteriormente se les añade a todas las muestras 3 μ l de una disolución de catalasa, y se incubó 1 hora. Transcurrido este tiempo se mide la cantidad de peróxidos con las tiras colorimétricas (Merck) y se observa que en el caso de las dosis de 0,5% y 1% se ha neutralizado todo el peróxido, pero en el caso de la dosis de 3% de OX-VIRIN aun queda peróxido en la muestra.

Se hicieron numerosos intentos de neutralizar la dosis de 3% de OX-VIRIN con NaOH y catalasa, pero los resultados fueron infructuosos.

- Neutralización de la dosis de 3% OX-VIRIN para la determinación de microcistina por el ensayo de inhibición de protein-fosfatasa.

Se procedió a neutralizar el peróxido por medio de dilución. Se prepararon muestras 1.000 veces más concentradas de microcistina y luego se le añadió el OX-VIRIN; Se dejaron incubar el tiempo necesario y posteriormente se procedió a la neutralización diluyendo las muestras 1.000 veces. Después se midió la cantidad de peróxidos con las tiras colorimétricas y aún quedaba algo de peróxido, que se consiguió eliminar añadiendo 3 μ l de catalasa.

- Neutralización de OX-VIRIN para la determinación por espectroscopia de masas

Puesto que el volumen de muestra en este caso es mucho menor no se consiguió la neutralización. A las muestras que contenían 1% y 3% de OX-VIRIN se les añadieron 2,5 μ l de NaOH 0,7 M, se dejó incubar durante 15 minutos y posteriormente se le añadió 3 μ l de catalasa y se dejó incubar 1 hora.

- Eliminación de OX-VIRIN mediante cartuchos C18

En los ensayos en los que se utilizó OX-VIRIN en presencia de hierro y de agua oxigenada se procedió a la separación de la microcistina del resto de la muestra mediante unos cartuchos de fase reversa C18 (Waters), para posteriormente poder realizar el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- 1- Activación del cartucho con 1 ml de metanol
- 2- Lavado del cartucho con 1 ml de agua destilada
- 3- Aplicación de 1 ml de muestra que contiene 2 µg/ml de microcistina LR
- 4- Lavado del cartucho con 3 ml de agua
- 5- Eluido de la microcistina utilizando 2 ml de metanol

En algunos casos en los que, debido a la baja concentración de microcistina utilizada en el ensayo, fuera necesario concentrar la muestra, tras el paso por el cartucho C18 se somete a evaporación del metanol mediante burbujeo de N₂. El residuo seco obtenido se resuspende en 2 ml de buffer 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM MgCl₂ y 120 mM EDTA.

Ensayo de la actividad oxidante de OX-VIRIN y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN

En el estudio de la potencial funcionalidad de OX-VIRIN y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN como productos degradantes de proteínas y microorganismos se utilizaron como sustratos de su acción la proteína ovoalbúmina de pollo (SIGMA) y la cianotoxina microcistina LR (Alexis Biochemicals). Como organismos modelo se utilizaron las cianobacterias *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Microcystis* sp. PCC 7806. En determinados ensayos se estudió el posible efecto potenciador de sales de hierro: cloruro ferroso [Cl₂Fe], citrato férrico amónico [C₆H₈O₇xFe_xNH₃] y sulfato férrico amónico o sal de Mohr [Fe(NH₄)₂(SO₄)₂]. Asimismo se utilizó en algunos ensayos peróxido de hidrógeno (H₂O₂) bien para comparar su acción oxidante con la obtenida con OX-VIRIN y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN o bien como potenciador de su acción de forma que dichos productos fueron suplementados con peróxido de hidrógeno. En determinados ensayos se estudió el posible efecto potenciador del óxido de titanio (TiO₂) (PROBUS).

Según las condiciones particulares de cada ensayo, muestras de ovoalbúmina, microcistina LR y cianobacterias, se incubaron con distintas dosis de los productos durante distintos tiempos de incubación a una temperatura de 4° C. En los ensayos en los que se activaba la acción de los productos con radiación ultravioleta, las muestras se incubaron a temperatura ambiente y con agitación suave. Inmediatamente después del periodo de incubación se procedía a parar la reacción eliminando el producto oxidante para posteriormente medir la toxicidad remanente de la muestra mediante el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa, o bien se procedía a preparar las muestras para llevar a cabo una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida para determinar el efecto producido por los productos sobre la proteína total.

Según las condiciones particulares de cada ensayo, muestras de microcistina LR o de la cianobacteria *Microcystis* sp., se incubaron con distintas dosis de los productos durante 2 y 4 horas, a temperatura ambiente y con agitación suave. Inmediatamente después del periodo de incubación se procedía a parar la reacción eliminando el producto oxidante para posteriormente medir la toxicidad remanente de la muestra mediante el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa.

El dispositivo de luz ultravioleta consiste en una lámpara de 35 cm de longitud bajo la cual se disponen las muestras a una distancia de 5,5 cm.

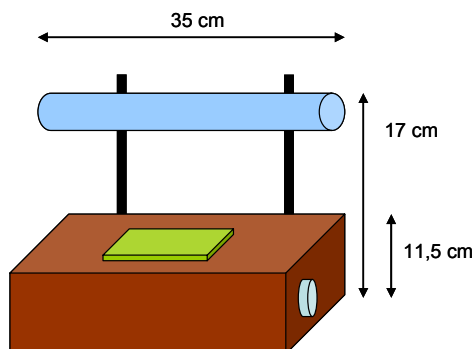


Figura 2.- Sistema emisor de luz ultravioleta

Extracción de la microcistina

La extracción de microcistina a partir de alícuotas de cultivo de *Microcystis sp.* se realizó siguiendo un protocolo de doble extracción con metanol 0,1% TFA (Lawton & Edwards, 2001). Debido a que el metanol interfiere en el ensayo de la protein-fosfatasa 2A, las muestras fueron diluidas 1/10 antes de la realización del ensayo.

4. EFECTO DE BIOCIDAS SOBRE FITOPLANCTON

4.1. INTRODUCCIÓN

Se va a estudiar el efecto de diferentes biocidas comercializados por OX-CTA sobre diversos tipos de fitoplancton: procariotas y eucariotas.

Los organismos fotosintéticos que forman el fitoplancton de aguas dulces tienen dos organizaciones celulares de muy distinta naturaleza, y por lo tanto van a responder de distinta forma a los agentes biocidas. Los procariotas fotosintéticos son o bien bacterias fotosintéticas o bien cianobacterias, mientras que los eucariotas son diversos grupos de algas, tanto macroscópicas como microscópicas, unicelulares o pluricelulares.

4.2. EFECTO SOBRE ANABAENA PCC 7120

4.2.1. Características de *Anabaena* PCC 7120

Anabaena PCC 7120 es una cianobacteria procariota, aeróbica, filamentosa y representativa de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

Estas cianobacterias tienen la capacidad de desarrollar unas células diferenciadas llamadas heterocistos, cuyo número varía en función de la disponibilidad de los nutrientes nitrogenados en el medio de cultivo.

La organización celular de la célula vegetativa corresponde a la de un procariota, ya que carece de orgánulos membranosos subcelulares. El protoplasma está rodeado de una doble capa, homóloga en estructura y composición a las bacterias Gram-; La capa interior es homogénea y la exterior presenta una estructura fina de membrana que contiene proteínas y lipopolisacáridos.

En el protoplasma se ha desarrollado un elaborado sistema de membranas fotosintéticas o tilacoides en cuyo interior se encuentran los componentes del aparato fotosintético. Estas células contienen una región nucleoplásmica fibrilo granular, así como una gran diversidad de inclusiones citoplasmáticas características.

Las regiones que contienen la membrana citoplasmática están en contacto directo con el DNA y los ribosomas.

Los heterocistos presentan grandes diferencias estructurales y metabólicas con las células vegetativas y es en ellos donde se va a producir la fijación de nitrógeno.

4.2.2. Efecto de OX-VIRIN sobre *Anabaena* PCC 7120

Absorbancia inicial del cultivo a 700 nm = 0,294

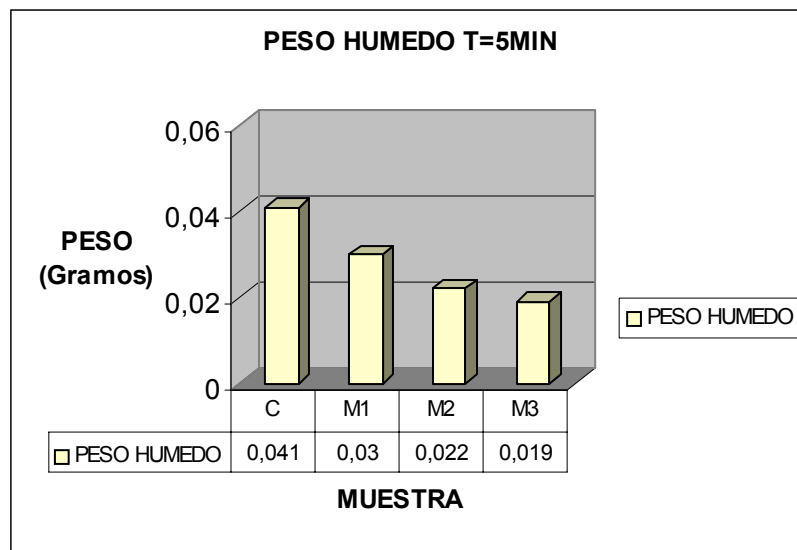
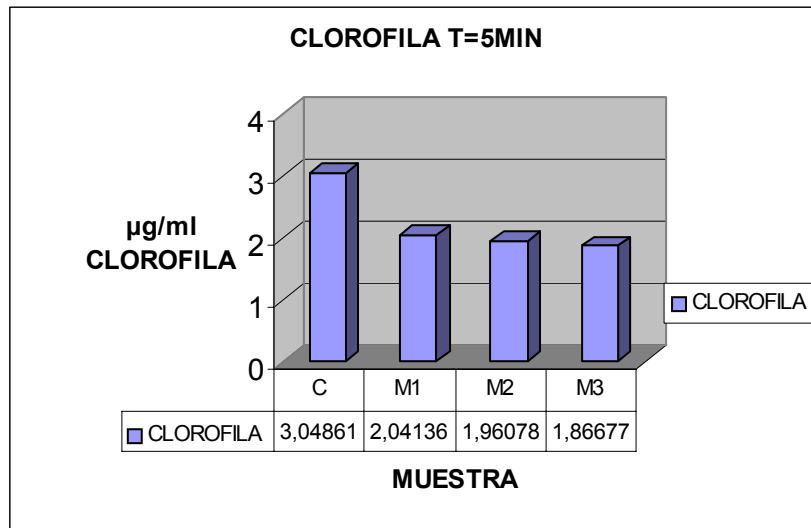
MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,2% OX-VIRIN (M1)
- 0,5% OX-VIRIN (M2)
- 1% OX-VIRIN (M3)

EVOLUCIÓN TEMPORAL:

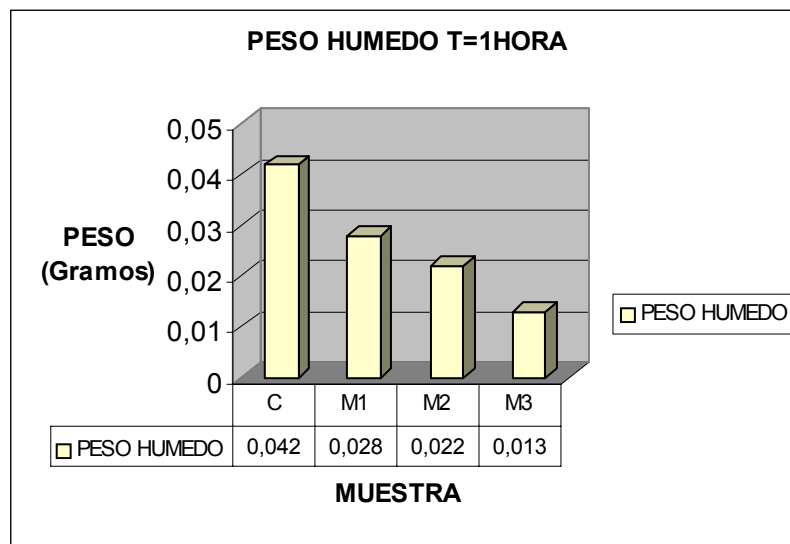
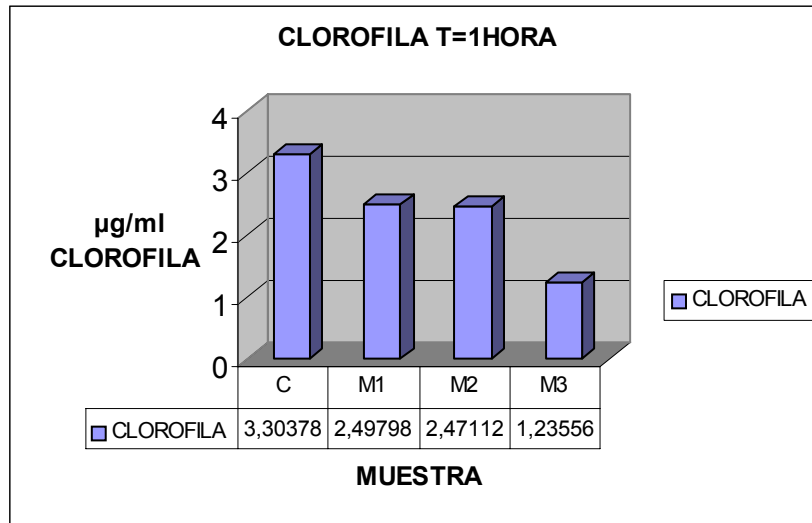
T = 5 MINUTOS

A los 5 minutos de exposición de los cultivos a cantidades crecientes del biocida se observa una disminución de la concentración de clorofila y del peso húmedo. En cuanto al aspecto físico, se aprecia en las muestras tratadas una ligera disminución del color verde.



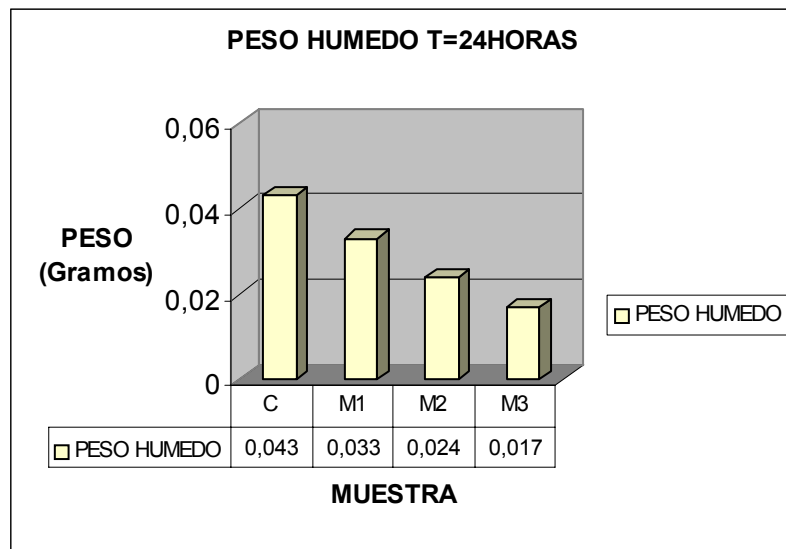
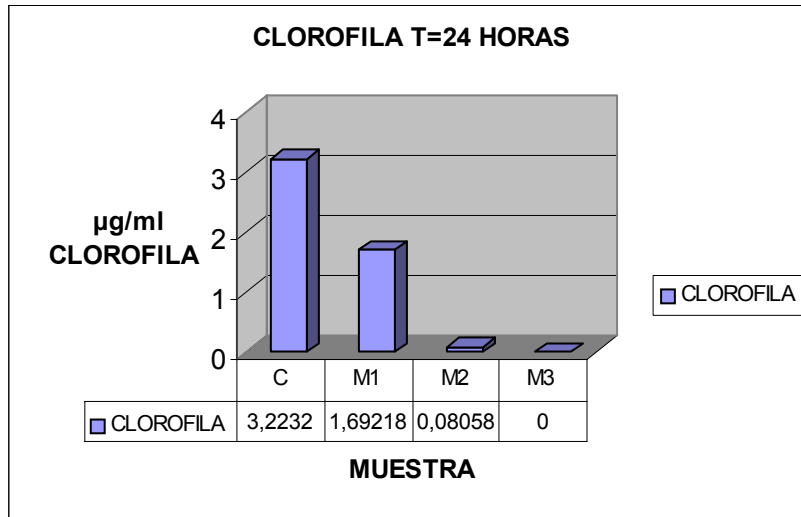
T = 1 HORA

Transcurrida 1 hora de exposición al biocida se observa una disminución paulatina respecto al control de la concentración de clorofila y del peso húmedo, siendo más acusada dicha disminución en la muestra que contiene la dosis mayor de biocida. Se aprecian más diferencias en el aspecto físico entre la muestra control y las tratadas, adoptando estas últimas un color más blanquecino.

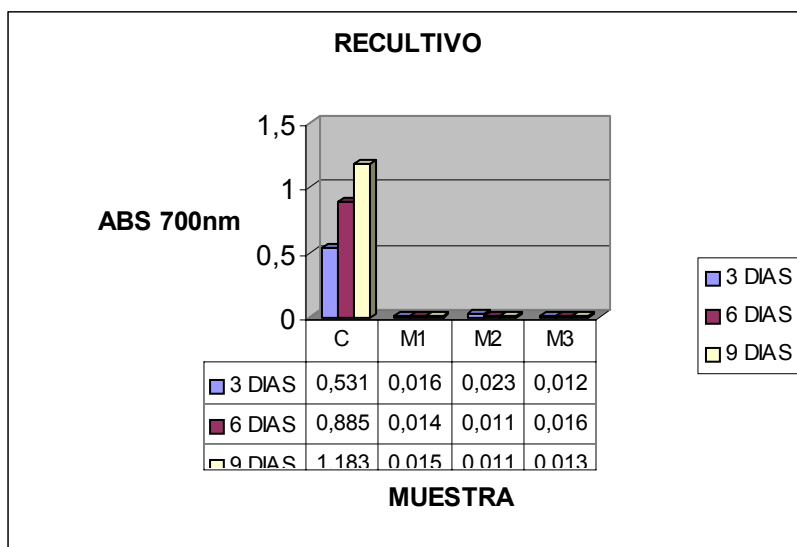


T = 24 HORAS

A tiempo de exposición 24 horas la concentración de clorofila se reduce a la mitad en M1, mientras que en M2 y M3 se hace cero. El peso húmedo disminuye sensiblemente respecto al control, los valores obtenidos en las muestras tratadas corresponden a restos celulares y no a células viables. El control presentaba color verde, mientras que M1 era amarillo y M2 y M3 eran blancos. Estos datos, junto con los de los recultivos, muestran que las tres dosis de OX-VIRIN aplicadas son letales para *Anabaena* PCC 7120 tras 24 horas de incubación.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TRATADAS:



Se observa que los cultivos tratados no presentan absorbancia a 700 nm a 3, 6 y 9 días después del recultivo, por lo cual se deduce que los cultivos después de tratarlos con esas dosis de OX-VIRIN son inviables. Y por tanto las dosis de 0,2%; 0,5% y 1% de OX-VIRIN son letales para *Anabaena* PCC 7120.

4.2.3. Efecto de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN sobre *Anabaena* PCC 7120

Absorbancia inicial del cultivo a 700 nm = 0,317

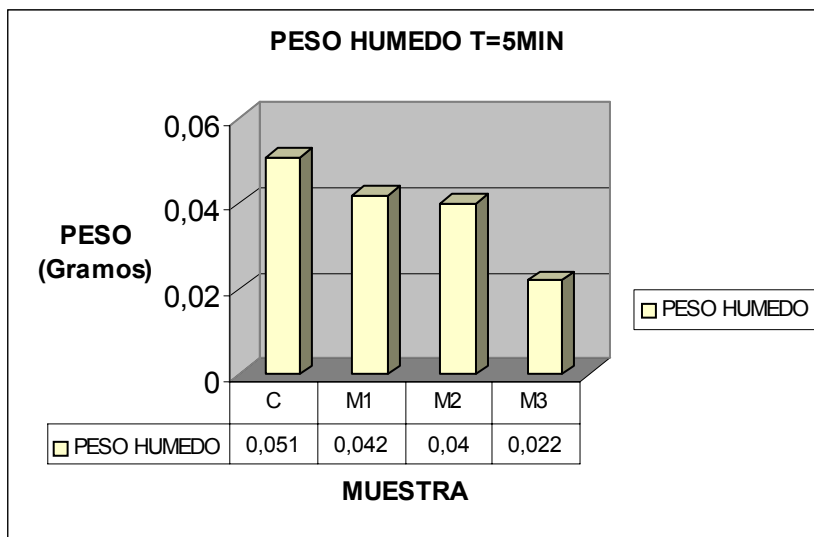
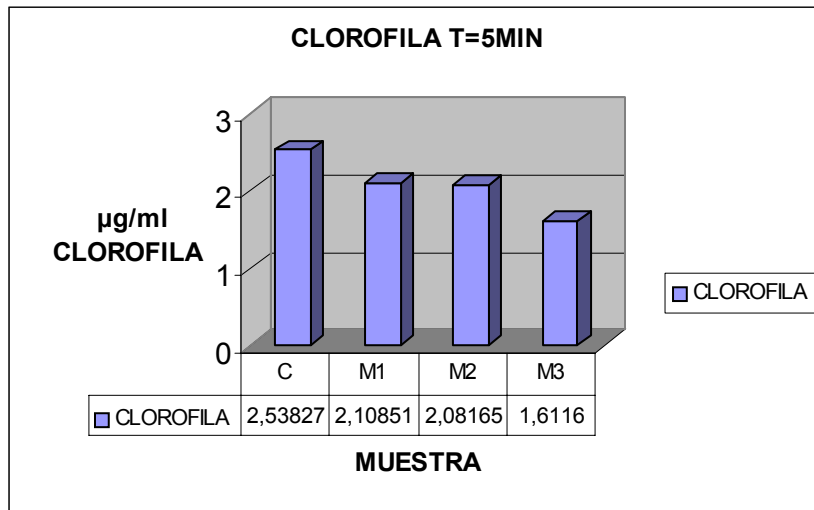
MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,003% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN (M1)
- 0,015% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN (M2)
- 0,5% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN (M3)

EVOLUCIÓN TEMPORAL

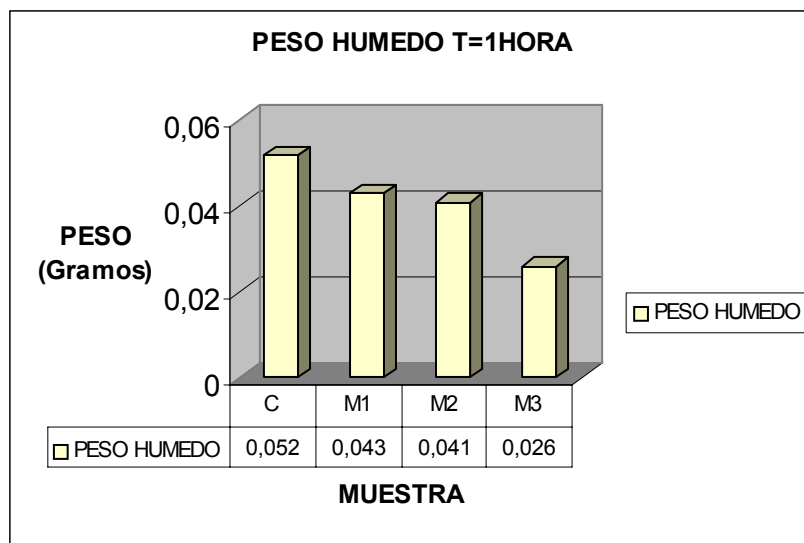
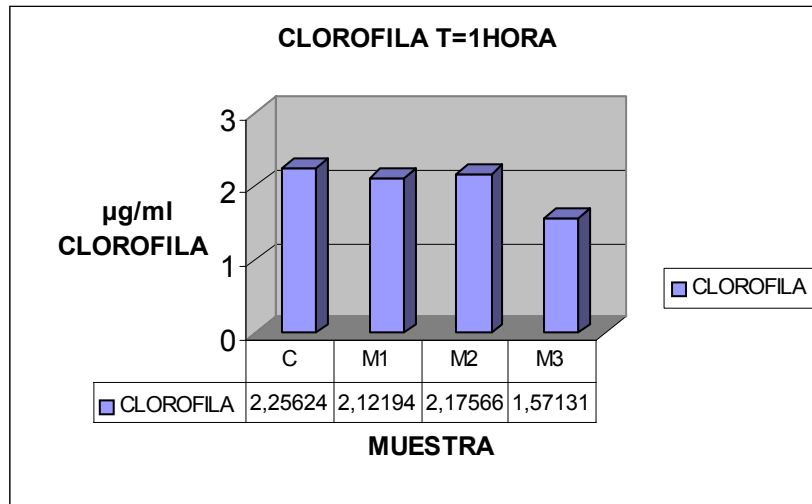
T = 5 MINUTOS

Las muestras tratadas durante 5 minutos con OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN presentan una disminución respecto del control, en cuanto a concentración de clorofila y peso húmedo. El aspecto de los cultivos es similar en las muestras tratadas y en las no tratadas.



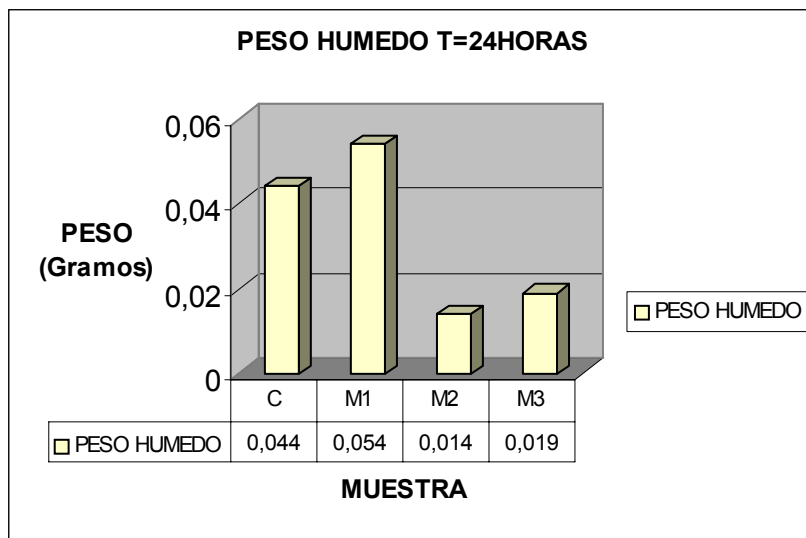
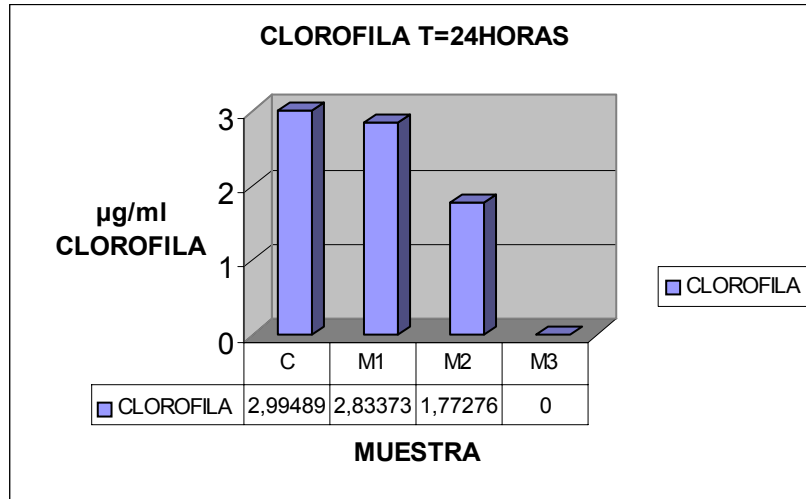
T = 1 HORA

Transcurrida 1 hora se continúa observando la ligera disminución de la concentración de clorofila y peso húmedo en las muestras tratadas. Esta disminución es más acusada en la muestra con mayor dosis de biocida. A medida que aumenta la concentración de biocida se observa una pérdida progresiva de color en los cultivos.

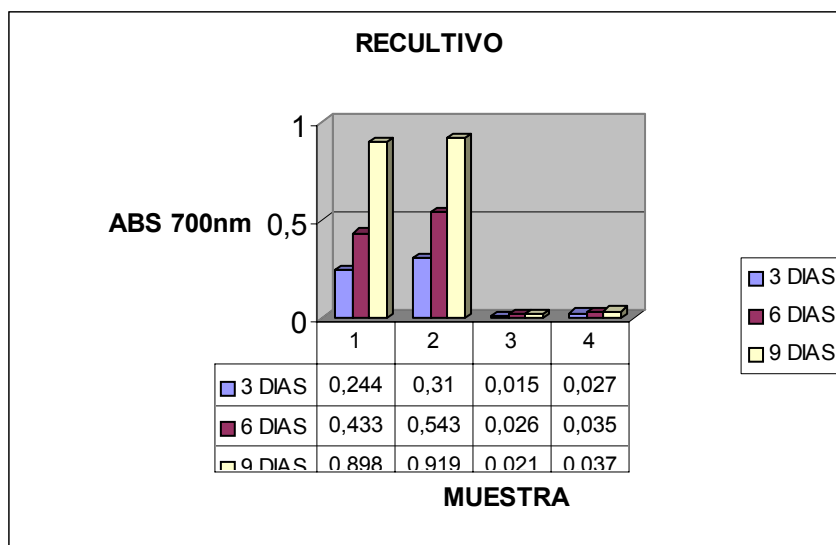


T = 24 HORAS

La clorofila disminuye a la mitad para la dosis de 0,015% y se hace 0 para la dosis de 0,5%. El peso húmedo adquiere valores muy bajos para estas dosis. El control y la muestra M1 presentan color verde, mientras que M2 y M3 presentan color amarillo y blanco respectivamente. Estos datos junto con los del recultivo, nos indican que las dosis de 0,015% y 0,5% van a ser letales, mientras que la dosis de 0,003% afecta al cultivo pero no consigue la inviabilidad del mismo.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TRATADAS:



La muestra M1 presenta absorbancia creciente a 3, 6 y 9 días de recultivo por lo tanto la dosis de 0,003%, no es letal para *Anabaena* PCC 7120. Sin embargo, vemos que las otras dos muestras tratadas, no presentan absorbancia en los 9 días de recultivo, por lo tanto, serán dosis letales para *Anabaena* PCC 7120, 0,015% y 0,5% de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN.

4.2.4. Efecto de OX-AGUA sobre *Anabaena* PCC 7120

Absorbancia del cultivo inicial a 700 nm = 0,349

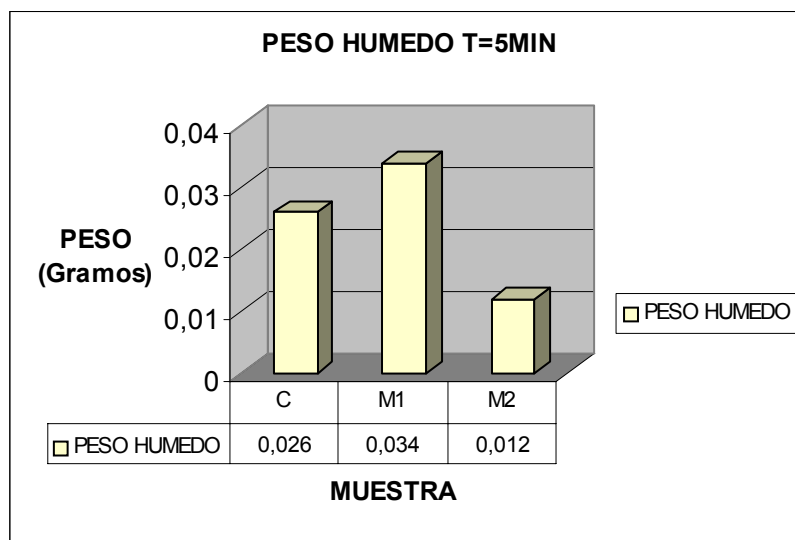
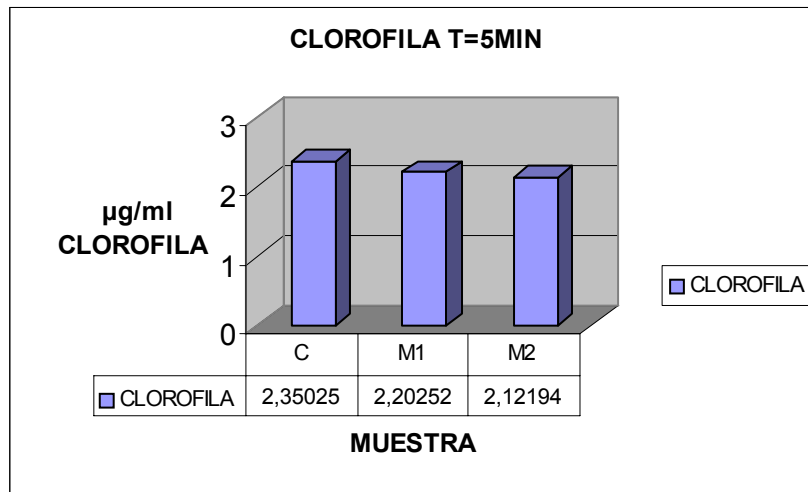
MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,001% OX-AGUA (M1)
- 3% OX-AGUA (M2)

EVOLUCIÓN TEMPORAL

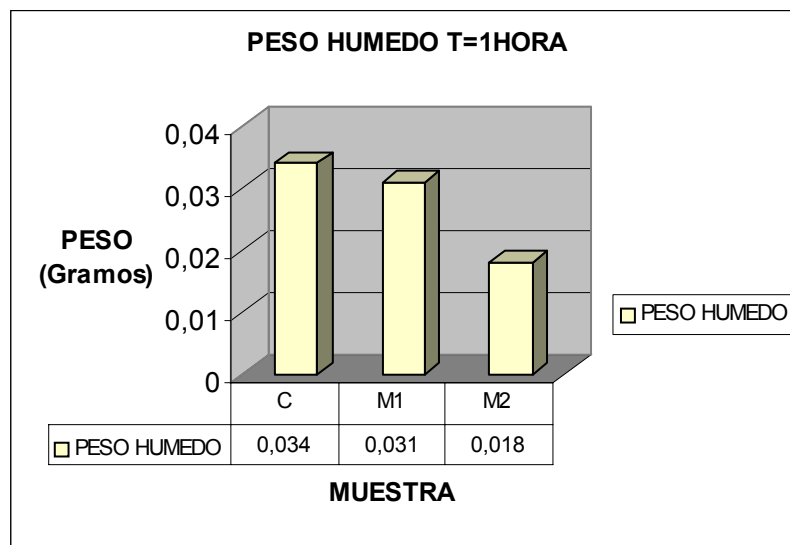
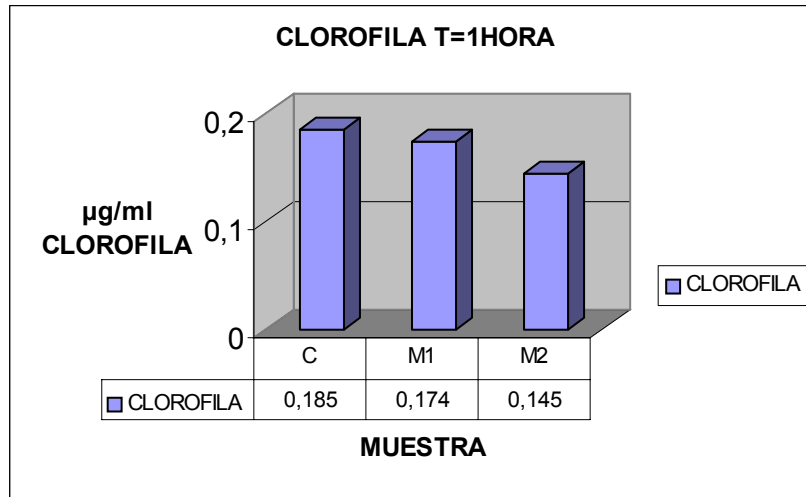
T = 5 MINUTOS

Existen pocas diferencias entre las muestras tratadas y la no tratada en cuanto a los datos experimentales y en cuanto al aspecto físico.



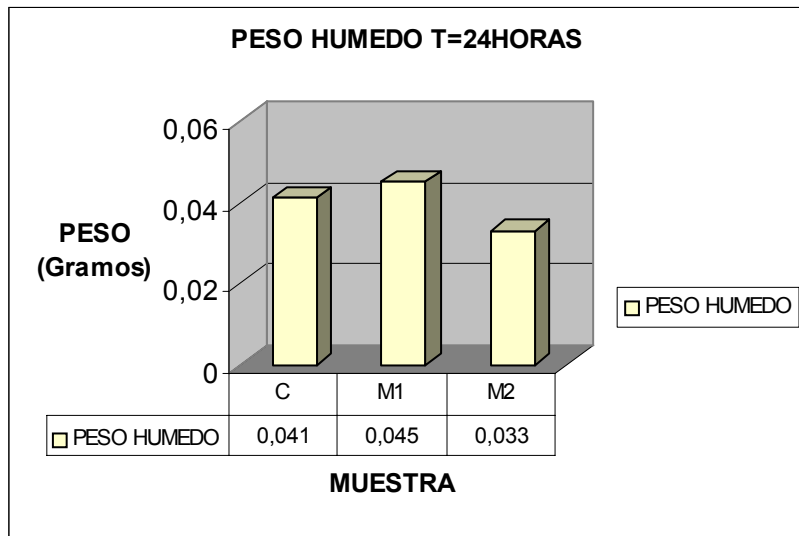
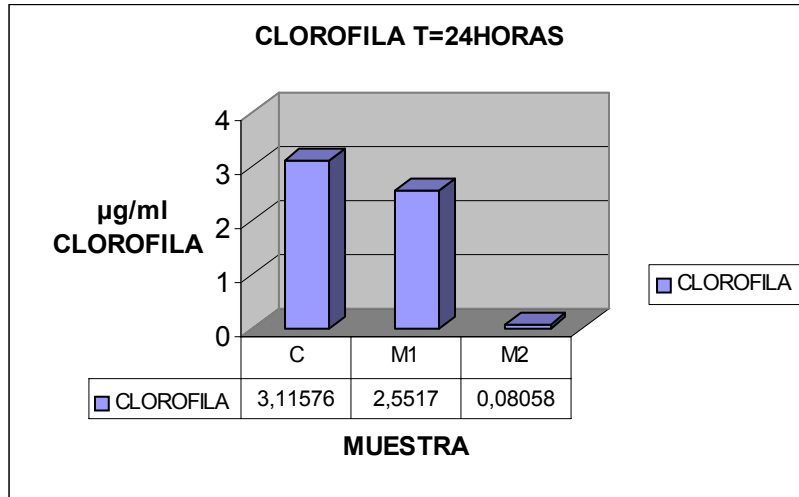
T = 1 HORA

Transcurrida 1 hora de exposición se aprecia una disminución de clorofila y peso húmedo de la muestra M2 respecto de las otras dos. Este hecho también era observable en el aspecto físico de los cultivos, ya que el cultivo M3 presentaba un color más claro que los otros cultivos.

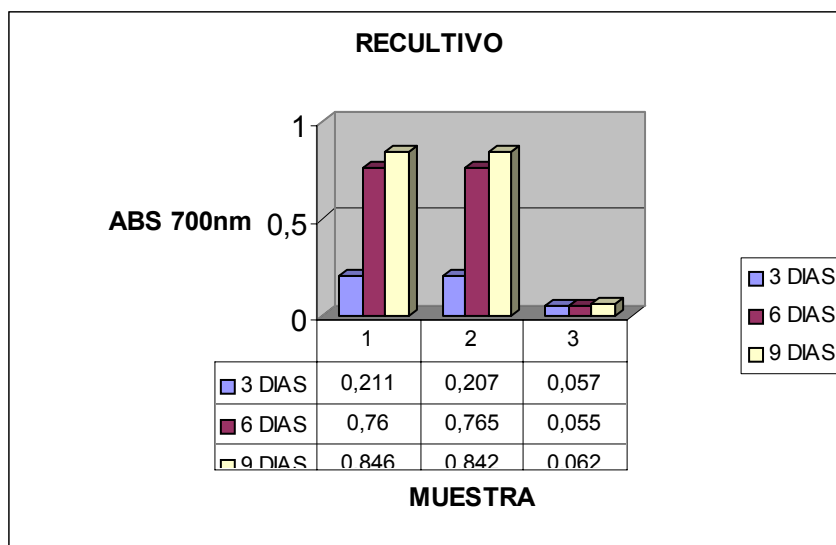


T = 24 HORAS

Mientras la dosis de 0,001% del biocida no produce apenas cambios en los parámetros experimentales y físicos de la muestra, la dosis de 3% disminuye notablemente la clorofila y peso húmedo de la muestra, así como afecta al aspecto físico de la muestra, ya que pierde todo el color verde.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TRATADAS



Se observa que el cultivo tratado con la dosis de 0,001% presenta absorbancia creciente a lo largo de los 9 días al igual que el control, por lo tanto esta dosis no es letal para *Anabaena* PCC 7120. Pero el cultivo tratado con la dosis de 3% no presenta absorbancia a lo largo de los 9 días por lo que podemos afirmar que las células no son viables y que, por tanto, dicha dosis es letal para *Anabaena* PCC 7120.

4.3. EFFECTOS DE SOBRE *MICROCYSTIS* PCC 7005

4.3.1. Características de *Microcystis* PCC 7005

Microcystis PCC 7005 es una cianobacteria procariota, unicelular y no fijadora de nitrógeno. Es representativa de las cianobacterias potencialmente tóxicas. Frecuentemente se producen crecimientos explosivos o “blooms”, los cuales generan una toxina denominada microcistina, siendo las causas por las que se producen estos “blooms” aún no bien conocidas.

La microcistina es un heptapéptido cíclico cuya fórmula es D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha donde X y Z son aminoácidos variables, en función de los cuales se describen numerosas variantes de microcistina. De todas ellas la más frecuente es la microcistina LR, que posee en las posiciones X y Z leucina y arginina.

Las microcistinas son potentes inhibidores de protein-fosfatasa, en concreto de la protein-fosfatasa 1 (PP1) y de la protein-fosfatasa 2 (PP2A). Inhibiendo a estas protein-fosfatasa alteran el citoesqueleto de los hepatocitos, produciendo necrosis del tejido hepático.

4.3.2 Efecto de OX-VIRIN sobre *Microcystis* PCC 7005

Absorbancia inicial del cultivo a 700nm = 0,338.

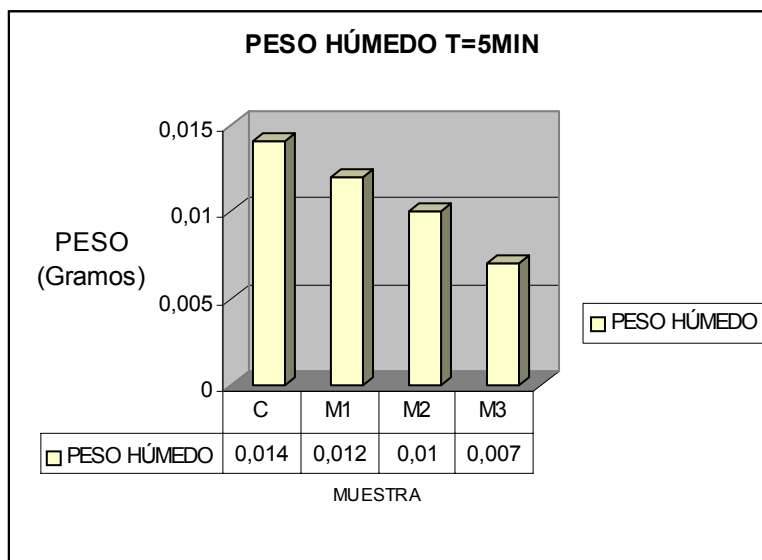
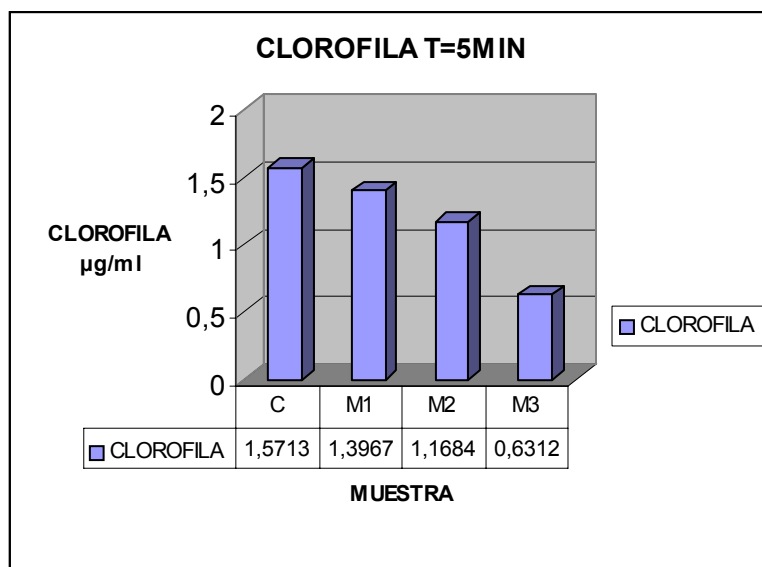
MUESTRAS

- Control (C)
- 0,2% Ox-Virin (M1)
- 0,5% Ox-Virin (M2)
- 1% Ox-Virin (M3)

EVOLUCIÓN TEMPORAL:

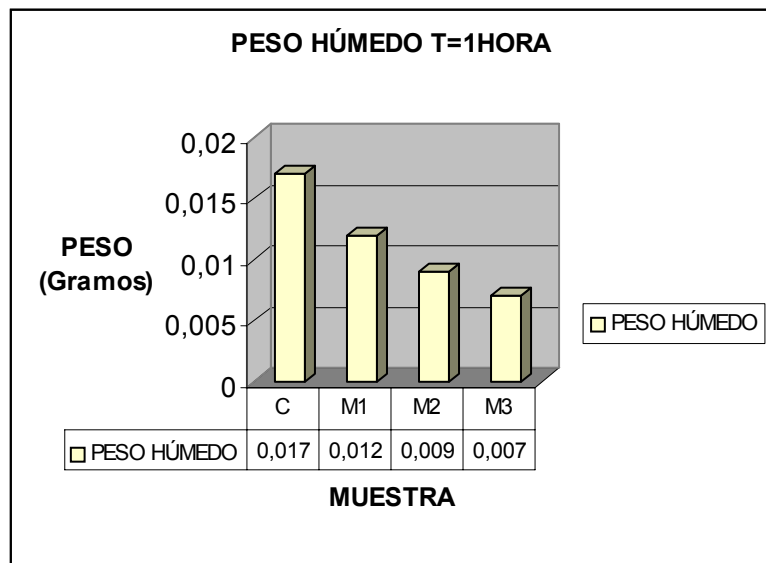
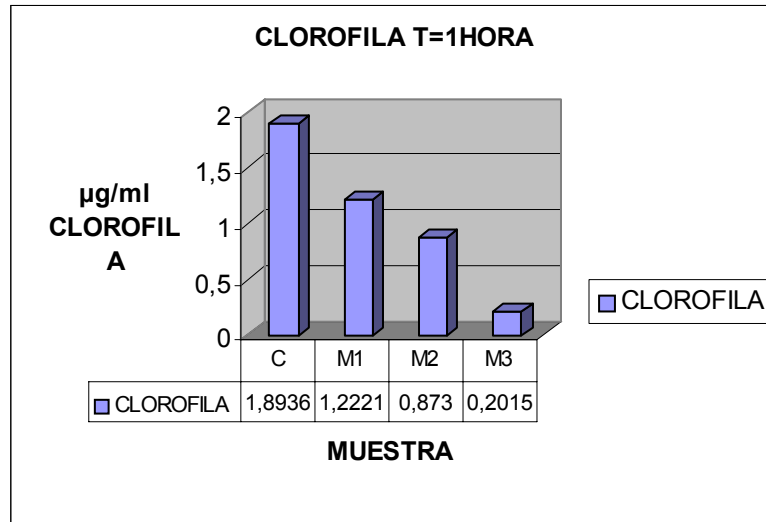
T = 5 MINUTOS:

A los 5 minutos de exposición de los cultivos a dosis crecientes de OX-VIRIN, observamos ya una notable disminución, tanto de clorofila como de peso húmedo, respecto del control. Este hecho se refleja también en el aspecto físico puesto que, transcurrido este tiempo, los cultivos tratados han adoptado ya un color amarillento, frente al color verde del control.



T = 1 HORA:

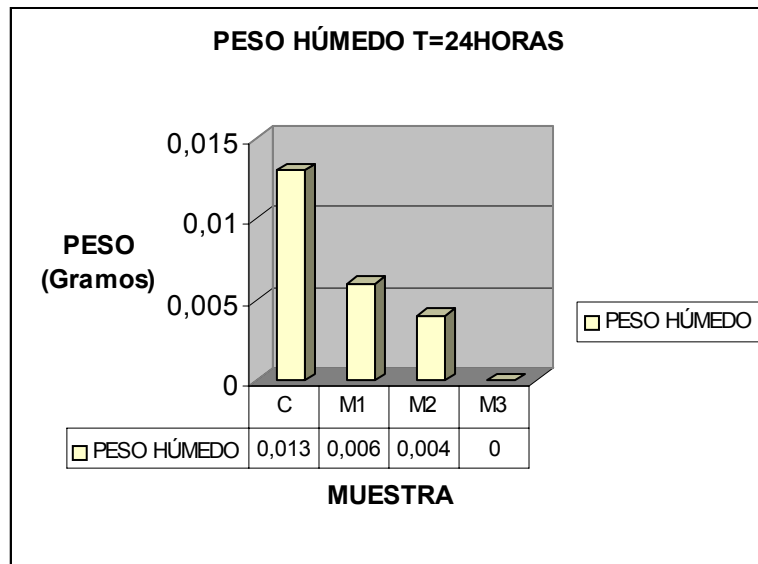
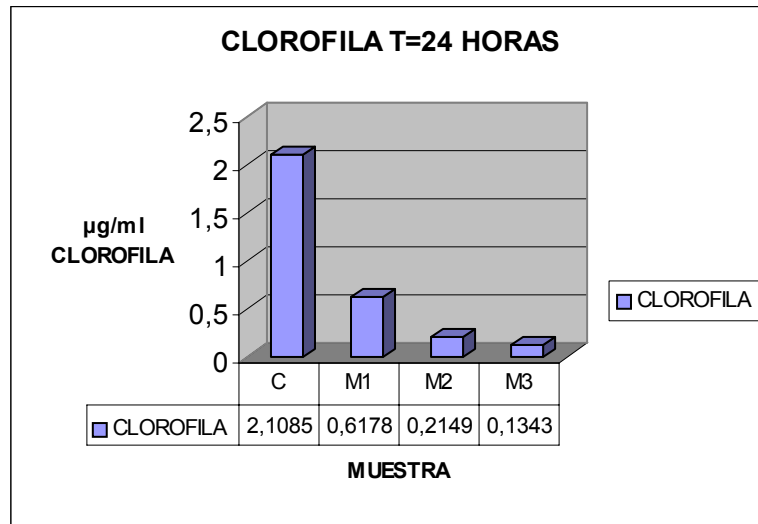
La disminución de los parámetros experimentales que son clorofila y peso húmedo se agrava aún más transcurrida una hora de incubación con el biocida. El aspecto de M1 y M2 sigue siendo de un color amarillo, mientras que M3 se torna anaranjado.



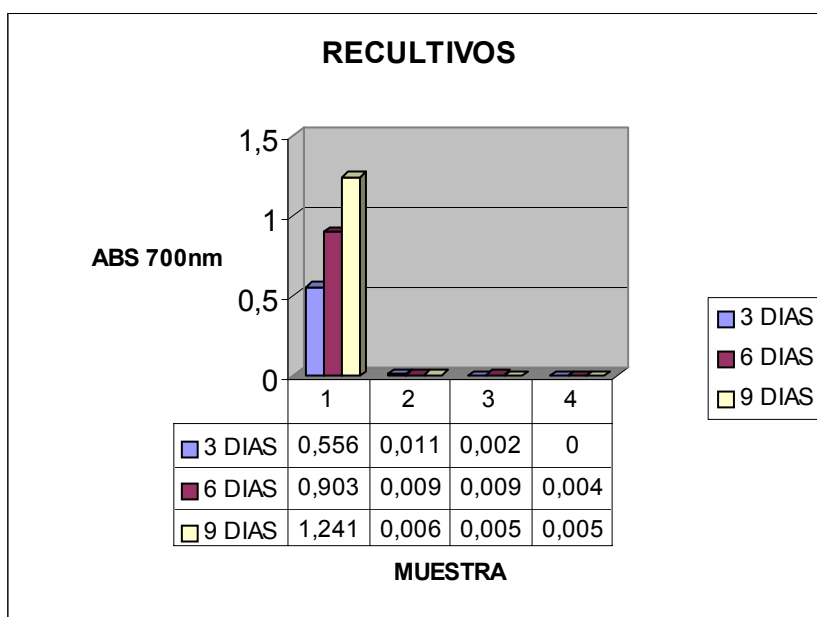
T = 24 HORAS:

A tiempo de exposición 24 horas la concentración de clorofila se hace muy pequeña respecto del control, mientras que el peso húmedo también se reduce notablemente haciéndose 0 para la concentración de 1% de OX-VIRIN. Estos datos junto con los de los recultivos muestran que las tres dosis de OX-VIRIN probadas van a ser letales para *Microcystis PCC 7005*.

El color de la muestra M1 es amarillo claro, mientras que M2 y M3 muestran un color blanco.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TRATADAS:



Los recultivos de las células tratadas no muestran absorbancia a 3, 6 y 9 días, en contraposición con el control que alcanza una absorbancia de 1,241. Esto nos indica que los cultivos van a ser inviables y ratifica que las dosis de 0,2%, 0,5% y 1% van a ser letales para *Microcystis PCC 7005*.

4.3.3. Efecto de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN sobre *Microcystis PCC 7005*

Absorbancia inicial del cultivo a 700nm = 0,271.

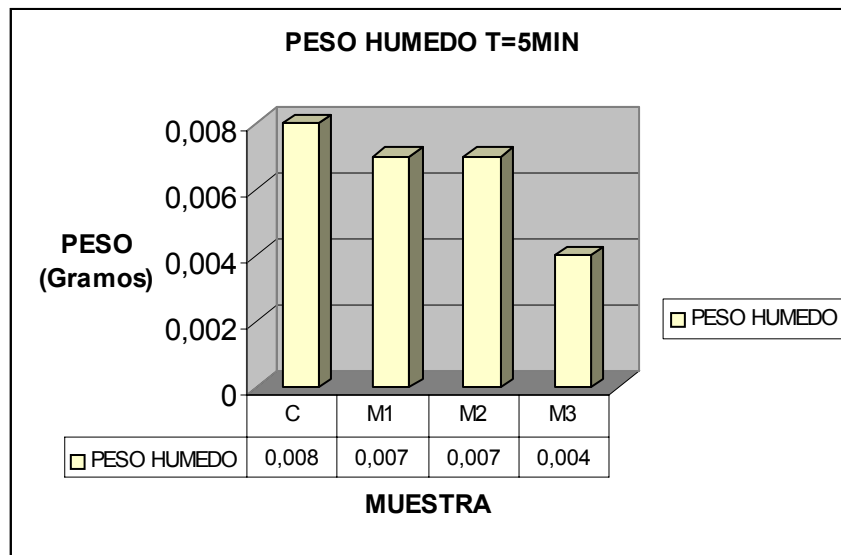
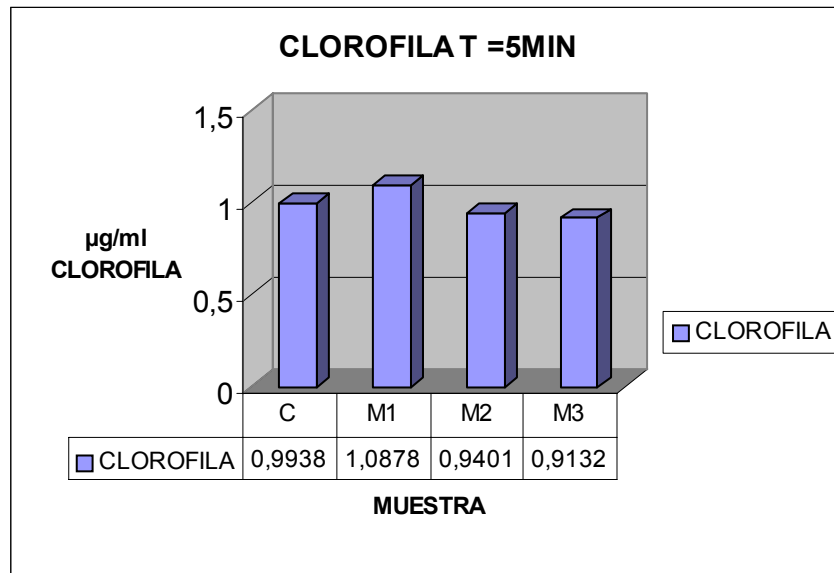
MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,003% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN (M1)
- 0,015% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN (M2)
- 0,5% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN (M3)

EVOLUCIÓN TEMPORAL:

T = 5 MINUTOS:

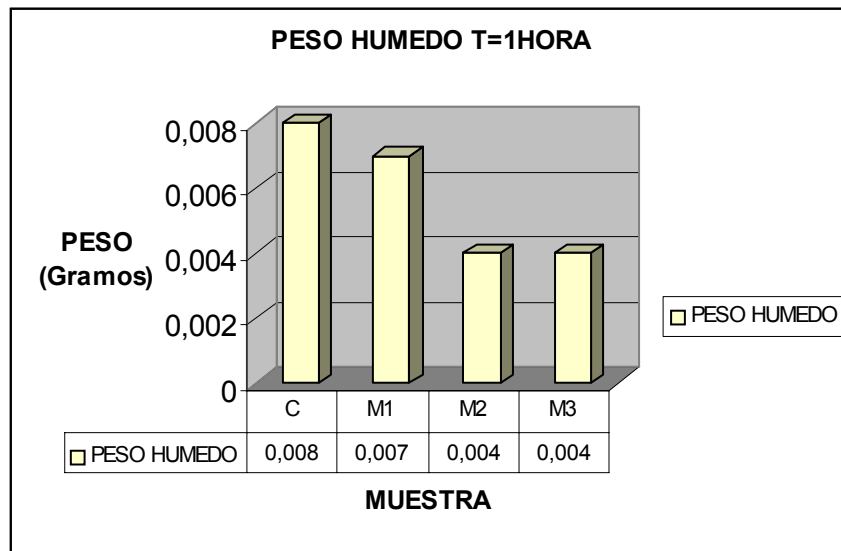
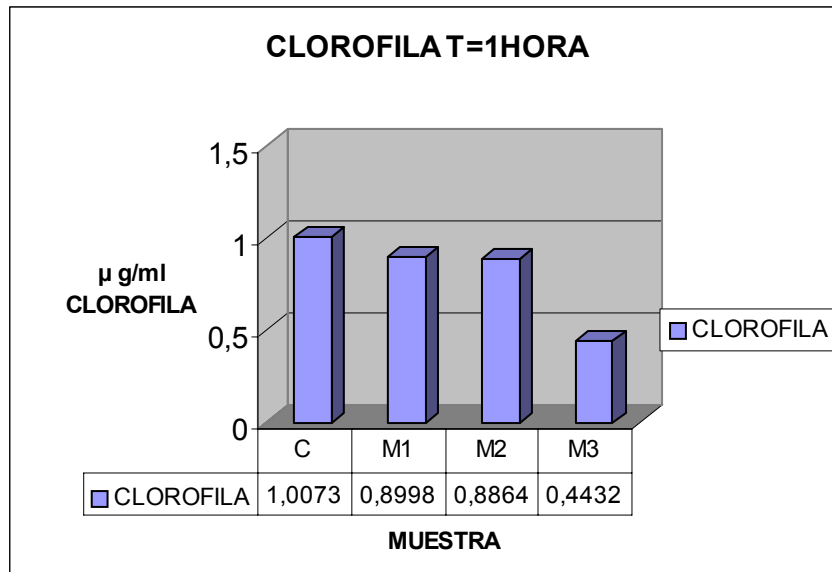
Después de este tiempo de exposición al biocida no existe mucha variación entre las muestras tratadas y el control, salvo en la dosis de 0,5% que ya se observa efecto en clorofila y peso húmedo. El aspecto no varía entre C, M1 y M2, pero M3 muestra un color amarillento.



T = 1 HORA:

La concentración de clorofila presenta ya una mayor disminución respecto al control, que se hace más acusada en la dosis mayor de biocida. El peso húmedo presenta una disminución gradual a medida que aumenta la dosis de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN.

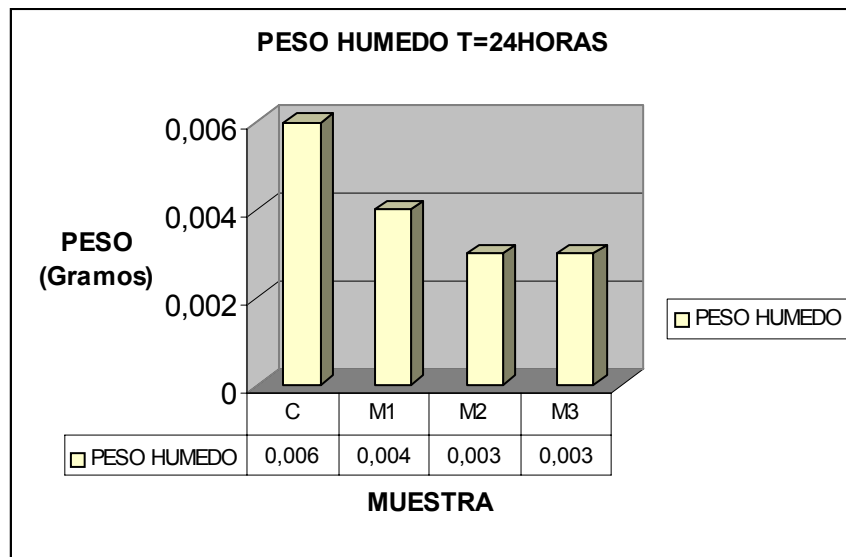
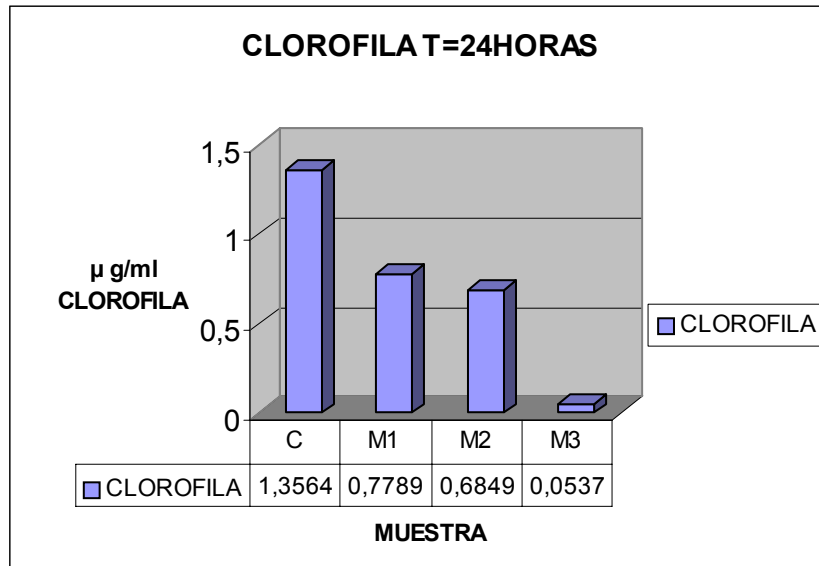
El control y la muestra de 0,003% presentan color verde, mientras que la muestra de 0,015% y 0,5% presentan color amarillo.



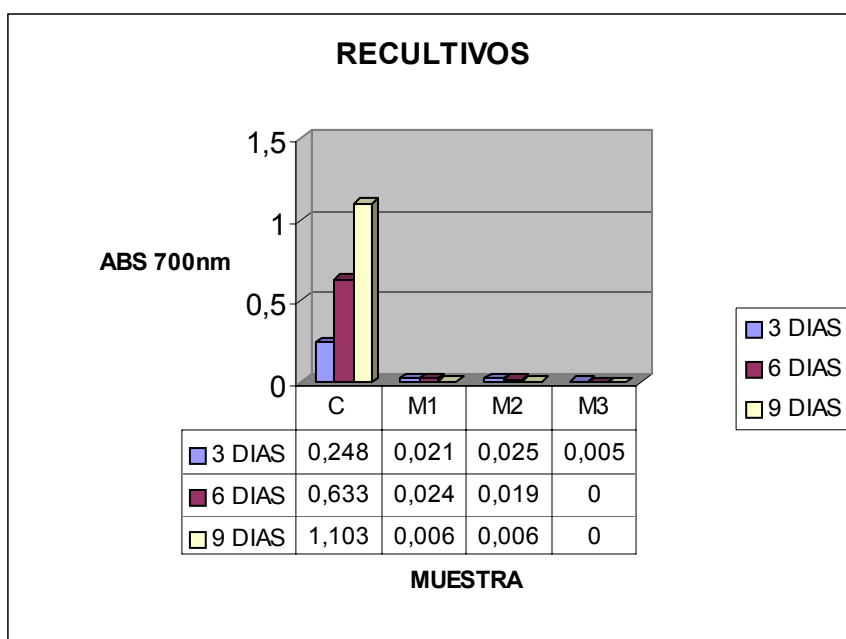
T = 24 HORAS:

Transcurridas 24 horas de exposición a OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN la concentración de clorofila disminuye a la mitad para M1 y M2, mientras que se hace 0 para M3. El peso húmedo disminuye en buen grado respecto del control.

M1 y M2 presentan un color amarillo y M3 blanco en contraposición al color verde del control.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS



Observamos que para las muestras tratadas no existe absorbancia a 700 nm durante los 9 días de recultivo. Estos datos, junto con los parámetros experimentales a tiempo 24 horas, nos hacen concluir que las dosis 0,003%; 0,015% y 0,5% de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN son letales para *Microcystis PCC 7005*.

4.3.4. Efecto de OX-AGUA sobre *Microcystis PCC 7005*

Absorbancia inicial del cultivo a 700 nm =0,305.

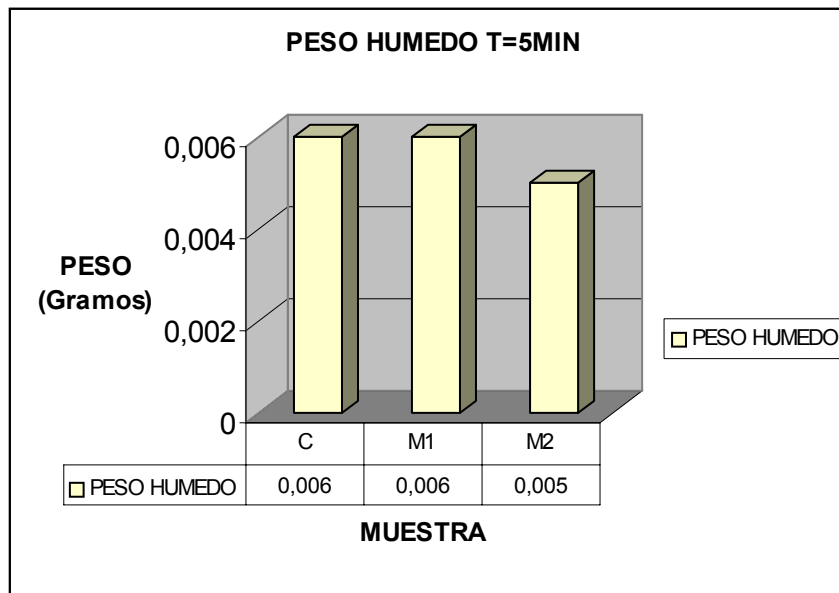
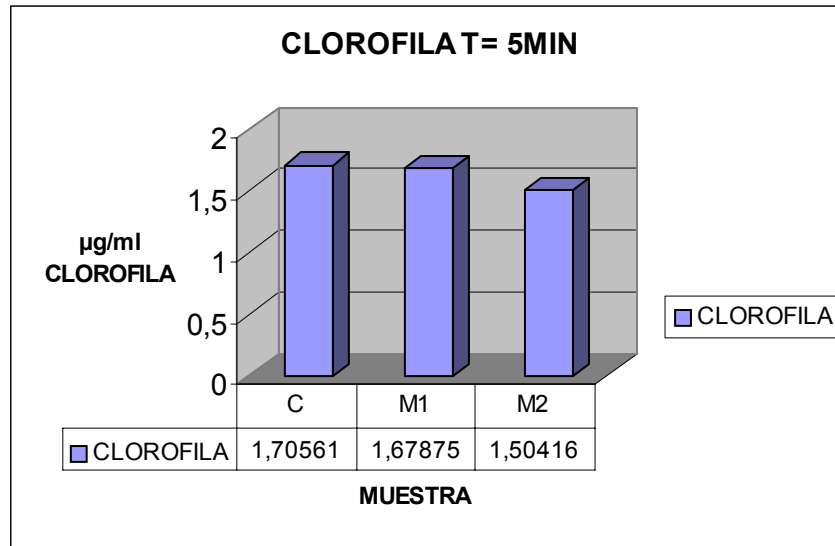
MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,001% OX-AGUA (M1)
- 3% OX-AGUA (M2)

EVOLUCIÓN TEMPORAL

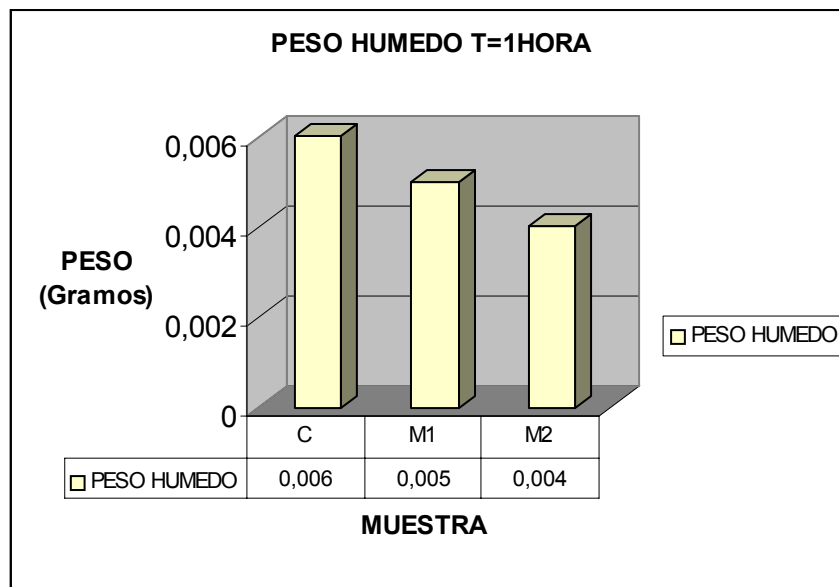
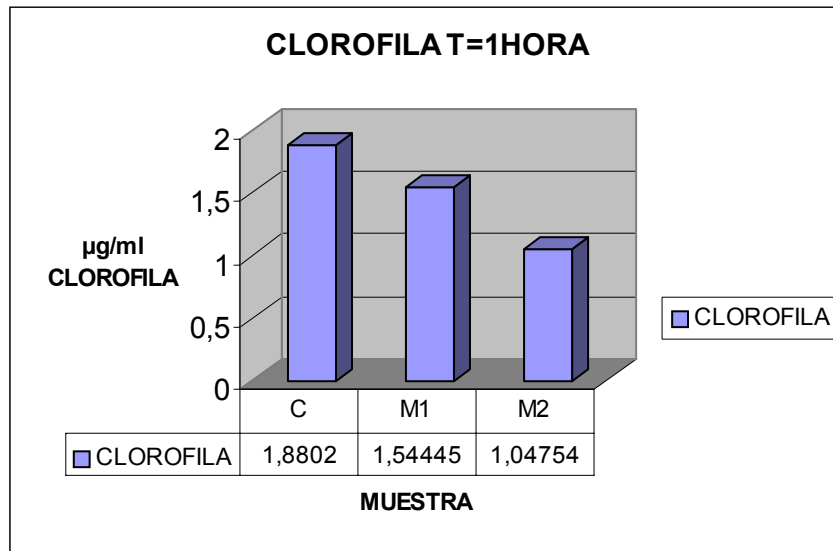
T = 5 MINUTOS:

No se observan muchas diferencias entre el control y la muestra que contiene un 0,001% de OX-AGUA, pero sí que se observa efecto en la que contiene 3% de OX-AGUA, donde disminuye ligeramente la concentración de clorofila y el peso húmedo. También existe una disminución del color respecto del control y M1.



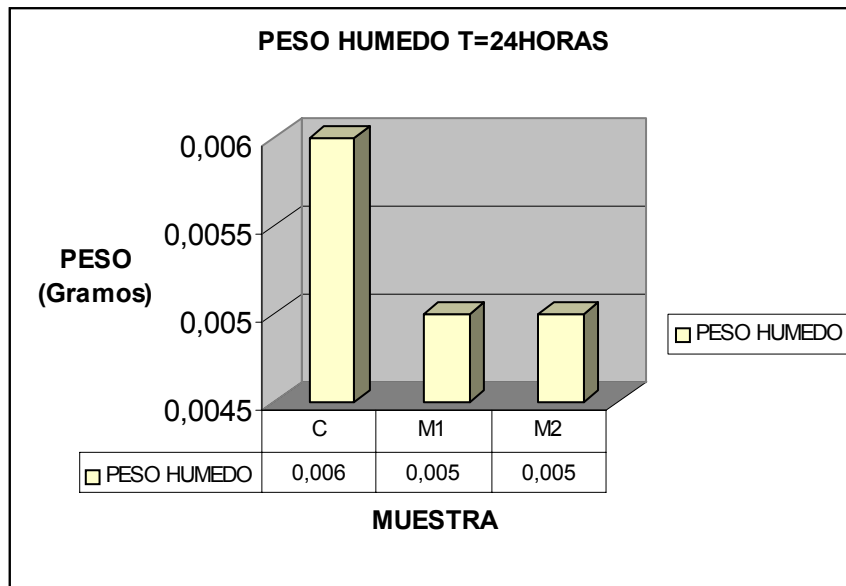
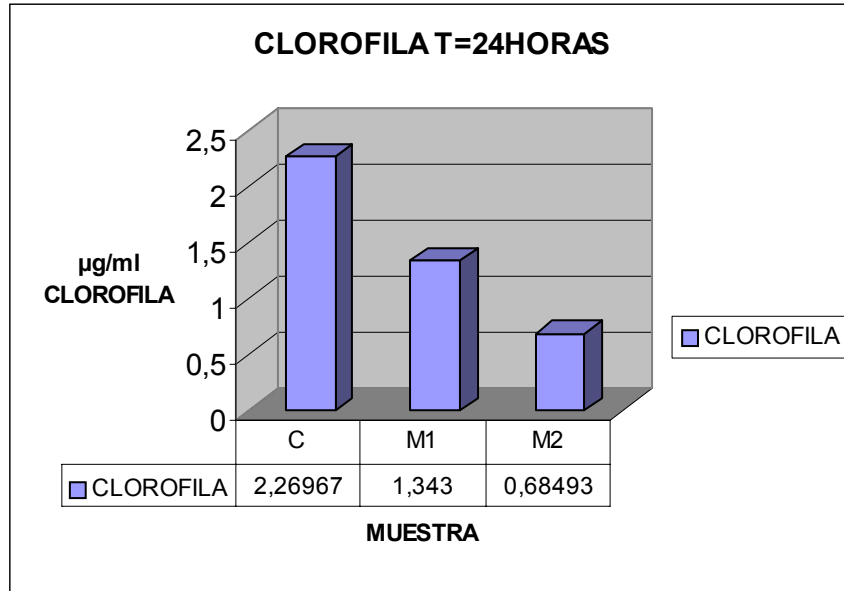
T = 1 HORA:

A tiempo de incubación 1 hora ya se observa también efecto sobre la muestra que contiene 0,001% de OX-AGUA. El control y M1 siguen manteniendo el color verde mientras que M2 ya tiene color amarillo.

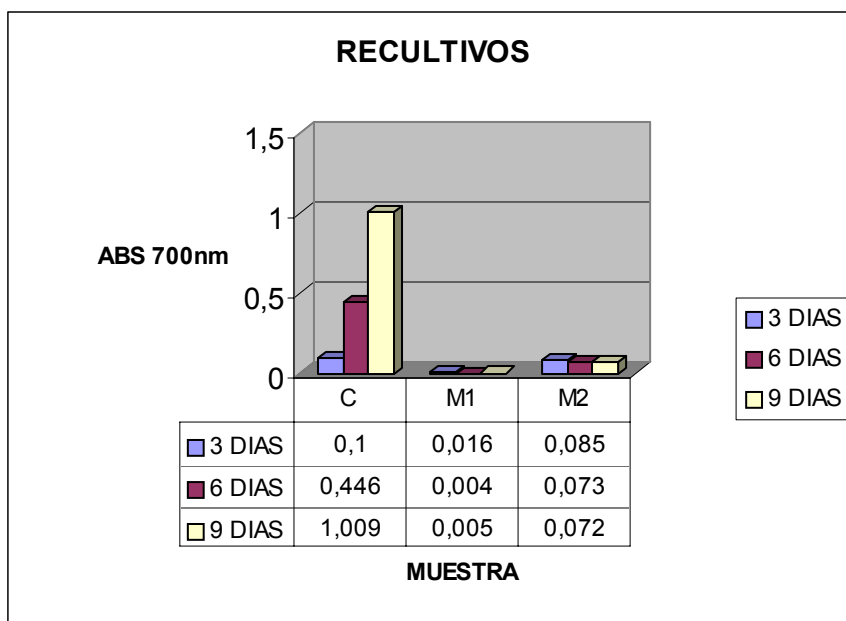


T = 24 HORAS

Tras 24 horas de exposición al biocida las muestras tratadas presentan un nivel muy inferior de clorofila y peso húmedo con respecto al de la muestra de control. Esto se complementa con que ambas muestras tratadas presentan un color amarillo. Estos datos, junto con los del recultivo, indican que las dosis de 0,001% y 3% de OX-AGUA van a ser letales para *Microcystis PCC 7005*.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TRATADAS



Al realizar el recultivo durante 3,6 y 9 días se aprecia que no hay aumento de absorbancia en las muestras tratadas y que los valores de absorbancia son muy inferiores a los del control. Los valores de absorbancia de M2 son algo elevados debido a que existía turbidez en la muestra pero no existían células viables en la misma. Por lo tanto ambas dosis de OX-AGUA van a ser letales para *Microcystis* PCC 7005.

4.4. EFECTOS SOBRE *CHLORELLA FUSCA*

4.4.1. Características de *Chlorella fusca*

Chlorella fusca es un alga verde unicelular sin flagelos ni ocelos ni vacuolas contráctiles; Es un alga filamentosa y carece de motilidad. En la naturaleza está ampliamente distribuida tanto en agua dulce como en agua salada, así como en el suelo. Es eucariota y cada célula contiene un único cloroplasto con o sin pirenoide y un único y diminuto núcleo. El protoplasto está rodeado de una pared celular constituida por celulosa con una capa de pectina amorfa externa. Esta cubierta es especialmente dura y por lo tanto la hace muy resistente.

La reproducción se efectúa por transformación del contenido de las células en esporas; Cada célula haploide se divide mediante mitosis dos o tres veces para dar lugar a cuatro u ocho células.

Los rasgos morfológicos parecen insuficientes para diferenciar las distintas especies de *Chlorella*. Sin embargo, atendiendo a sus características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas se pueden clasificar las distintas especies.

4.4.2. Efecto de OX-VIRIN sobre *Chlorella Fusca*

Absorbancia Inicial del cultivo a 700 nm = 0,306.

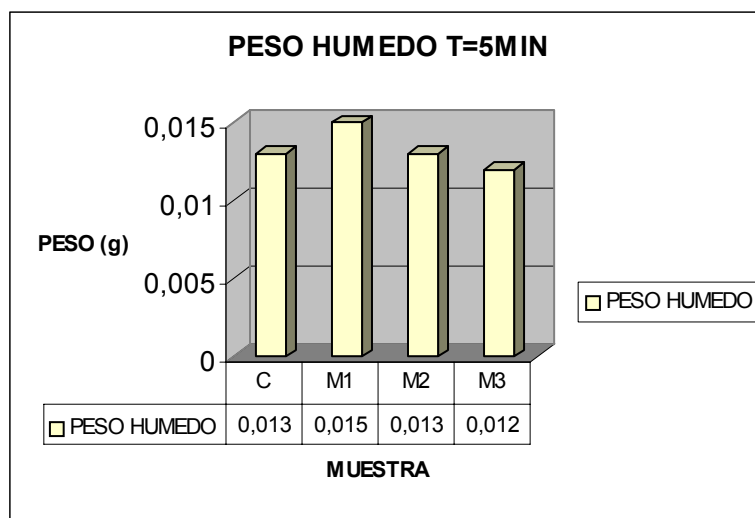
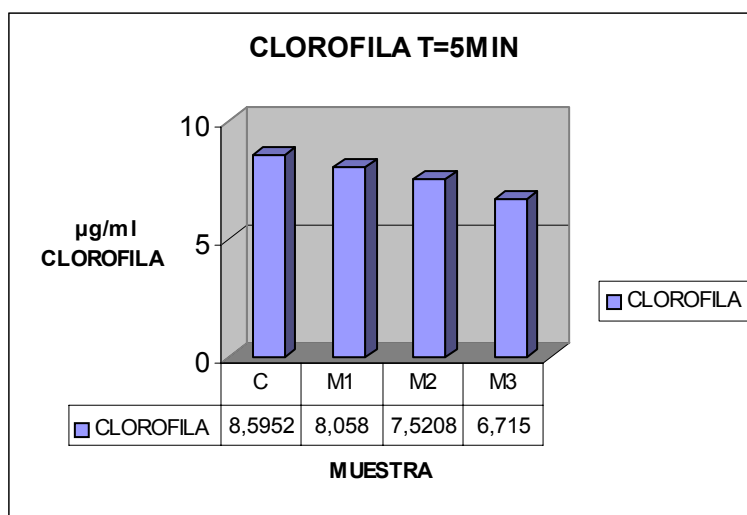
MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,2% OX-VIRIN (M1)
- 0,5% OX-VIRIN (M2)
- 1% OX-VIRIN (M3)

EVOLUCIÓN TEMPORAL:

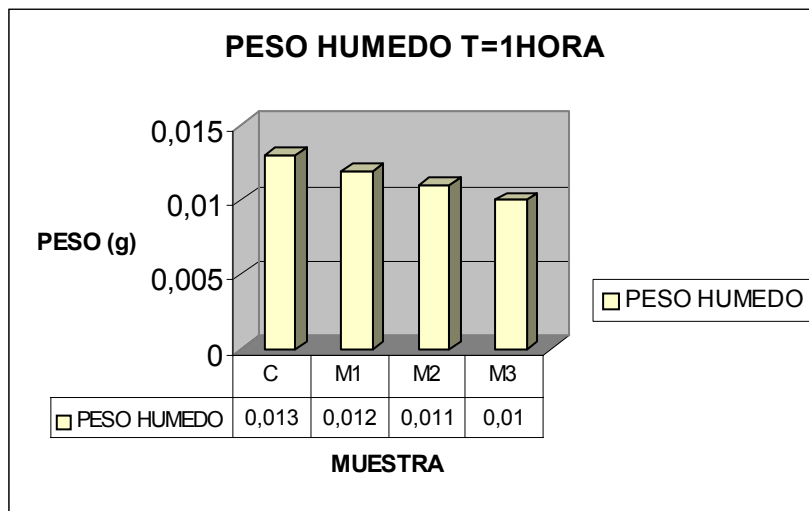
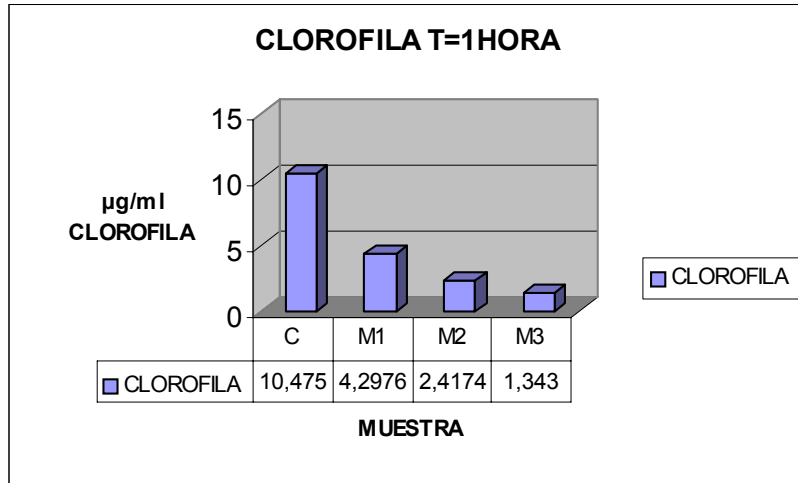
T = 5 MINUTOS:

A los 5 minutos se aprecia una ligera disminución del contenido de clorofila respecto del control, y el peso húmedo se mantiene más o menos constante. En cuanto al aspecto físico no se observan diferencias a simple vista entre las muestras tratadas y el control.



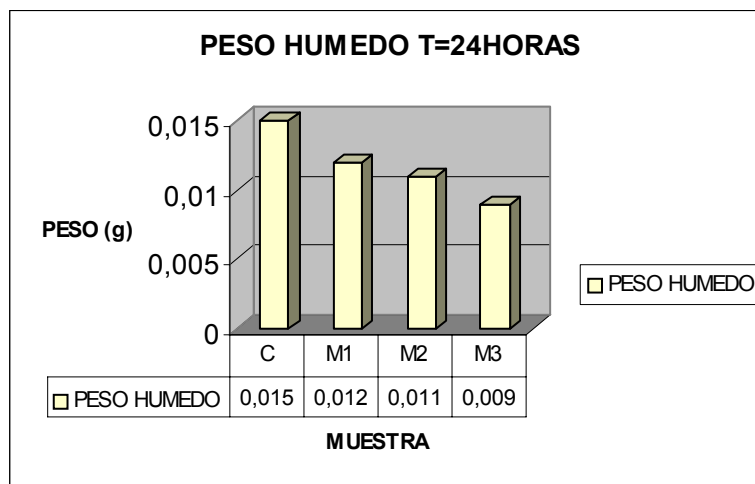
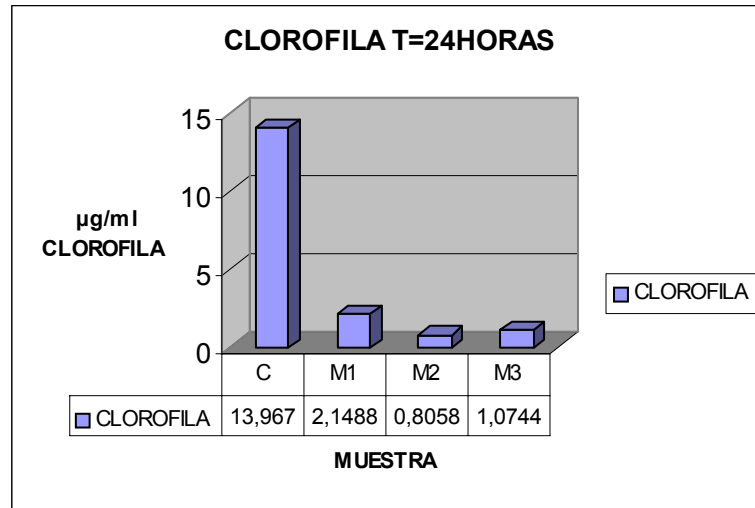
T = 1 HORA:

Tras 1 hora de exposición a OX-VIRIN los cultivos experimentan una notable disminución del contenido en clorofila respecto del control. El peso húmedo también disminuye gradualmente a medida que aumenta la concentración del biocida. El color de los cultivos tratados ya es verde amarillento, frente al color verde del control.

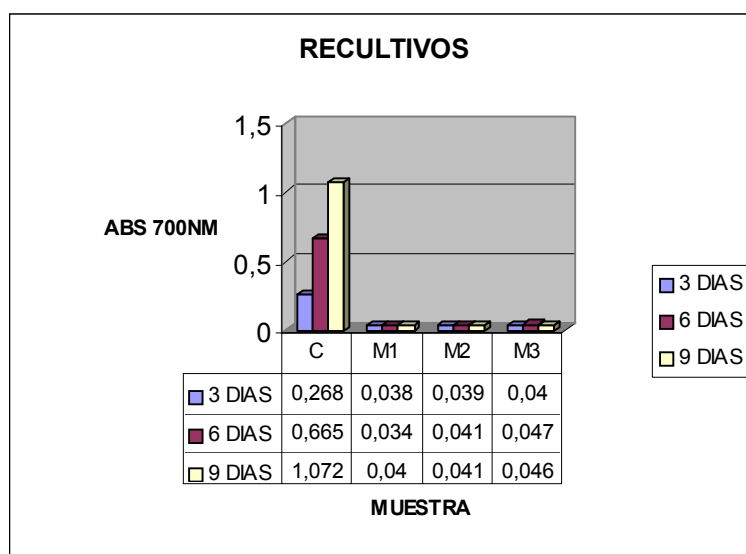


T = 24 HORAS:

La concentración de clorofila adquiere valores muy pequeños en las muestras tratadas y el peso húmedo disminuye de una forma notable frente al control. Estos hechos se reflejan en el aspecto físico de los cultivos, puesto que los cultivos tratados adquieren un color blanco frente al color verde del control. Los parámetros experimentales, aspecto físico y los datos de los recultivos nos hacen concluir que las dosis de 0,2%; 0,5% y 1% de OX-VIRIN son letales transcurridas 24 horas de exposición al biocida, para *Chlorella fusca*.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TRATADAS



En el gráfico se observa que durante los 9 días de recultivo de las muestras tratadas no existe aumento de absorbancia, y que el valor de absorbancia obtenida es muy inferior al valor de la muestra no tratada. Los valores de cierta absorbancia que se producen en las muestras tratadas son debidos a que en ellas existe turbidez, debida a los restos celulares. De los datos presentados se deduce que para las dosis probadas los cultivos van a ser inviables.

4.4.3. Efecto de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN sobre *Chlorella Fusca*

Absorbancia inicial del cultivo a 700 nm = 0,299.

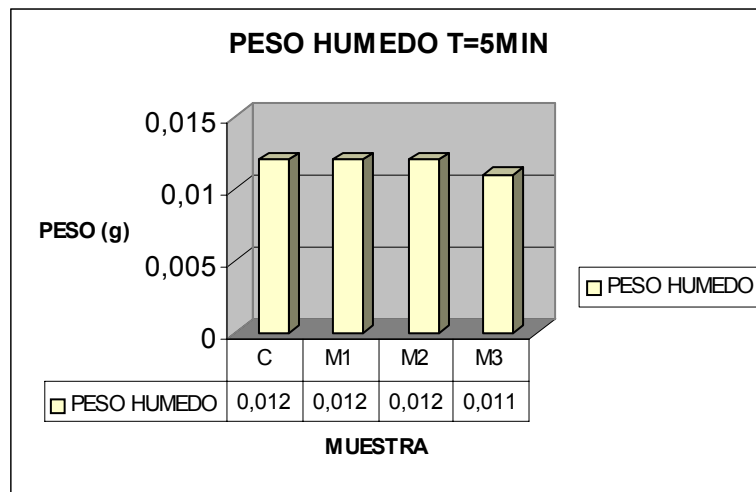
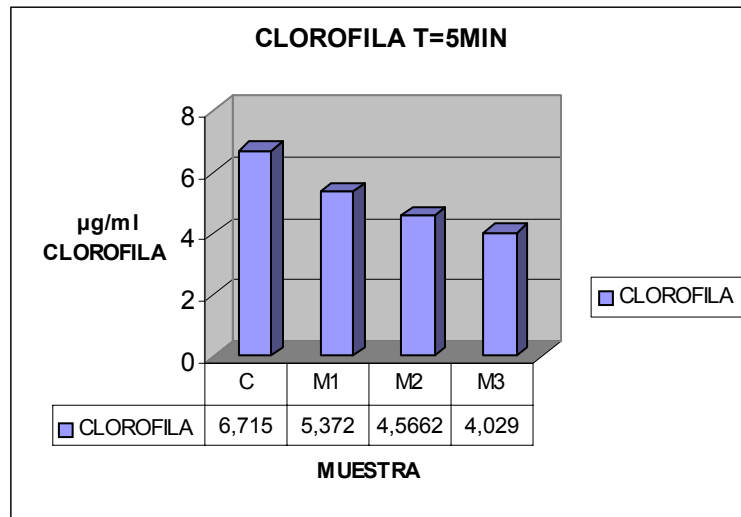
MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,003% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN
- 0,015% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN
- 0,5% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN

EVOLUCIÓN TEMPORAL:

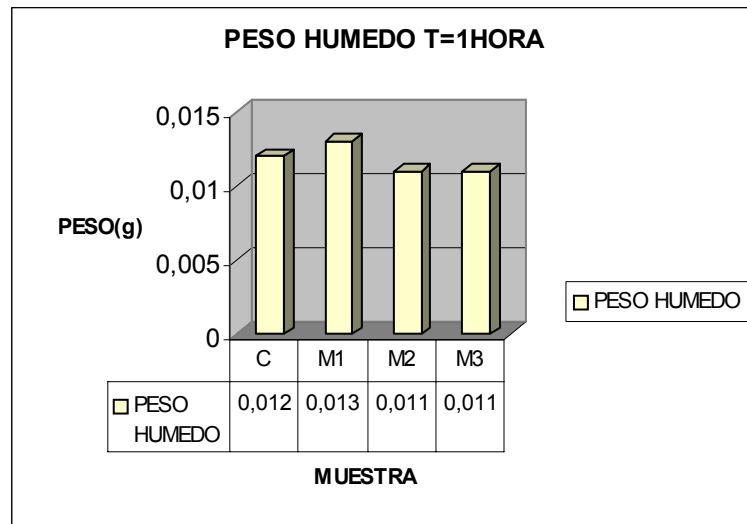
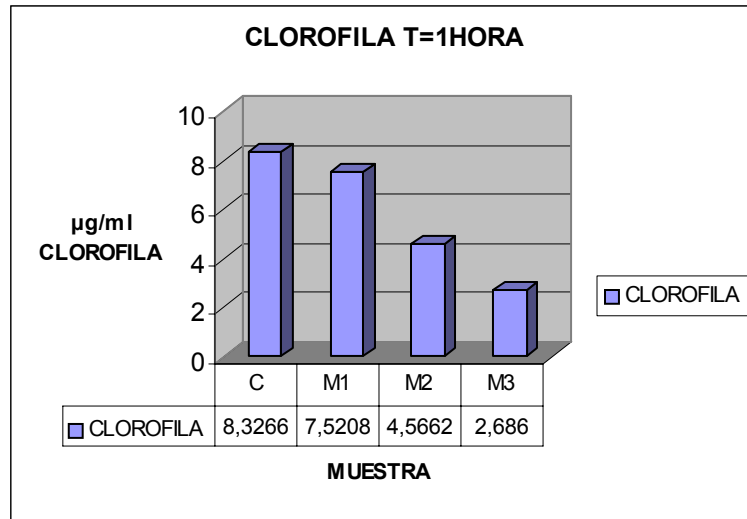
T = 5 MINUTOS:

La concentración de clorofila se ve disminuida en las muestras expuestas al OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN mientras que el peso húmedo se mantiene más o menos constante. En el aspecto físico no se aprecian apenas diferencias entre la muestra control y las tratadas.



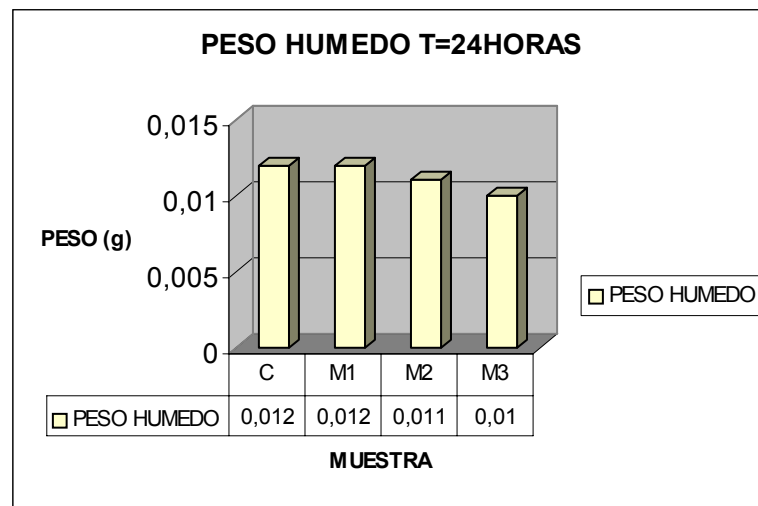
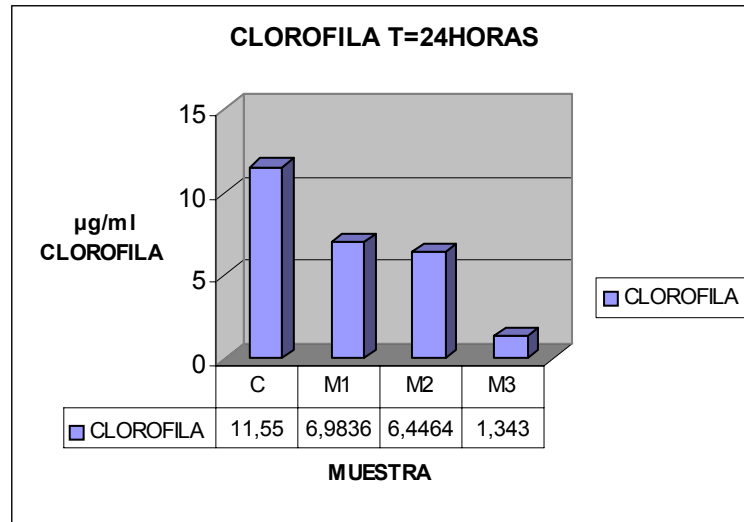
T = 1 HORA:

Las muestras incubadas durante 1 hora con el biocida presentan una disminución de clorofila, fundamentalmente la muestra que contiene 0,5 % de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN. El peso húmedo también disminuye para las dosis de 0,015% y 0,5%. La apariencia de los cultivos es similar a la del control para el caso de M1 y M2, mientras que M3 presenta ya un color verde amarillento.

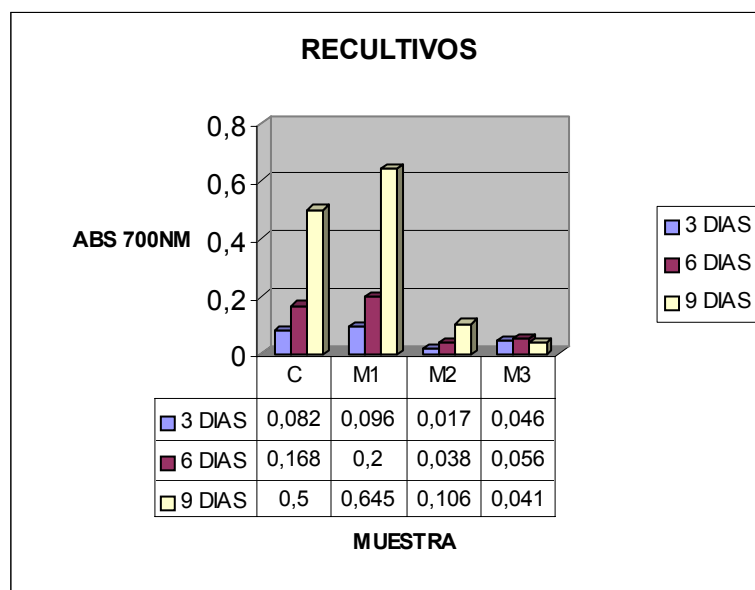


T = 24 HORAS:

El contenido en clorofila de las muestras M1 y M2 se reduce a la mitad mientras que en M3 se hace prácticamente 0. El peso húmedo es inferior en M2 y M3. Las muestras M1 y M2 mantienen el color verde, sin embargo M3 muestra color blanco amarillento. Estos datos, junto los de los recultivos, nos llevan a concluir que las dosis de 0,003% y 0,15% van a afectar a *Chlorella fusca*, pero no van a ser letales para ella, siendo la dosis de 0,5% la única dosis letal.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TRATADAS



En la gráfica se observa que la muestra tratada con 0,003% de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN crece de forma similar al control, por lo tanto no se va a ver afectada la viabilidad de *Chlorella fusca* por esta dosis de biocida. La muestra tratada con 0,015% de biocida si que va a ver afectada su viabilidad puesto que crece mucho más lento que el control, pero existen células viables en el cultivo que van creciendo a lo largo de los 9 días de recultivo. Por lo tanto la dosis de 0,015% no es letal para *Chlorella fusca*. Sin embargo la dosis de 0,5% si que es letal para *Chlorella fusca*, porque aunque exista algo de absorbancia esta se mantiene constante y es debida a la turbidez producida por los restos celulares.

4.4.4. Efecto de OX-AGUA sobre *Chlorella fusca*

Absorbancia inicial del cultivo a 700 nm = 0,334

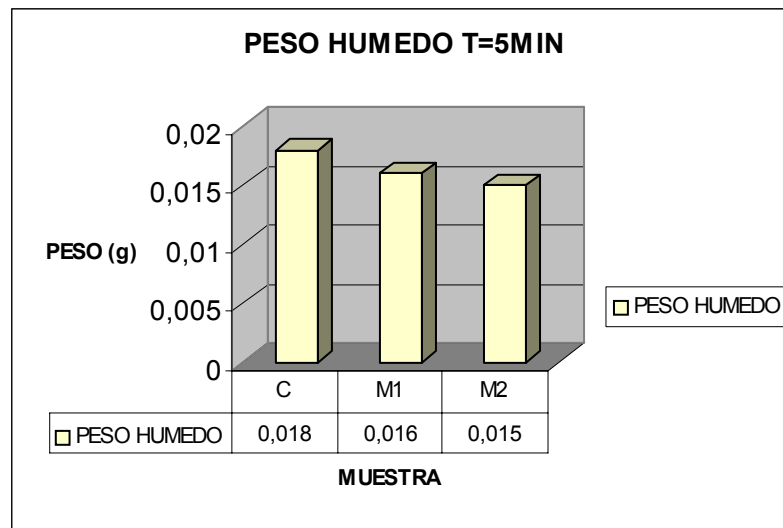
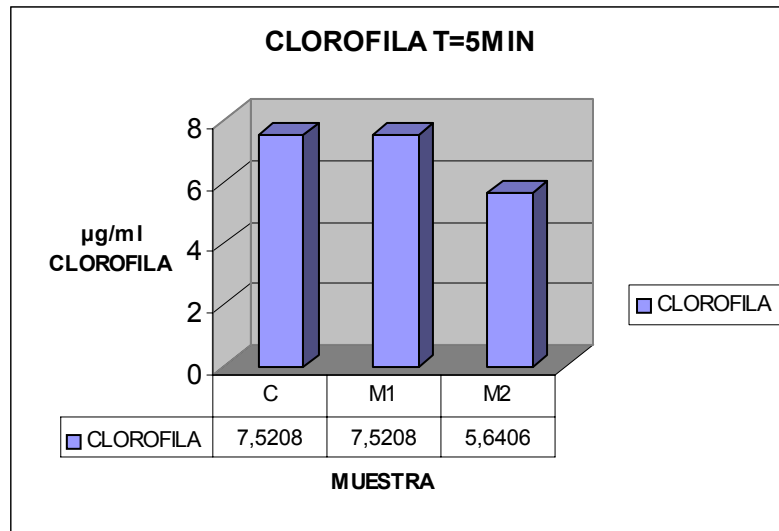
MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,001% OX-AGUA (M1)
- 3% OX-AGUA (M2)

EVOLUCIÓN TEMPORAL:

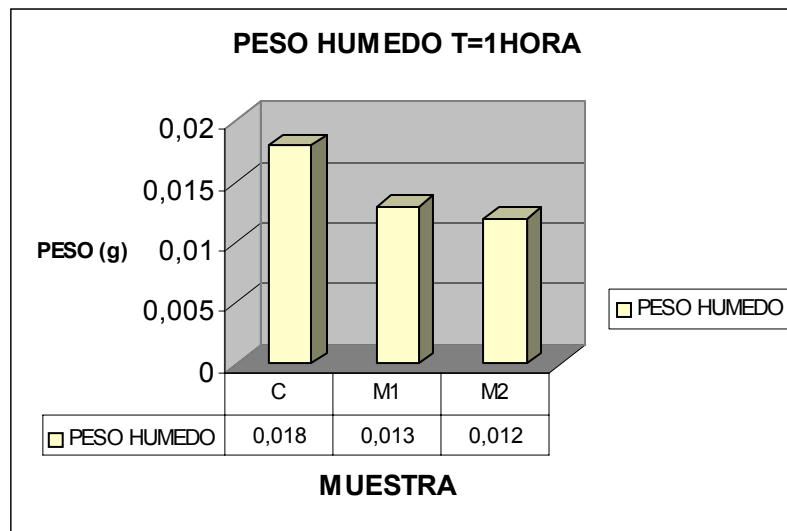
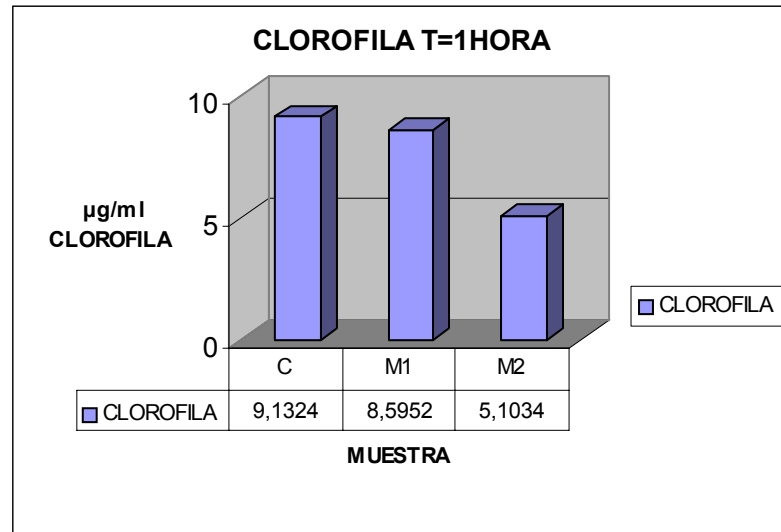
T = 5 MINUTOS:

A los 5 minutos de exposición no se observan grandes diferencias ni en los parámetros experimentales ni en el aspecto físico entre la muestra control y las muestras tratadas. M2 muestra una disminución de la concentración de clorofila y del peso húmedo, que se refleja en un color verde más blanquecino que el control.



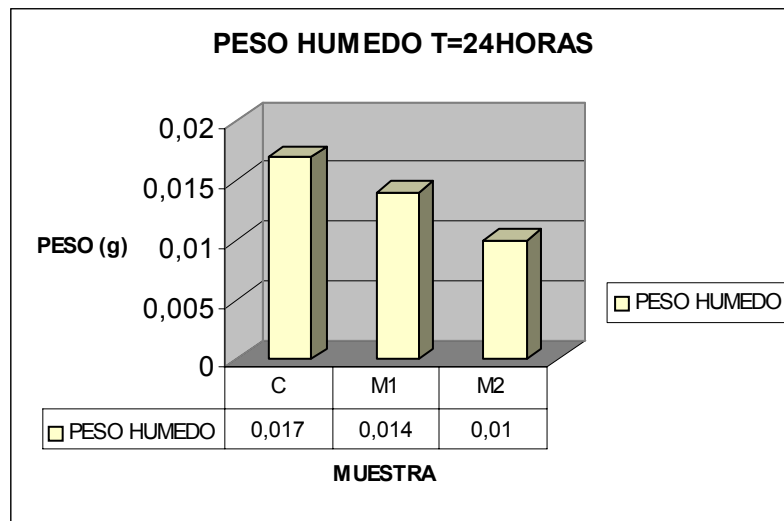
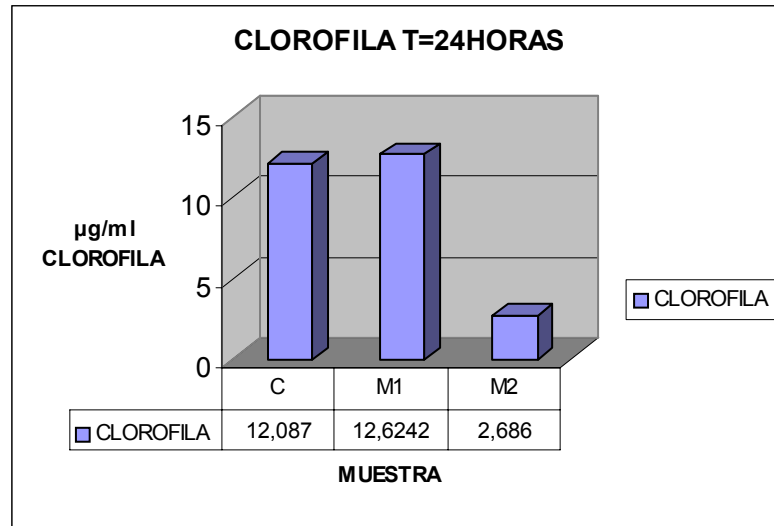
T = 1 HORA:

Transcurrida 1 hora de incubación se observan más diferencias entre las muestras tratadas y la de control. En la muestra M1 disminuye muy ligeramente la clorofila y el peso húmedo y en la muestra M2 se agravan las diferencias que existían a tiempo 5 minutos. M1 sigue manteniendo un color verde similar al del control mientras que M2 está ya casi blanco.

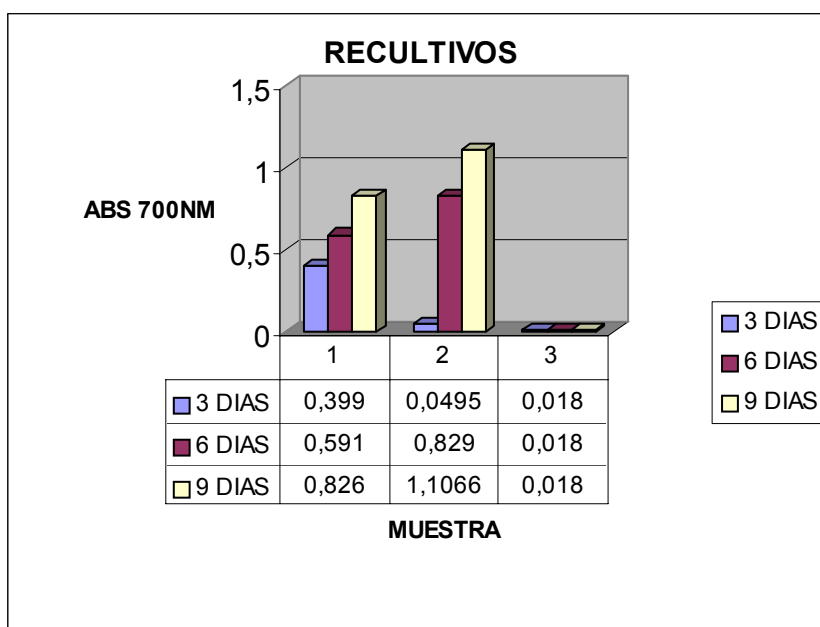


T = 24 HORAS:

Se observa que la clorofila no ha disminuido para M1, sino que se mantiene respecto al control y, aunque el peso húmedo sí que ha disminuido ligeramente, esta dosis no va a ser letal para *Chlorella fusca*, como se ratifica en los datos del recultivo. Sin embargo M2 tiene unos valores de clorofila y peso húmedo muy bajos y además presenta un color blanquecino. Estos datos, junto con los datos del recultivo, nos llevan a concluir que la dosis de 3% de OX-AGUA es letal para *Chlorella fusca*.



VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TRATADAS



El gráfico muestra claramente que la dosis de 0,001% no es letal para *Chlorella fusca*, mientras que la dosis de 3% consigue la inviabilidad total de las células y por tanto es letal para *Chlorella fusca*.

Sensibilidad de los organismos a los biocidas:

Todas las dosis probadas de OX-VIRIN, OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN y OX-AGUA son letales para *Microcystis* PCC 7005. Por lo tanto, este organismo va a ser el más sensible a los productos, de los tres organismos testados.

Todas las dosis probadas DE OX-VIRIN, OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN y OX-AGUA son letales para *Anabaena* PCC 7120, salvo la dosis de 0,003% de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN y la dosis de 0,001% de OX-AGUA.

Todas las dosis probadas de OX-VIRIN, OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN y OX-AGUA son letales para *Chlorella fusca*, salvo la dosis de 0,003% y 0,015% de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN y la dosis de 0,001% de OX-AGUA. Por lo tanto, este organismo va a ser el más resistente a los productos, de los tres organismos testados.

Efectividad de los productos:

OX-VIRIN es el producto más eficaz de los tres, puesto que va a ser letal a las tres dosis probadas para los tres organismos testados.

OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN va a ser menos eficaz, puesto que hay una dosis (0,003%) que no es efectiva en *Anabaena* y dos dosis (0,003% y 0,015%) que no son efectivas en *Chlorella*.

OX-AGUA va a ser efectivo frente a los tres organismos testados, salvo la dosis de 0,001%, que no es efectiva ni en *Anabaena* ni en *Chlorella*.

Tabla resumen:

OX-VIRIN (%)	<i>Anabaena</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Chlorella</i>
0,2	letal	letal	letal
0,5	letal	letal	letal
1	letal	letal	letal
OX-AIRE (%)			
0,003	-	letal	-
0,015	letal	letal	-
0,5	letal	letal	letal
OX-AGUA (%)			
0,001	-	letal	-
3	letal	letal	letal

4.5. FOTOGRAFÍAS

El aspecto físico de los cultivos de los organismos estudiados va a ser indicativo de la viabilidad de los mismos. El color típico de los tres tipos de organismos estudiados es verde en distintas tonalidades. Cuando los cultivos pierden este color tan característico y adoptan colores amarillentos o blancos es síntoma de que los cultivos están en fase de muerte.

Basándonos en este hecho hemos incluido fotografías en el informe, con la intención de que visualmente se pudiese observar la eficacia de los productos testados. Se ha elegido un organismo distinto con cada producto, para tener un ejemplo representativo de cada biocida.

Las fotografías se han tomado a 5 minutos, 1 hora y 24 horas de exposición al biocida.

4.5.1. Efecto de OX-VIRIN sobre *Anabaena* PCC 7120

MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,2% OX-VIRIN (M1)
- 0,5% OX-VIRIN (M2)
- 1% OX-VIRIN (M3).

T = 5 MINUTOS



T = 1 HORA



T = 24 HORAS



En las fotografías se muestra que a 5 minutos existe ya una pequeña diferencia de color entre las muestras tratadas y la no tratada. Esta diferencia se agrava a 1 hora de exposición. Y tras 24 horas de exposición, las muestras tratadas presentan colores amarillo y blanco, indicativos de la inviabilidad de las mismas. Esto refleja que a 5 minutos y 1 hora los cultivos están afectados, pero es a 24 horas cuando la inviabilidad de los cultivos es total. Las tres dosis probadas son letales para *Anabaena* PCC7120.

4.5.2. Efecto de OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN sobre *Microcystis* PCC 7005

MUESTRAS

- Control (C);
- 0,003% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN (M1)
- 0,015% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN (M2)
- 0,5% OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN.

T = 5 MINUTOS



T = 1 HORA



T = 24 HORAS



En las fotografías se observa que a 5 minutos ya existe diferencia de color con el control, sobre todo la muestra con mayor dosis de biocida. A tiempo 1 hora ya se observan más diferencias con respecto al control. Y a 24 horas los tres cultivos tratados adquieren colores amarillos y blancos indicativos de la inviabilidad de los mismos. Las tres dosis probadas son letales para *Microcystis* PCC 7005.

4.5.3. Efecto de OX-AGUA sobre *Chlorella fusca*

MUESTRAS:

- Control (C)
- 0,001% OX-AGUA (M1)
- 3% OX-AGUA (M2).

T = 5 minutos



T = 1 HORA



T = 24 HORAS



A tiempo 5 minutos y 1 hora se aprecia una ligera disminución del color de la muestra que contiene la dosis de 3% de OX-AGUA. Y a 24 horas se observa que ese cultivo ha adquirido un color blanquecino indicativo de la inviabilidad del mismo. Sin embargo vemos como el cultivo que está expuesto a la dosis de 0,001% no varía su color respecto al control, el cultivo es viable. Por lo tanto la dosis de 3% es letal y la dosis de 0,001% no es letal para *Chlorella fusca*.

5. EFECTO DE OX-VIRIN SOBRE MICROCISTINA

5.1 INTRODUCCIÓN

Trabajos previos han demostrado que productos basados en peróxidos pueden destruir de forma muy eficaz células del género *Microcystis*. Este método puede resultar una medida preventiva interesante en determinados usos pero, paradójicamente, podría darse el caso de implicar mayor liberación de microcistinas al medio al lisar las células. Los agentes oxidantes utilizados están optimizados para su comercialización de forma que pueden controlar el crecimiento de microorganismos de forma muy eficaz con un mínimo riesgo ecológico.

En este trabajo se estudia el efecto de distintas dosis de oxidantes de la gama comercial OX-VIRIN sobre la microcistina LR.

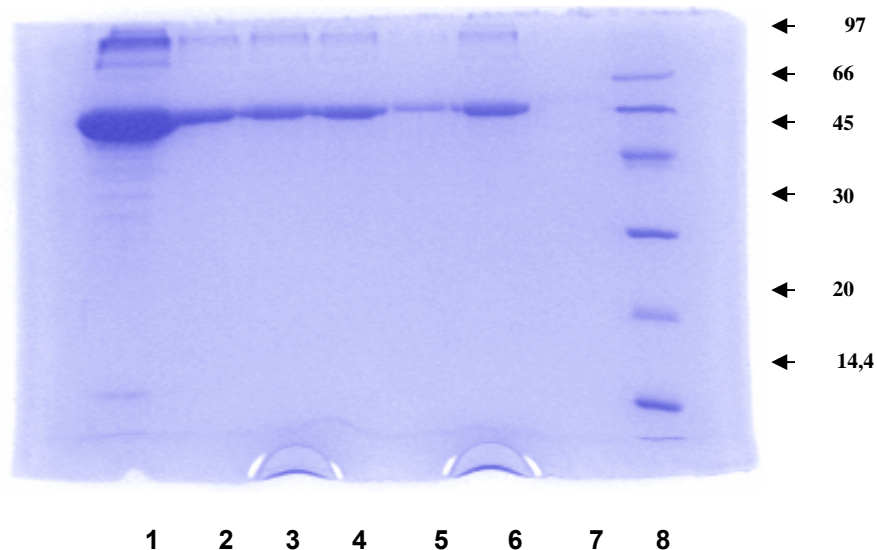
5.2. RESULTADOS

5.2.1. Efecto de OX-VIRIN sobre albúmina bovina

Se llevó a cabo una prueba preliminar del efecto oxidante sobre albúmina comercial, un polipéptido de alto peso molecular, con unas 100 veces más aminoácidos que la microcistina. La concentración utilizada fue también extremadamente alta, 2 g/l. Esto pretendía poner de manifiesto la capacidad oxidante del peróxido en una situación extrema.

Una disolución de 2 mg/ml de albúmina bovina se sometió a distintas dosis de OX-VIRIN durante distintos tiempos. Se probaron tres dosis (0,2%, 0,5% y 1%) a dos tiempos (1 hora y 24 horas).

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% para valorar la destrucción de la proteína.



1- Control (albúmina 2 mg/ml sin OX-VIRIN)

2- 0,2% OX-VIRIN t = 1 hora

3- 0,2% OX-VIRIN t = 24 horas

4- 0,5% OX-VIRIN t = 1 hora

5- 0,5% OX-VIRIN t = 24 horas

6- 1% OX-VIRIN t = 1 hora

7- 1% OX-VIRIN t=24 horas

8- Marcador de pesos moleculares

Se observa que a cualquier dosis la albúmina se ve afectada, y a la dosis 0,2% la proteína disminuye la banda, tanto a 1 hora como a 24 horas. Utilizando 0,5% y tiempo 24 horas la banda disminuye ostensiblemente. Con dosis de 1% y tiempo 24 horas desaparece la banda por completo. Esto confirma que la albúmina se ve afectada por el OX-VIRIN, siendo necesario un tratamiento de 24 horas y una dosis del 1% para su desaparición. No se observan subproductos de menor peso molecular, aunque esta técnica es inapropiada para detectar péptidos menores de unos 6 kDa.

Los resultados obtenidos indican que la microcistina, con solo 7 aminoácidos, y a una concentración en medios naturales mucho menores, puede ser susceptible de destrucción utilizando OX-VIRIN.

5.2.2. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR

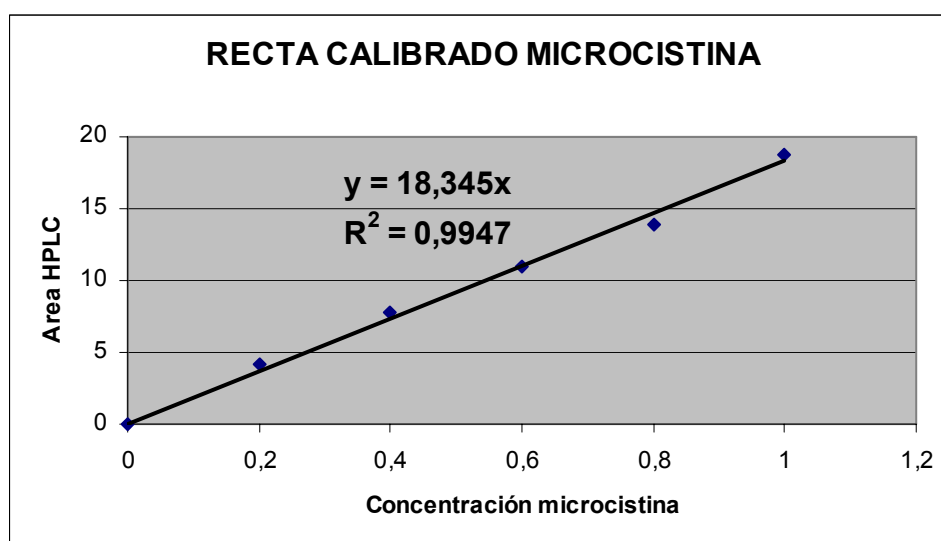
5.2.2.1. Determinación de microcistina por HPLC

Disoluciones de microcistina LR de concentración $1\mu\text{g/ml}$ (dosis mil veces mayores a la recomendada como máxima por la legislación y que muy raramente se encuentra en medios naturales) se sometieron a distintas dosis de OX-VIRIN (0,5%, 1%, 3%) y a distintos tiempos de incubación (1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas). Los productos obtenidos se analizaron por HPLC para determinar la cantidad de microcistina remanente tras el tratamiento. El peróxido residual se valoró para todas las dosis y para todos los tiempos mediante las tiras colorimétricas.

5.2.2.1.1. Recta de calibrado

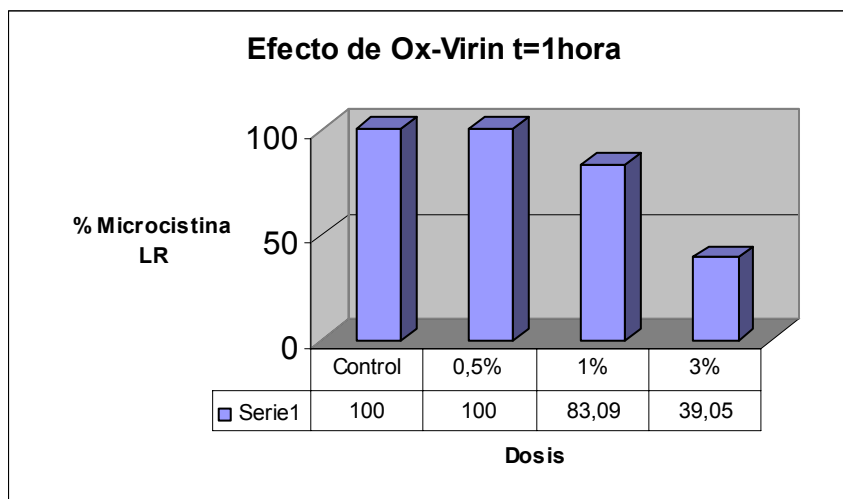
Se prepararon disoluciones de $0,2\mu\text{g/ml}$, $0,4\mu\text{g/ml}$, $0,6\mu\text{g/ml}$, $0,8\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ de microcistina LR y se aplicaron al HPLC para hacer una recta de calibrado, en la cual se relaciona el área del pico del cromatograma con la concentración de microcistina (Fig 1). Con las condiciones descritas, la microcistina pura exhibía un tiempo de retención de 25 minutos. Se llevó a cabo un control con OX-VIRIN para detectar posibles picos debidos a componentes del producto comercial.

La columna y el sistema de solventes empleado nos han permitido llegar hasta un límite de detección de $0,1\mu\text{g/ml}$.

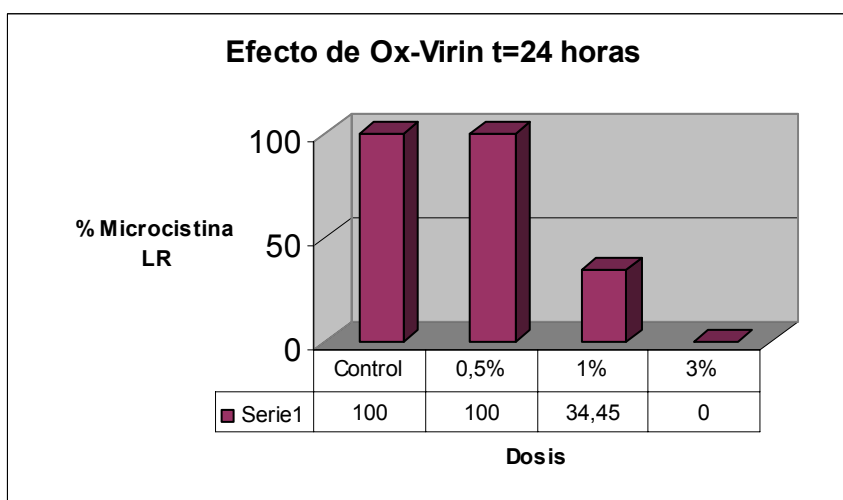


5.2.2.1.2. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR tras 1 hora de tratamiento

Tras una hora, los resultados obtenidos indican que con ninguna de las tres dosis se había logrado la destrucción total de la microcistina. En el caso del 3%, la más afectada, todavía se observa un 39,05% de la microcistina intacta.

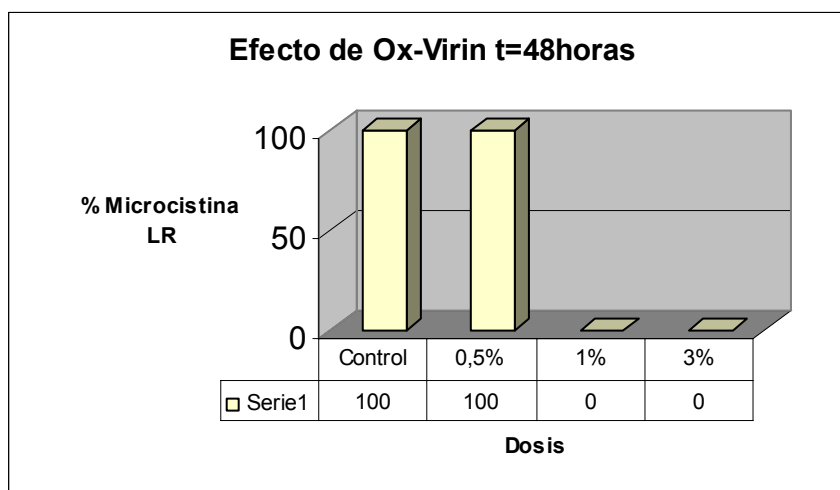


5.2.2.1.3. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR en 24 horas de tratamiento



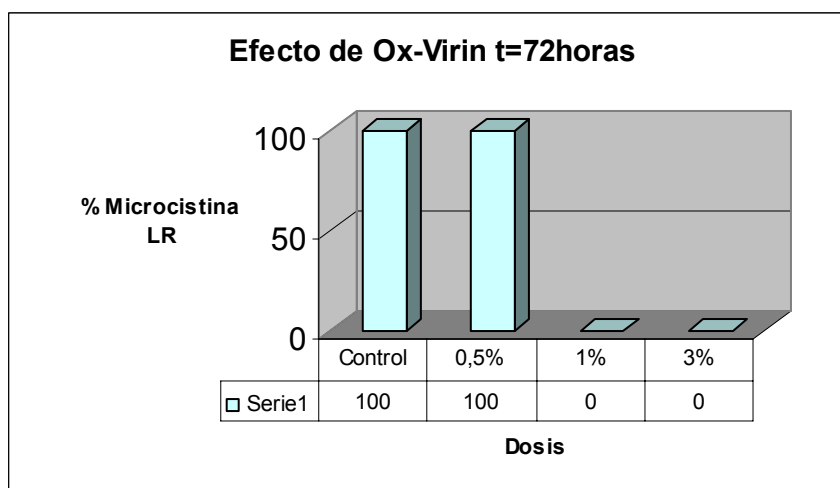
Tras 24 horas, se observa que dosis del 3% han destruido totalmente la microcistina, si bien en el cromatograma se ve la aparición de otros picos que deben de corresponden a moléculas modificadas o fragmentadas de microcistina. En el caso del 1% del peróxido, la destrucción fue del 34,45%

5.2.2.1.4. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR en 48 horas de tratamiento



Tras 48 de tratamiento, tanto las dosis del 1% como del 3% han resultado eficaces, y se había destruido toda la microcistina. Sorprendentemente, una dosis de 0.5%, únicamente la mitad de la de 1%, mantenía la microcistina prácticamente en el nivel del control. Como ocurría en el caso del tratamiento con un 3% durante 24 horas, el cromatograma obtenido mostraba la aparición de otros picos con distinto tiempo de retención, que corresponderían a productos de degradación de la microcistina.

5.2.2.1.5 Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina LR a 72 horas de tratamiento



Tras 72 horas de tratamiento no se observan cambios en la cinética de degradación de la microcistina, y los valores obtenidos son análogos a los de 48 horas de tratamiento, incluida la dosis menor testada, 0.5%.

Los cromatogramas de las dosis del 1% y el 3% sí que presentaban cambios y los productos de degradación han seguido oxidándose, dando lugar a nuevos subproductos.

5.2.2.2 Determinación de microcistina por espectrometría de masas

Se prepararon cinco muestras para ser enviadas al Servicio de Espectroscopia de Masas de la Universidad de Barcelona. Las muestras fueron las siguientes:

1. Control: Microcistina LR
2. Microcistina LR + 1% OX-VIRIN
3. Microcistina LR + 3% OX-VIRIN
4. 1% OX-VIRIN
5. 3% OX-VIRIN

La muestra 1 sería el control, es decir, la microcistina sin OX-VIRIN; las muestras 2 y 3 son la microcistina pero con el producto en dos dosis distintas 1% y 3% y neutralizadas con NaOH y catalasa después de 48 horas de incubación con OX-VIRIN, y las muestras 4 y 5 son muestras que contienen exactamente lo mismo que las muestras 2 y 3 pero que no tienen microcistina.

Los resultados de los análisis fueron los siguientes:

Los valores marcados en azul corresponden a productos presentes en los blancos (1% OX-VIRIN y 3% OX-VIRIN) y los marcados en rojo corresponden a la microcistina LR.

- 1- Control: Microcistina LR

Detección en	UV (Tr)	TIC (Tr)	M/z
	16.00	16.02	996.1
	-	17.28	279.3

- 2- Microcistina LR + 1% OX-VIRIN

Detección en	UV (Tr)	TIC (Tr)	M/z
	9.22	9.24	453.6
	12.80	12.87	1030.0
	13.10	13.12	1030.0
	13.40	13.44	1030.30
	13.67	13.71	1030.30
	-	13.92	1030.30
	14.22	14.25	1047.0
	-	15.51	1001.0
	-	15.90	359.3
	16.12	16.17	996.0

Microcistina LR + 3% OX-VIRIN

Detección en	UV (Tr)	TIC (Tr)	M/z
	9.22	9.24	453.6
	-	11.09	679.8
	12.78	12.80	1030.0
	-	13.11	1030.0
	13.40	13.44	1030.30
	13.90	13.92	1030.30
	-	15.57	1001.0
	-	15.87	359.3
	-	16.53	356.4
	-	17.25	279.2
	-	16.50	996.0

3- 1% OX-VIRIN

Detección en	UV (Tr)	TIC (Tr)	M/z
	-	9.20	453.5
	-	11.06	679.7
	-	15.39	568.5
	-	15.84	359.3
	-	16.53	356.4
	-	17.22	279.2

4- 3% OX-VIRIN

Detección en	UV (Tr)	TIC (Tr)	M/z
	-	9.23	453.6
	-	11.06	679.7
	-	15.36	568.5
	-	15.84	359.3
	-	16.53	356.4
	-	17.22	279.2

A partir de los resultados del análisis por espectrometría de masas podríamos asumir dos conclusiones:

En primer lugar se corroboran nuestros resultados por HPLC, ya que para la dosis de 1% después de 48 horas vemos que el pico de la microcistina LR disminuye y aparecen otros picos, mientras que para la dosis de 3% el pico de la microcistina LR desaparece totalmente pero también aparecen otros picos. En nuestros resultados para la dosis de 1% ya no se observaba el pico de la microcistina LR, pero esto se debe a que en nuestros análisis la microcistina estaba 1.000 veces más diluida que en el análisis por espectroscopia de masas, ya que en este tipo de análisis se necesita una concentración

muy alta de muestra, y por supuesto, el análisis mediante masas es mucho más sensible que con HPLC.

En segundo lugar vemos que aparecen en el caso de la dosis de 1% de OX-VIRIN productos de oxidación de distintas masas 1.030; 1.030,30; 1.047 y 1.001, además de la microcistina LR, que es el producto que tiene una masa de 996. En el caso de la dosis de 3% de OX-VIRIN también se observan productos de oxidación de distintas masas 1.030; 1.030,30 y 1.001, además del pico de 996, que corresponde con la masa de la microcistina LR. Estos productos, que no se han podido identificar, son congruentes también con los picos observados en el HPLC que identificábamos como productos de oxidación. La única sorpresa ha sido que presenten una masa mayor que la microcistina sin degradar.

Para saber si estos productos de oxidación de la microcistina LR mantienen su efecto tóxico, debemos recurrir al ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa 2A.

5.2.2.3. Determinación de microcistina por ensayo de inhibición de protein-fosfatasa

En los tratamientos llevados a cabo se determinó las dosis y los tiempos a los que el oxidante destruía la microcistina. Pero, tanto en el caso del análisis por HPLC como por espectroscopia de masas, se observó la presencia de varios picos de presumibles productos de degradación de microcistina. Esto planteaba el problema de si estos productos mantenían el potencial tóxico de la cianotoxina o por el contrario la habían perdido.

Para estudiar la toxicidad de la microcistina degradada después del tratamiento con OX-VIRIN se llevó a cabo la puesta a punto de un ensayo colorimétrico que se basa en la inhibición específica que ejerce la microcistina sobre la protein-fosfatasa 2A. Esta inhibición es la base del mecanismo de toxicidad de la microcistina en eucariotas, por lo tanto si los productos de degradación no la inhibían, indicaría que no resultaban tóxicos.

Pruebas preliminares mostraron que OX-VIRIN interfería en el ensayo (como era de esperar, al tratarse de una proteína, susceptible no sólo de ser degradada, sino de ser afectada en su centro activo por oxidantes) por lo que se tuvo que llevar a cabo la neutralización del mismo antes de aplicar las muestras por distintos métodos, descritos en el apartado 2.9 de Materiales y métodos.

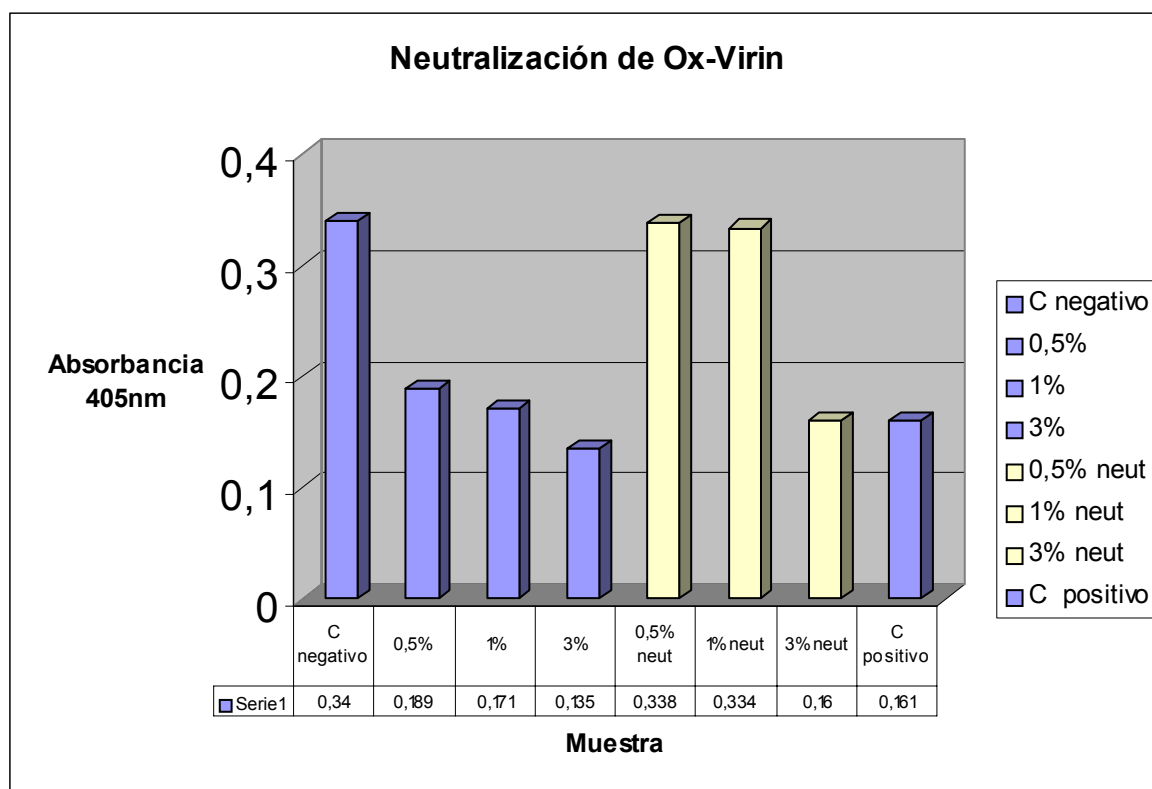
5.2.2.3.1. Ensayo de protein-fosfatasa con OX-VIRIN neutralizado

Se llevó a cabo el ensayo de protein-fosfatasa con 3 dosis de OX-VIRIN (0,5%, 1%, 3%) y con esas mismas dosis de OX-VIRIN pero neutralizadas según el procedimiento descrito en el punto 2.9. En el ensayo se puso también un control negativo, que no tiene microcistina (en el cual no tiene que producirse inhibición) y un control positivo, que tiene microcistina (en el cual tiene que producirse una inhibición total) para verificar que el ensayo tiene lugar correctamente.

Se realizó el ensayo según el procedimiento descrito en el punto 2.5 y los valores de absorbancia obtenidos fueron:

Muestra	Absorbancia 405 nm
Control negativo	0,340
0,5% OX-VIRIN	0,189
1% OX-VIRIN	0,171
3% OX-VIRIN	0,135

0,5% OX-VIRIN Neut.	0,338
1% OX-VIRIN Neut.	0,334
3% OX-VIRIN Neut.	0,160
Control positivo	0,161

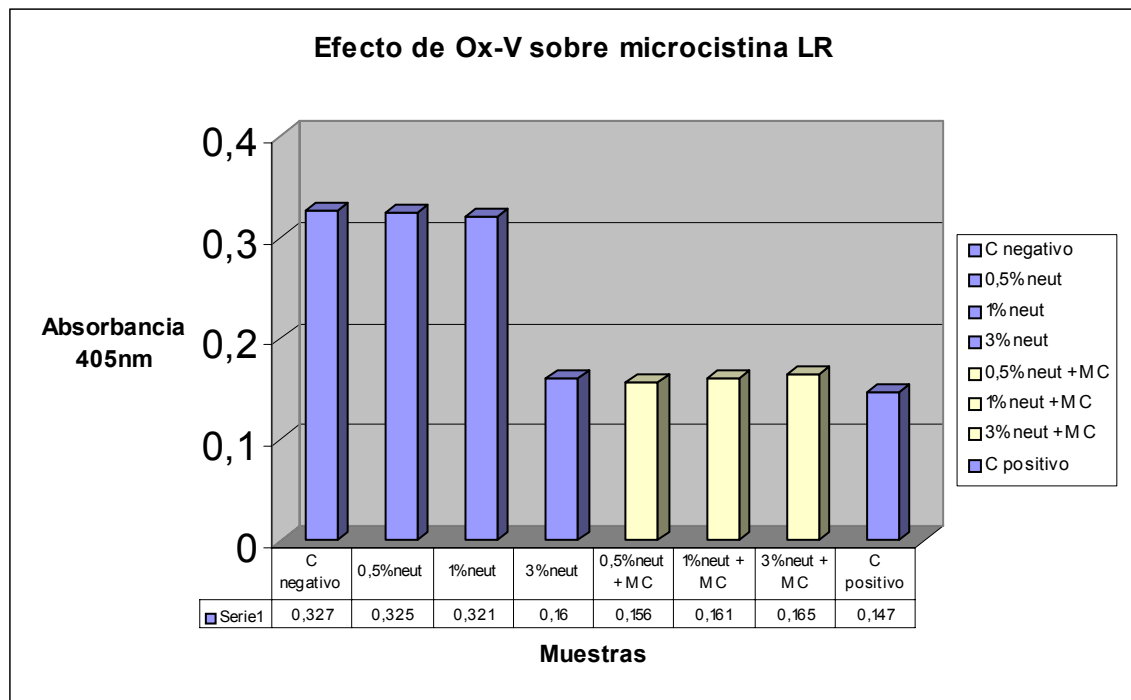


Se observa que OX-VIRIN inhibe a la enzima por sí solo (probablemente la destruye) por lo que no podríamos utilizar el método de la protein-fosfatasa sin una previa neutralización del OX-VIRIN. Como vemos en la figura, en los datos de OX-VIRIN neutralizados vemos que para el valor de 0,5% y de 1% de OX-VIRIN no hay inhibición, por lo cual el OX-VIRIN se ha neutralizado bien, mientras que para el valor de 3% aún existe inhibición, por lo que el OX-VIRIN no se ha neutralizado bien. Para verificar la neutralización del OX-VIRIN se emplearon tiras colorimétricas, que permiten saber la concentración de peróxidos en las disoluciones.

5.2.2.3.2. Ensayo de inhibición de protein-fosfatasa con microcistina tratada con OX-VIRIN

Se prepararon disoluciones de 1 µg/l de microcistina y se sometieron a tres dosis de OX-VIRIN (0,5%, 1%, 3%) durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se paró la reacción neutralizando el OX-VIRIN y se efectuó el ensayo de inhibición de protein-fosfatasa. En el ensayo se pusieron como controles un control negativo que no tiene microcistina (no debe existir inhibición), un control positivo que tiene microcistina en una concentración de 1 µg/l (debe existir una inhibición total) y unos controles preparados como las muestras pero sin microcistina, para ver que el efecto de la inhibición en caso de que existiera es debido a la microcistina y no al OX-VIRIN.

Muestras	Absorbancia 405 nm
O MC-Lr	0,327
0,5% OX-VIRIN Neut.	0,325
1% OX-VIRIN Neut.	0,321
3% OX-VIRIN Neut.	0,160
MC-LR + 0,5% OX-VIRIN	0,156
MC-LR + 1% OX-VIRIN	0,161
MC-LR + 3% OX-VIRIN	0,165
1 µg/l MC-LR	0,147



2

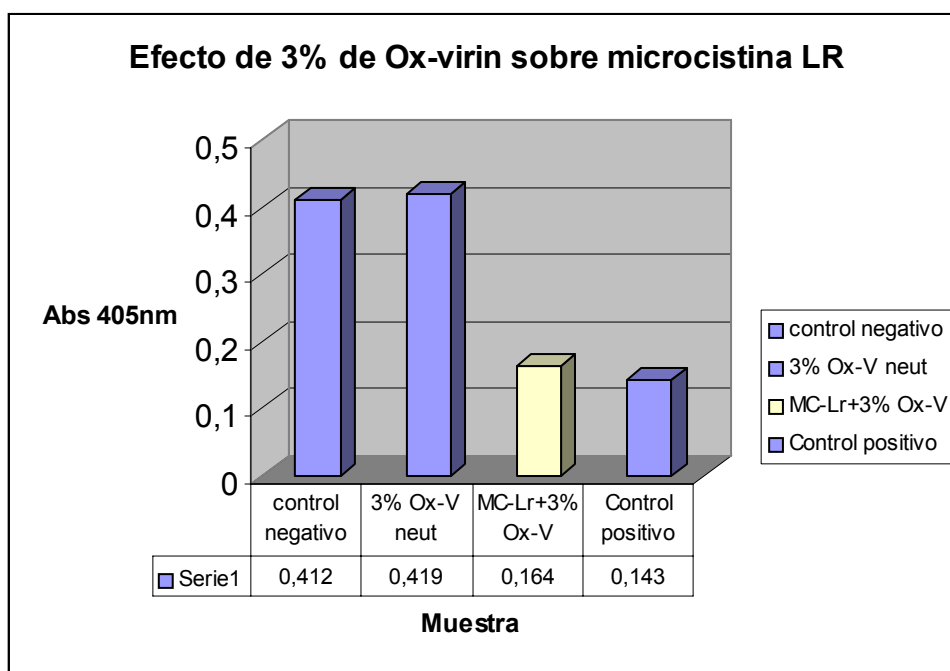
Vemos que después del tratamiento con OX-VIRIN continúa habiendo inhibición de la protein-fosfatasa. En el caso de 0,5% y de 1% podemos saber que es por la microcistina, pero en el caso del 3% es debido al OX-VIRIN porque en el control que no tenía microcistina también se produce inhibición. **Esto nos indica que, aunque hemos observado que la microcistina LR desaparece después del tratamiento con OX-VIRIN, los productos de oxidación presentes en la muestra continúan siendo tóxicos puesto que continúan inhibiendo a la protein-fosfatasa.**

5.2.2.3.3. Estudio de la dosis de 3% de OX-VIRIN

Se prepararon muestras 1 µg/ml de microcistina LR y se sometieron a una dosis de 3% de OX-VIRIN durante 48 horas, después de las cuales se neutralizó el OX-VIRIN según el protocolo descrito en el punto 2.9.2 de Materiales y métodos. Después se procedió al ensayo de inhibición de protein-fosfatasa en el cual se pusieron un control positivo (que contiene microcistina LR), un control negativo (que no contiene microcistina LR) y una muestra preparada con un 3% de OX-VIRIN y sin microcistina como control de neutralización.

2 En la gráfica Ox-V hacer referencia a OX-VIRIN

Muestras	Absorbancia 405 nm
0 ug/l MC-LR (Control -)	0,412
3% OX-VIRIN neut	0,419
MC-LR+3% OX-VIRIN	0,164
1 ug/l MC-LR (Control +)	0,143



Observamos que después del tratamiento con 3% de OX-VIRIN se sigue produciendo inhibición de la actividad de la protein-fosfatasa, también a esta dosis. **Por lo tanto, aunque la microcistina LR como tal desaparezca, los productos de oxidación que aparecen después del tratamiento continúan siendo tóxicos.** En este caso el efecto de inhibición no está producido por el OX-VIRIN, puesto que vemos que el control no tiene microcistina, no inhibe a la protein-fosfatasa, por lo que el OX-VIRIN está totalmente neutralizado.

5.2.3. Efecto de OX-VIRIN sobre microcistina de cultivos de cianobacterias

Se hizo un experimento en el cual se compararon un cultivo de *Microcystis* PCC7806 control y un cultivo de *Microcystis* PCC 7806 con una dosis de 1% de OX-VIRIN. De ambos cultivos se tomaron alícuotas para determinación de microcistina y para determinación de estrés oxidativo.

5.2.3.1. Determinación de microcistina

Se tomó de ambos cultivos una alícuota de 20 ml después de transcurridas 4 horas de la adición del OX-VIRIN. Estas alícuotas se sometieron a doble extracción con metanol y posteriormente se aplicaron al HPLC. El resultado fue que mientras en el cromatograma del control aparecía un pico correspondiente a la microcistina LR, en el cromatograma del cultivo tratado con OX-VIRIN no aparecía pico alguno. Probablemente es un factor de concentración de la toxina, pero es curioso comparar los resultados con los obtenidos en el caso de microcistina pura, ya que hay que tener en cuenta la gran cantidad de materia orgánica en el caso de los cultivos.

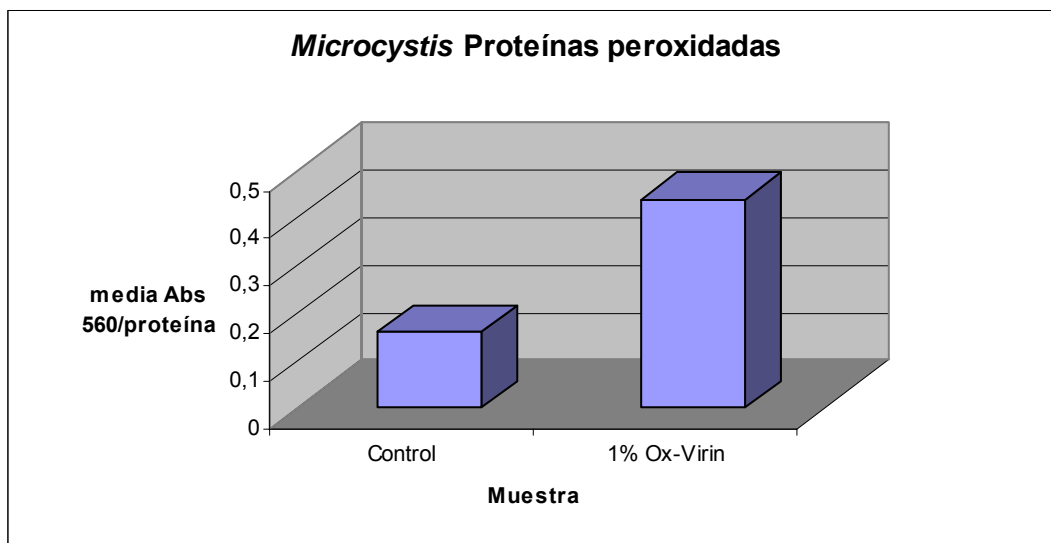
5.2.3.2. Determinación de estrés oxidativo

Se tomaron alícuotas de 200 ml del cultivo control y del cultivo tratado con OX-VIRIN y se sonicaron. Y mediante un método colorimétrico descrito en el apartado 2.8 de materiales y métodos se determinó el estrés oxidativo.

Gráfico:

Control (*Microcystis* PCC7806) ,

Muestra (*Microcystis* PCC7806 + 1% OX-VIRIN).



Se observa que las células tratadas están sometidas a un fuerte estrés oxidativo

6. ESTUDIO DE LA EFICACIA FRENTE A MICROCISTINA DE OX-VIRIN POTENCIADO CON DIFERENTES SALES DE HIERRO

6.1. Estudio de la eficacia de diversas concentraciones de OX-VIRIN con cloruro ferroso

Se prepararon disoluciones de 2 µg/ml de microcistina y se sometieron a tres dosis de OX-VIRIN (0,5%, 1%, 3%) en presencia de una concentración de 500 µM de cloruro ferroso (FeCl₂) durante 48 y 72 horas. Transcurrido este tiempo se paró la reacción neutralizando el OX-VIRIN y se efectuó el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa. En el ensayo se pusieron un control negativo que no tiene microcistina (no debe existir inhibición), un control positivo que tiene microcistina en una concentración de 2 µg/ml (debe existir una inhibición total) y unos controles preparados como las muestras pero sin microcistina para ver que el efecto de la inhibición en caso de que existiese es debido a la microcistina y no a OX-VIRIN.

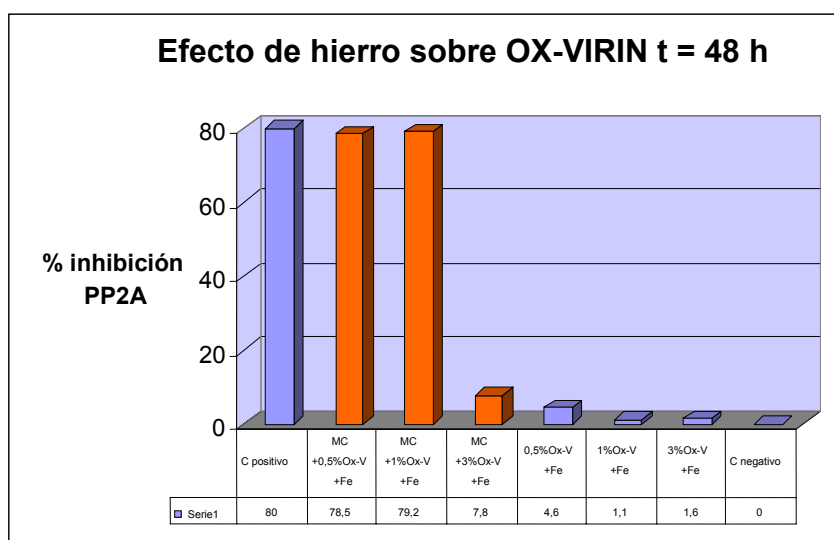
Las muestras fueron las siguientes:

- 1- Control 2 µg/ml Microcistina LR
- 2- 0,5% OX-VIRIN + 500 µM FeCl₂ + 2 µg/ml Microcistina LR
- 3- 1% OX-VIRIN + 500 µM FeCl₂ + 2 µg/ml Microcistina LR
- 4- 3% OX-VIRIN + 500 µM FeCl₂ + 2 µg/ml Microcistina LR
- 5- 0,5% OX-VIRIN + 500 µM FeCl₂
- 6- 1% OX-VIRIN + 500 µM FeCl₂
- 7- 3% OX-VIRIN + 500 µM FeCl₂

OX-VIRIN se eliminó siguiendo el protocolo descrito en el punto correspondiente de Materiales y Métodos para posteriormente realizar el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa (PP2A).

T = 48 horas+

Muestras	Absorbancia 405 nm
0 MC-LR (Control -)	0,559
0,5% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,533
1% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,553
3% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,550
MC-LR+0,5% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,120
MC-LR+1% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,116
MC-LR+3% OX-VIRIN + Fe	0,515
MC-LR (Control +)	0,114

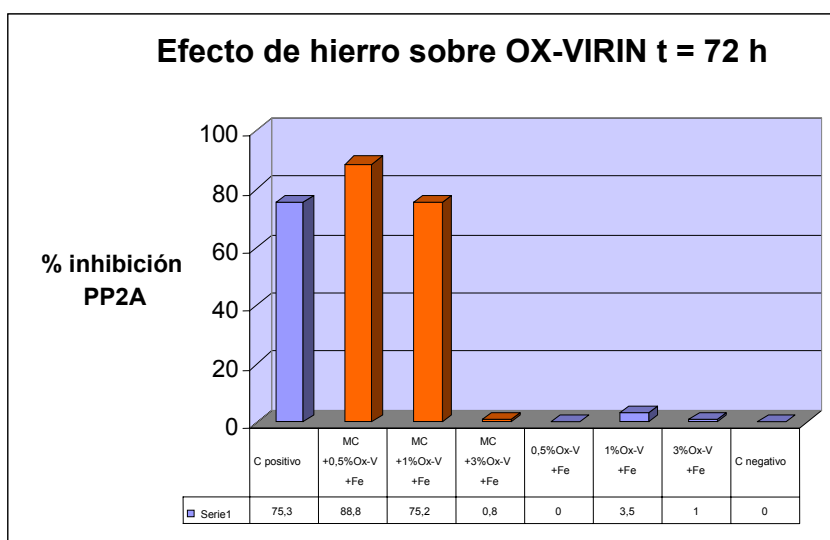


Como se observa en los resultados, la dosis de 0,5% + Fe y la de 1% + Fe no son capaces de destruir la microcistina ya que esta continúa inhibiendo a la protein-fosfatasa. **Sin embargo, en la dosis de 3 % OX-VIRIN + FeCl₂ no existe inhibición; Por lo tanto deducimos que la microcistina ha sido destruida.**

T = 72 Horas

Repitiendo el ensayo pero con un periodo de incubación de 72 horas obtenemos resultados similares.

Muestras	Absorbancia 405 nm
0 MC-LR (Control -)	0,484
0,5% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,494
1% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,467
3% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,480
MC-LR+0,5% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,122
MC-LR+1% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,120
MC-LR+3% OX-VIRIN + 500 μ M FeCl ₂	0,480
MC-LR (Control +)	0,120



6.2. Estudio de la eficacia de 1% OX-VIRIN con diversas sales de hierro

Debido a que la dosis de OX-VIRIN que destruía la microcistina era demasiado elevada, probamos además del cloruro ferroso, otras sales de hierro y a concentraciones algo superiores para intentar conseguir un efecto potenciador superior.

Se estudió el efecto sobre una muestra de 2 μ g/ml de microcistina producido por OX-VIRIN al 1% suplementado con 200 μ g/l de diversas sales de hierro (cloruro ferroso [ClFe₂], citrato férrico amónico [C₆H₈O₇·xFe·NH₃] y sulfato férrico amónico o sal de Mohr [Fe (NH₄)₂(SO₄)₂]) durante 24, 48 y 72 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se paró la reacción neutralizando el OX-VIRIN y se efectuó el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa. Además de las muestras se pusieron como controles negativos una muestra sin microcistina (no se debe producir inhibición de la actividad de la protein-fosfatasa) y como control positivo una muestra con microcistina. Además, se pusieron muestras de OX-VIRIN con cada una de las sales de hierro pero sin microcistina, para comprobar que el efecto inhibitorio que se esperaba observar sea debido a la acción de la microcistina y no a la acción de otros productos presentes en el ensayo.

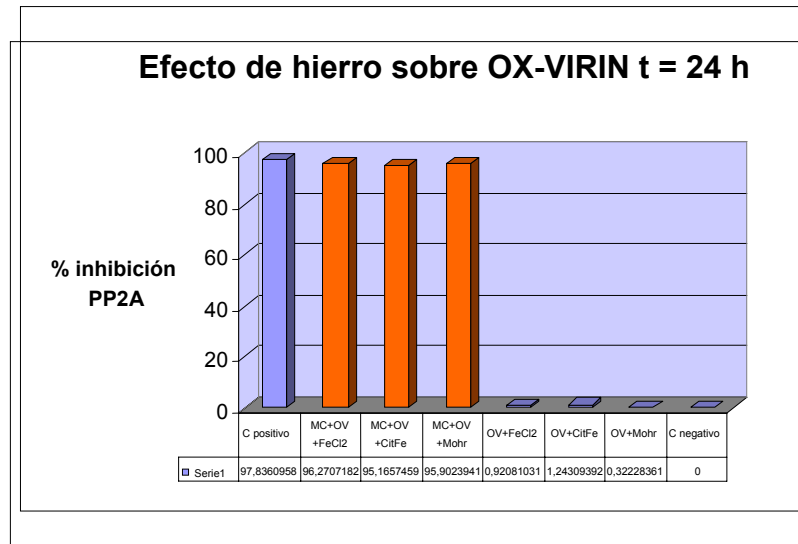
Las muestras fueron las siguientes:

- 1- Control 2 $\mu\text{g/ml}$ Microcistina LR
- 2- 1% OX-VIRIN + 200 $\mu\text{g/l}$ FeCl_2 + 2 $\mu\text{g/ml}$ Microcistina LR
- 3- 1% OX-VIRIN + 200 $\mu\text{g/l}$ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{xFe}\text{xNH}_3$ + 2 $\mu\text{g/ml}$ Microcistina LR
- 4- 1% OX-VIRIN + 200 $\mu\text{g/l}$ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ + 2 $\mu\text{g/ml}$ Microcistina LR
- 5- 1% OX-VIRIN + 200 $\mu\text{g/l}$ FeCl_2
- 6- 1% OX-VIRIN + 200 $\mu\text{g/l}$ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{xFe}\text{xNH}_3$
- 7- 1% OX-VIRIN + 200 $\mu\text{g/l}$ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$

T = 24 HORAS

Tras incubar las muestras durante 24 horas obtenemos las siguientes medidas:

Muestras	Absorbancia 405 nm
0 MC-LR (Control -)	1,09
1% OX-VIRIN + FeCl ₂ +MC-LR	0,04
1% OX-VIRIN + CitFe+ MC-LR	0,05
1% OX-VIRIN + Mohr+MC-LR	0,04
1% OX-VIRIN + FeCl ₂	1,08
1% OX-VIRIN + CitFe	1,07
1% OX-VIRIN + Mohr	1,08
MC-LR (Control +)	0,02

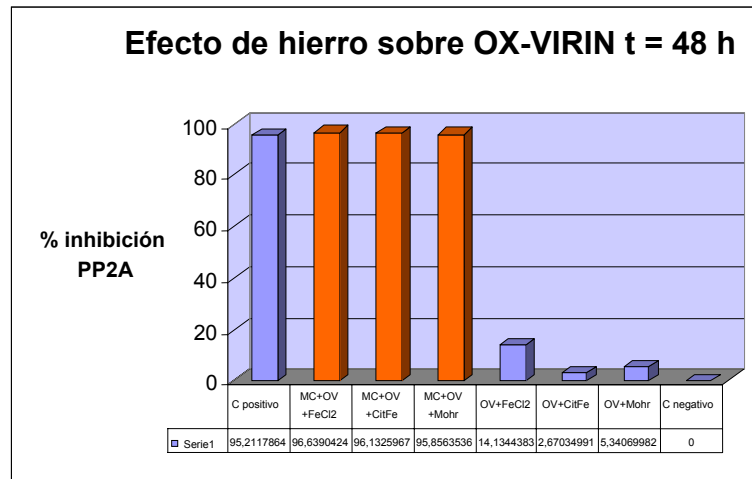


Podemos observar que tras un periodo de incubación de 24 horas no se consigue la degradación de la microcistina a pesar de estar potenciado el producto por sales de hierro.

T=48 HORAS

Si realizamos el mismo ensayo pero incubando las muestras durante 48 horas obtenemos los siguientes resultados:

Muestras	Absorbancia 405 nm
0 MC-LR (Control -)	1,09
1% OX-VIRIN + FeCl ₂ +MC-LR	0,05
1% OX-VIRIN + CitFe+ MC-LR	0,04
1% OX-VIRIN + Mohr+MC-LR	0,04
1% OX-VIRIN + FeCl ₂	0,93
1% OX-VIRIN + CitFe	1,06
1% OX-VIRIN + Mohr	1,03
MC-LR (Control +)	0,05

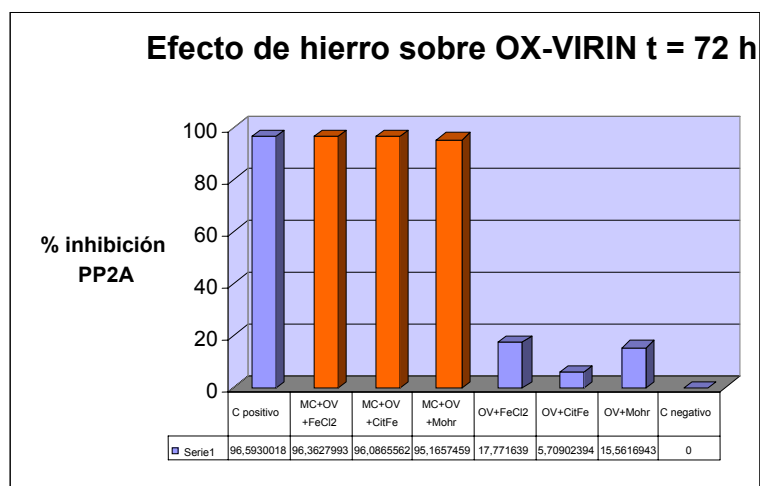


Se observa que el resultado obtenido es el mismo que a las 24 horas, no existe destrucción de microcistina.

T = 72 HORAS

Incubando las muestras durante 72 horas los resultados obtenidos son los siguientes:

Muestras	Absorbancia 405 nm
0 MC-LR (Control -)	1,09
1% OX-VIRIN + FeCl ₂ +MC-LR	0,04
1% OX-VIRIN + CitFe+ MC-LR	0,04
1% OX-VIRIN + Mohr+MC-LR	0,05
1% OX-VIRIN + FeCl ₂	0,89
1% OX-VIRIN + CitFe	1,02
1% OX-VIRIN + Mohr	0,92
MC-LR (Control +)	0,04



A las 72 horas se observa que la microcistina presente en las muestras sigue inhibiendo la actividad de la protein-fosfatasa, a pesar haber estado en presencia de OX-VIRIN.

7. REALIZACIÓN DE ENSAYOS DE DESTRUCCIÓN DE MICROCISTINAS UTILIZANDO OX-VIRIN ENRIQUECIDO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Se prepararon muestras en que se incubó la microcistina con distintas dosis de OX-VIRIN al cual se le añadió peróxido de hidrógeno para que quedase a una concentración final del 29%, cantidad superior a la que contiene OX-VIRIN, que es de un 25%.

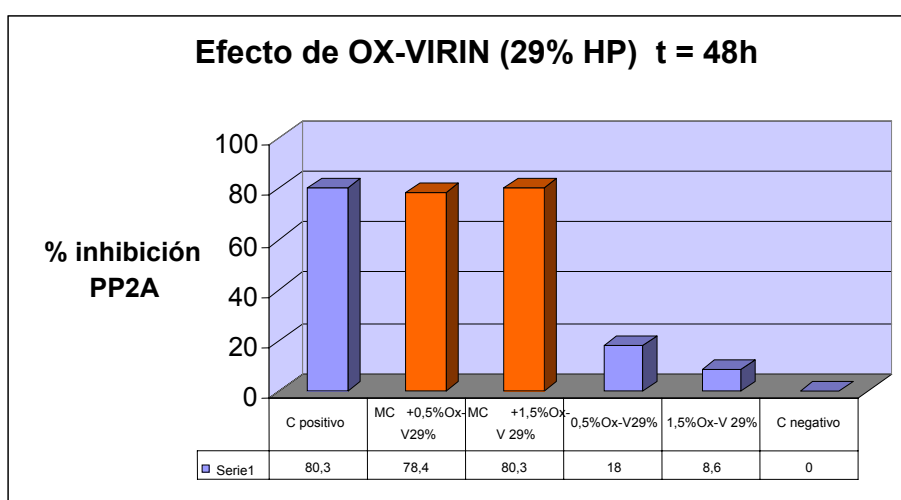
Las muestras fueron las siguientes:

- 1- Control 2 µg/ml Microcistina LR
- 2- 0,5% OX-VIRIN al 29% de H₂O₂ + 2 µg/ml Microcistina LR
- 3- 1,5% OX-VIRIN al 29% de H₂O₂ + 2 µg/ml Microcistina LR
- 4- 0,5% OX-VIRIN al 29% de H₂O₂
- 5- 1,5% OX-VIRIN al 29% de H₂O₂

Estas muestras se neutralizaron para posteriormente someterlas al ensayo de inhibición de la proteinofosfatasa. Se realizaron ensayos a dos tiempos distintos de incubación de la microcistina con el OX-VIRIN 29% de H₂O₂, que fueron 48 y 72 horas.

T = 48 horas

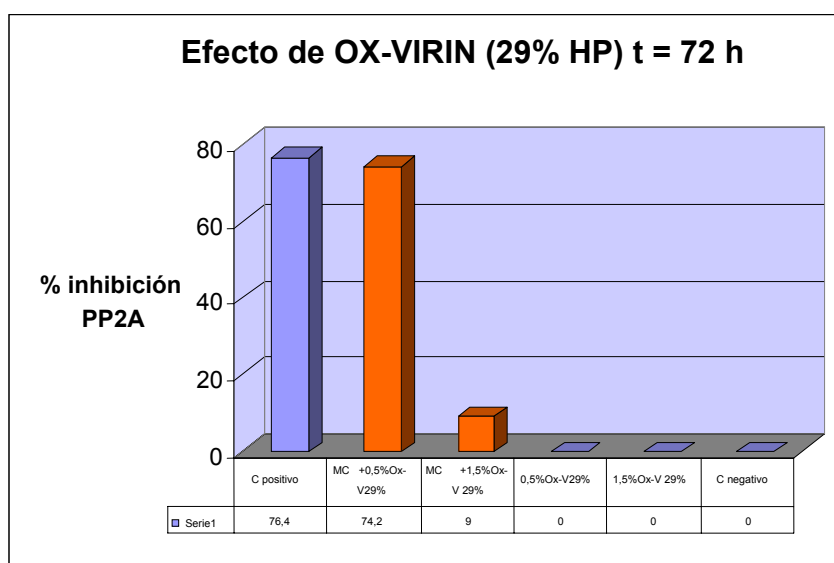
Muestras	Absorbancia 405 nm
0 MC-LR (Control -)	0,579
0,5% OX-VIRIN 29% H ₂ O ₂	0,474
1,5% OX-VIRIN 29% H ₂ O ₂	0,535
MC-LR + 0,5% OX-VIRIN 29% H ₂ O ₂	0,125
MC-LR + 1,5% OX-VIRIN 29% H ₂ O ₂	0,114
MC-LR (Control +)	0,114



Como se puede apreciar ambas dosis están bien eliminadas puesto que ninguna inhibe a la fosfatasa, pero las dosis que tienen microcistina ambas inhiben a la fosfatasa por lo tanto no han sido capaces de destruir la microcistina, o sus productos de degradación siguen siendo tóxicos.

T = 72 horas

Muestras	Absorbancia 405 nm
0 MC-LR (Control -)	0,484
1% OX-VIRIN 50% H ₂ O ₂	0,490
3% OX-VIRIN 50% H ₂ O ₂	0,484
MC-LR + 1% OX-VIRIN 50% H ₂ O ₂	0,125
MC-LR + 3% OX-VIRIN 50% H ₂ O ₂	0,440
MC-LR (Control +)	0,114



Los resultados son similares a los realizados a 48 horas, salvo que a 72 horas la muestra que contiene microcistina con un 1,5% de OX-VIRIN 29% H₂O₂ deja de inhibir; **Por lo tanto, parece que a 48 horas dicha dosis no es capaz de destruir totalmente la microcistina o sus subproductos, mientras que a 72 horas la destruye totalmente.**

8. ESTUDIO DE LA EFICACIA COMO AGENTE ELIMINADOR DE MICROCISTINAS DE OX-AGUA 2ª GENERACIÓN

En este experimento se estudió la eficacia de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN, otro sistema de degradación de microcistinas basado en el ácido peracético y en el peróxido de hidrógeno. Para ello incubamos muestras con concentraciones crecientes de microcistina en presencia de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN al 5%, para establecer un rango de actuación.

El tiempo de incubación será 2 horas. Este tiempo es mucho menor que el utilizado en ocasiones anteriores, ya que la aplicación futura fundamental de este producto es su empleo en plantas potabilizadoras, con lo que decidimos utilizar el tiempo medio de residencia del agua en un paso del proceso potabilizador. Como controles positivos de cada muestra ponemos la misma concentración de microcistina, lo que nos inhibirá a la protein-fosfatasa. Del mismo modo, como control negativo del experimento ponemos una muestra sin microcistina. Además, tendremos una muestra de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN al 5% para descartar que se produzca una inhibición de la protein-fosfatasa debido a las condiciones del ensayo.

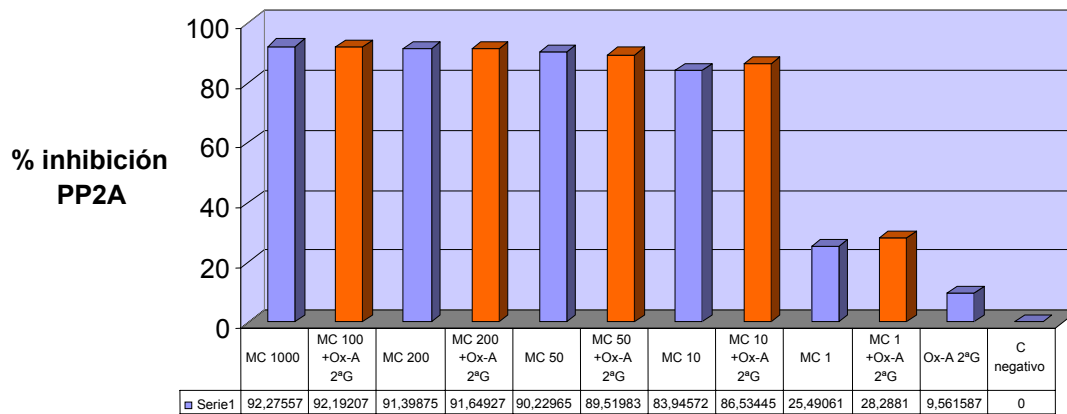
Las muestras se detallan a continuación:

- 1- 1000 µg/l Microcistina LR
- 2- 200 µg/l Microcistina LR
- 3- 50 µg/l Microcistina LR
- 4- 10 µg/l Microcistina LR
- 5- 1 µg/l Microcistina LR
- 6- 000 µg/l Microcistina LR + 5% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN
- 7- 200 µg/l Microcistina LR+ 5% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN
- 8- 50 µg/l Microcistina LR+ 5% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN
- 9- 10 µg/l Microcistina LR+ 5% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN
- 10- 1 µg/l Microcistina LR+ 5% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN
- 11- 5% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN

Tras incubar la incubación se neutralizaron las muestras con los cartuchos C18 y se evaporaron con burbujeo de N₂. Tras este paso, se realizó el estudio de la inhibición de la protein-fosfatasa.

Muestras	Absorbancia 405 nm
MC 1000	0,185
MC 1000 + OX-AGUA 2ª GENERACIÓN	0,187
MC 200	0,206
MC 200+ OX-AGUA 2ª GENERACIÓN	0,2
MC 50	0,234
MC 50 + OX-AGUA 2ª GENERACIÓN	0,251
MC 10	0,3845
MC 10+ OX-AGUA 2ª GENERACIÓN	0,3225
MC 1	1,7845
MC 1+ OX-AGUA 2ª GENERACIÓN	1,7175
OX-AGUA 2ª GENERACIÓN	2,166
0 MC-LR (control -)	2,3

Efecto sobre microcistina de 5% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN t = 2 h



De los resultados obtenidos se extrae la conclusión de que OX-AGUA 2ª GENERACIÓN al 5% no es capaz de degradar microcistina o los posibles subproductos tóxicos resultantes de su degradación en 2 horas.

9. ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA COMO POTENCIADOR DE LA ACCIÓN OXIDANTE DE OX-VIRIN Y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN

Estudios previos dirigidos por el Dr. Ángel López del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza señalaban que la acción oxidante del peróxido de hidrógeno se podía activar mediante procesos físico-químicos como la radiación ultravioleta o los ultrasonidos, que podían ser combinados con sales como óxido de zinc (ZnO).

9.1. Efecto del peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta sobre ovoalbúmina

Como primera aproximación a este estudio se decidió comprobar el efecto del peróxido de hidrógeno al 3% sobre una situación extrema, para lo que utilizamos una muestra de ovoalbúmina comercial a una concentración de 200 µg/ml.

Se decidió utilizar ovoalbúmina en vez de microcistina porque, al ser una proteína de tamaño muy superior, es posible estudiar su degradación mediante SDS-PAGE, técnica mucho más sencilla y rápida que el HPLC-MS, necesario para determinar la degradación de microcistina. Además, se podía seguir la degradación de la ovoalbúmina mediante medidas espectrofotométricas a 280 nm, que es la longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas.

La ovoalbúmina de pollo es una proteína de 42,7 KDa de peso molecular, cuyo coeficiente de extinción teórico a 280 nm es de $31775 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El coeficiente de extinción depende de la composición de la proteína ya que, cuantos más aminoácidos aromáticos la compongan, mayor será su coeficiente de absorción a 280 nm. Esto nos permite seguir cómo varía la cantidad de proteína presente en la muestra cuando se ve sometida a la acción oxidante del peróxido de hidrógeno, proceso inviable en el caso de la microcistina, debido a su pequeño tamaño y a las bajas concentraciones que se utilizan.

Se prepararon muestras de 200 µg/ml de ovoalbúmina que fueron incubadas con peróxido de hidrógeno al 3%. Estas muestras se realizaron por duplicado, unas se incubaron bajo luz ultravioleta en agitación suave y las otras permanecieron en oscuridad. De esta forma pudimos comprobar el efecto sinérgico de la radiación ultravioleta junto con el peróxido de hidrógeno. Se cogieron alícuotas de cada muestra al inicio del ensayo y tras 1, 2 y 4 horas en el caso de la incubación con ultravioleta y tras 2 y 4 horas en el caso de la incubación en oscuridad.

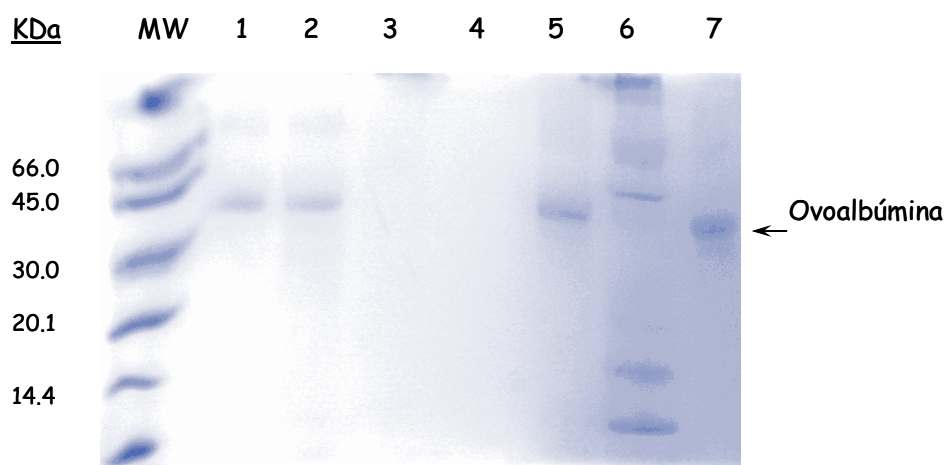
También se prepararon muestras de peróxido de hidrógeno al 3% que se sometieron al mismo tratamiento como control en las medidas espectrofotométricas de que la absorbancia medida se debía únicamente a la ovoalbúmina presente en la muestra y no a otros reactivos. Estas muestras no se resolvieron por electroforesis, ya que por SDS-PAGE únicamente se visualizan las proteínas.

9.1.1. Visualización de las muestras por SDS-PAGE

Las muestras cargadas en el gel fueron las siguientes:

1. Ovoalbúmina + 3% H_2O_2 + UV t = 0 h
2. Ovoalbúmina + 3% H_2O_2 t = 0 h
3. Ovoalbúmina + 3% H_2O_2 + UV t = 1 h
4. Ovoalbúmina + 3% H_2O_2 + UV t = 2 h
5. Ovoalbúmina + 3% H_2O_2 t = 2 h
6. Ovoalbúmina + 3% H_2O_2 + UV t = 4 h
7. Ovoalbúmina + 3% H_2O_2 t = 4 h

Tras la incubación, las muestras se prepararon inmediatamente para realizar SDS-PAGE de forma que se detenía la acción oxidante del peróxido de hidrógeno. Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida obteniéndose el siguiente resultado:



Se observa que la banda correspondiente a la ovoalbúmina desaparece tras su tratamiento con peróxido de hidrógeno en presencia de luz ultravioleta (carriles 3 y 4), mientras que en oscuridad no se degrada, por lo que es necesaria la luz ultravioleta como activador del peróxido de hidrógeno en estas condiciones. (En el carril 6 se observa un patrón de bandas extraño que no corresponde con la muestra de partida, que podría deberse a una contaminación externa de la muestra).

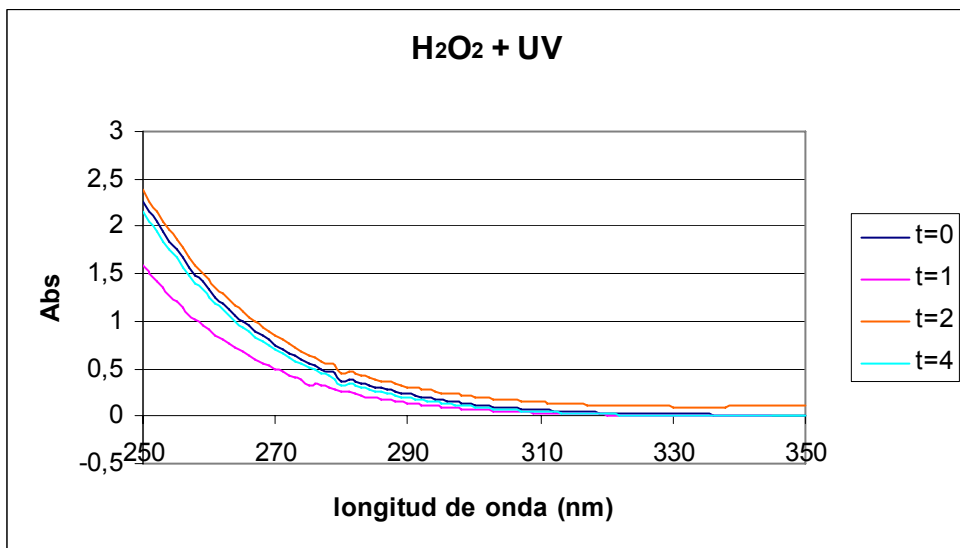
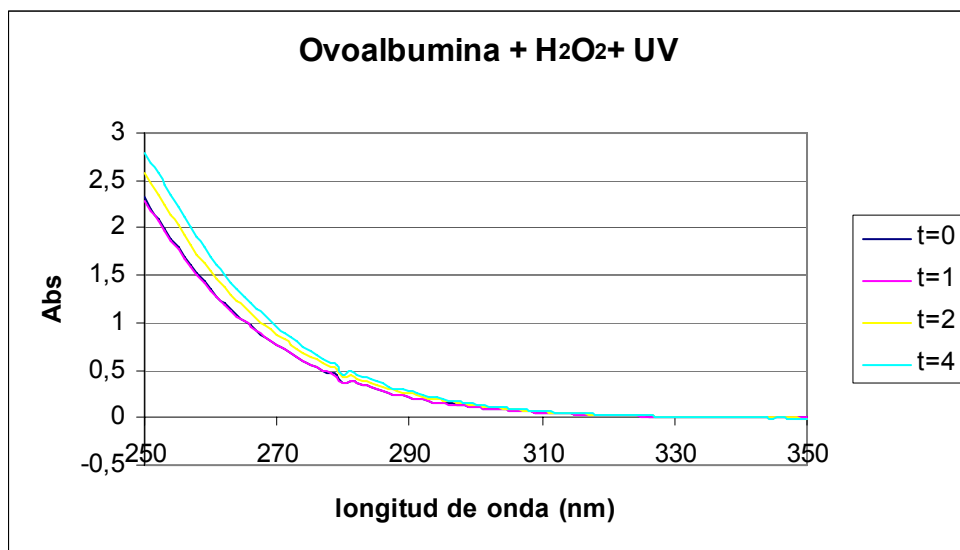
Por lo tanto, podemos concluir que **en presencia de peróxido de hidrógeno y de luz ultravioleta, la ovoalbúmina es degradada**. Mediante este tipo de geles se pueden visualizar proteínas de hasta 6 KDa, por lo que los fragmentos obtenidos por la degradación de la ovoalbúmina presentarán un tamaño menor.

9.1.2. Medidas espectrofotométricas de las muestras

Mediante la electroforesis hemos observado que la ovoalbúmina se degrada como consecuencia de la incubación con peróxido de hidrógeno bajo la irradiación de luz ultravioleta. Vamos a realizar un pequeño espectro de 250 nm a 350 nm de cada una de las muestras con el objetivo de poder detectar el pico de absorción correspondiente a la proteína y poder cuantificar la concentración presente en el ensayo por medio de la Ley de Beer-Lambert. Por medio de esta técnica vamos a medir únicamente las muestras incubadas con luz ultravioleta, ya que en oscuridad no se degrada la ovoalbúmina. Vamos a medir las muestras de peróxido de hidrógeno obtenidas a cada tiempo (muestras 5-8) ya que nos sirven de blanco en las medidas de las muestras obtenidas en las mismas condiciones pero que además contienen ovoalbúmina (muestras 1-4).

Las muestras ensayadas son las siguientes:

1. Ovoalbúmina + 3% H₂O₂ + UV t = 0 h
2. Ovoalbúmina + 3% H₂O₂ + UV t = 1 h
3. Ovoalbúmina + 3% H₂O₂ + UV t = 2 h
4. Ovoalbúmina + 3% H₂O₂ + UV t = 4 h
5. 3% H₂O₂ + UV t = 0 h
6. 3% H₂O₂ + UV t = 1 h
7. 3% H₂O₂ + UV t = 2 h
8. 3% H₂O₂ + UV t = 4 h



Como se puede observar a partir de las gráficas obtenidas, la señal del peróxido de hidrógeno es tan alta que enmascara la que pudiera observarse debido a la presencia de la ovoalbúmina. Podría ponerse a punto el ensayo eliminando el peróxido de hidrógeno de la muestra mediante un cartucho C18, pero no resulta productivo ya que lo que se buscaba era una metodología rápida para detectar la degradación de proteína y por medio de SDS-PAGE se puede seguir dicha destrucción, con la ventaja añadida de poder observar los productos de degradación que van apareciendo.

9.2. Efecto de peróxido de hidrógeno y de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN potenciados con UV sobre ovoalbúmina, *Anabaena* sp. y *Microcystis* sp.

Después de observar que se produce degradación de la ovoalbúmina en presencia de peróxido de hidrógeno y de luz ultravioleta, vamos a probar si OX-AGUA 2ª GENERACIÓN y la luz ultravioleta también son capaces de destruir la proteína. Asimismo comprobaremos su efecto alucida incubando dichos productos en presencia de cultivos de las cianobacterias *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Microcystis* sp. PCC 7806. Utilizaremos peróxido de hidrógeno además de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN para comprobar que se sigue produciendo la degradación, aunque las dosis empleadas serán algo menores, 1% y 0,1%.

En resumen, vamos a trabajar con las siguientes muestras:

Materia orgánica:	{	Ovoalbúmina (200 µg/ml)
		<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (Abs ₆₀₀ = 0,5, 0,4, 0,2 y 0,1)
		<i>Microcystis</i> sp. PCC 7806 (Abs ₆₀₀ = 0,5, 0,4, 0,2 y 0,1)
Oxidante:	{	Peróxido de hidrógeno (1% y 0,1%)
		OX-AGUA 2ª GENERACIÓN (1% y 0,1%)
Condiciones:	{	Ultravioleta
		Oscuridad

Para ensayar todas las posibilidades que, junto con los correspondientes blancos son 100 muestras, vamos a realizar el ensayo en placa microtiter. Incubamos las muestras, compuestas de un tipo de muestra biológica y un oxidante en condiciones de oscuridad o ultravioleta durante 2 horas. Transcurrido este tiempo tomaremos una alícuota de cada muestra para resolverlas mediante SDS-PAGE y realizaremos una lectura de la placa a 450 nm y a 630 nm.

Esta placa se realizó por duplicado, de forma que una se incubó en oscuridad mientras que la otra se incubó con luz ultravioleta. Tras la incubación de las muestras se tomaron alícuotas de cada una para visualizarlas mediante SDS-PAGE.

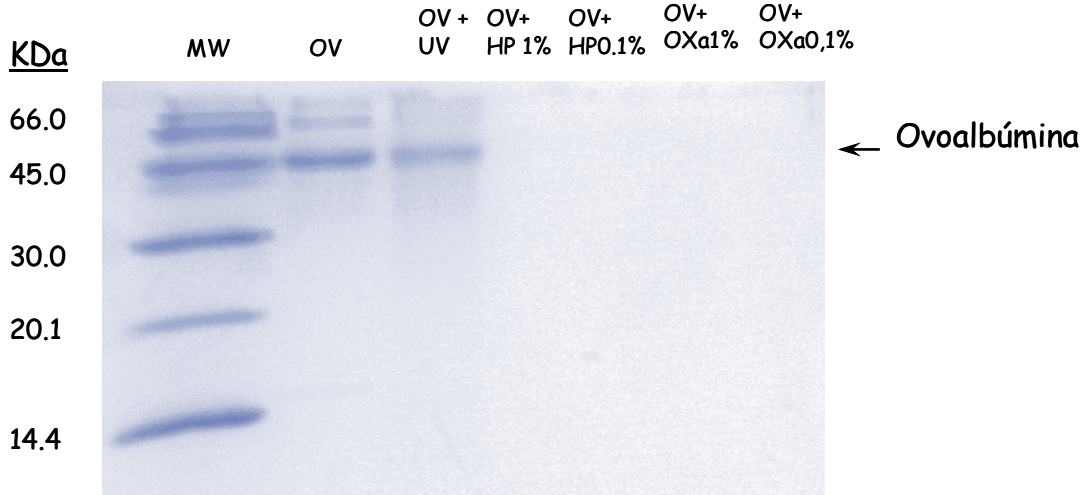
La distribución de las muestras en la placa fue la siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	OV+Tris	<i>Anabaena</i> 0,1+Tris	<i>Anabaena</i> 0,2+Tris	<i>Anabaena</i> 0,4+Tris	<i>Anabaena</i> 0,5+Tris	<i>Microcystis</i> 0,1+Tris	<i>Microcystis</i> 0,2+Tris	<i>Microcystis</i> 0,4+Tris	<i>Microcystis</i> 0,5+Tris	Tris+BG11
B	OV+HP 1%	<i>Anabaena</i> 0,1+HP 1%	<i>Anabaena</i> 0,2+HP 1%	<i>Anabaena</i> 0,4+HP 1%	<i>Anabaena</i> 0,5+HP 1%	<i>Microcystis</i> 0,1+HP 1%	<i>Microcystis</i> 0,2+HP 1%	<i>Microcystis</i> 0,4+HP 1%	<i>Microcystis</i> 0,5+HP 1%	BG11+HP 1%
C	OV+HP 0.1%	<i>Anabaena</i> 0,1+HP 0,1%	<i>Anabaena</i> 0,2+HP 0,1%	<i>Anabaena</i> 0,4+HP 0,1%	<i>Anabaena</i> 0,5+HP 0,1%	<i>Microcystis</i> 0,1+HP 0,1%	<i>Microcystis</i> 0,2+HP 0,1%	<i>Microcystis</i> 0,4+HP 0,1%	<i>Microcystis</i> 0,5+HP 0,1%	BG11+HP 0,1%
D	OV+OXa 1%	<i>Anabaena</i> 0,1+OXa 1%	<i>Anabaena</i> 0,2+OXa 1%	<i>Anabaena</i> 0,4+OXa 1%	<i>Anabaena</i> 0,5+OXa 1%	<i>Microcystis</i> 0,1+OXa 1%	<i>Microcystis</i> 0,2+Oxa 1%	<i>Microcystis</i> 0,4+OXa 1%	<i>Microcystis</i> 0,5+OXa 1%	BG11+OXa 1%
E	OV+OXa 0,1%	<i>Anabaena</i> 0,1+OXa 0,1%	<i>Anabaena</i> 0,2+OXa 0,1%	<i>Anabaena</i> 0,4+OXa 0,1%	<i>Anabaena</i> 0,5+OXa 0,1%	<i>Microcystis</i> 0,1+Oxa 0,1%	<i>Microcystis</i> 0,2+OXa 0,1%	<i>Microcystis</i> 0,4+OXa 0,1%	<i>Microcystis</i> 0,5+OXa 0,1%	BG11+OXa 0,1%

9.2.1. SDS-PAGE de las muestras incubadas bajo luz UV

Ovoalbúmina incubada con oxidantes bajo luz ultravioleta

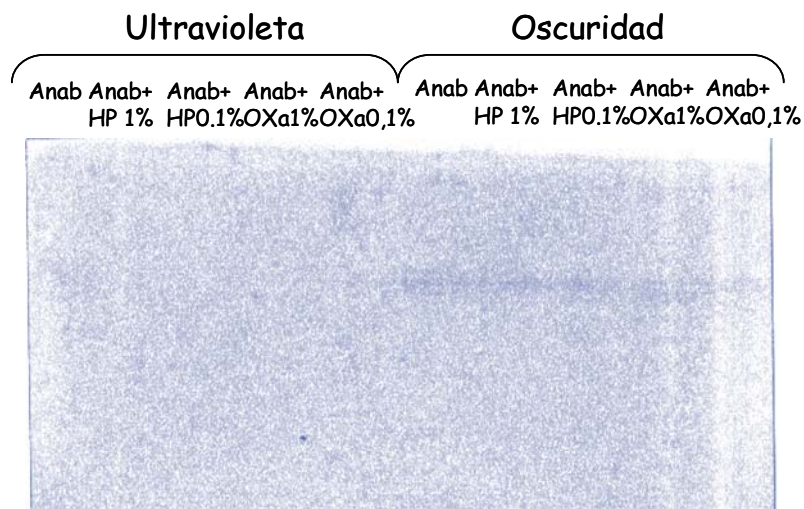
La electroforesis de las muestras de ovoalbúmina (Placa oscuridad: 1A. Placa ultravioleta: 1A, 1B, 1C, 1D Y 1E) nos dio el siguiente resultado:



Podemos observar que la incubación de la ovoalbúmina bajo luz ultravioleta ya la degrada parcialmente por lo que, además de activar al peróxido de hidrógeno, la radiación puede degradar por otras vías a la proteína. Podemos observar que **tanto el peróxido de hidrógeno como OX-AGUA 2ª GENERACIÓN al 1% y 0,1% son capaces de degradar totalmente a la ovoalbúmina tras 2 horas de incubación bajo luz ultravioleta.**

Anabaena sp. PCC 7120 incubada con oxidantes bajo luz ultravioleta

Tras observar el exitoso resultado con ovoalbúmina, vamos a comprobar si también se degradan células enteras siguiendo este protocolo. Para ello vamos a realizar SDS-PAGE de las muestras de *Anabaena* sp. PCC 7120 a $Ab_{600}=0,5$ (Placa ultravioleta: 5A, 5B, 5C, 5D, 5E. Placa oscuridad: 5A, 5B, 5C, 5D, 5E).



No se observan todas las proteínas del extracto crudo sino únicamente una banda de proteína que posiblemente sea la mayoritaria. Esto quizá sea debido a que es necesario cargar una mayor concentración de células en el gel o a que el proceso de tratamiento de la muestra antes de cargarla en el gel (hervido con un buffer con reductores y detergentes) no es suficiente para romper las membranas celulares. A pesar de ello, se observa que la banda mayoritaria del extracto crudo de las cianobacterias sólo está presente en las muestras incubadas en oscuridad, lo que nos sugiere que las células se han roto y sus proteínas han podido ser degradadas en las muestras incubadas con luz ultravioleta.

Microcystis sp. PCC 7806 incubada con oxidantes bajo luz ultravioleta

Del mismo modo, realizamos SDS-PAGE de las muestras de *Microcystis* a $Abs_{600} = 0,5$. (Placa oscuridad: 9A, 9B, 9C, 9D y 9E. Placa ultravioleta: 9A, 9B, 9C, 9D y 9E). En los geles obtenidos no se observa la aparición de ninguna banda de proteína, posiblemente por las razones discutidas en el apartado anterior, por lo que no se pueden extraer conclusiones sobre el efecto de los oxidantes en *Microcystis*.

9.2.2. Lectura de las placas a 450 nm y 630 nm

Otros experimentos que nos permiten seguir la degradación de organismos fotosintéticos son las medidas espectrofotométricas a 630 nm, que nos daría una medida de la turbidez de la muestra, y a 450 nm, que es la zona en la que absorben las clorofilas que componen el sistema fotosintético de las cianobacterias.

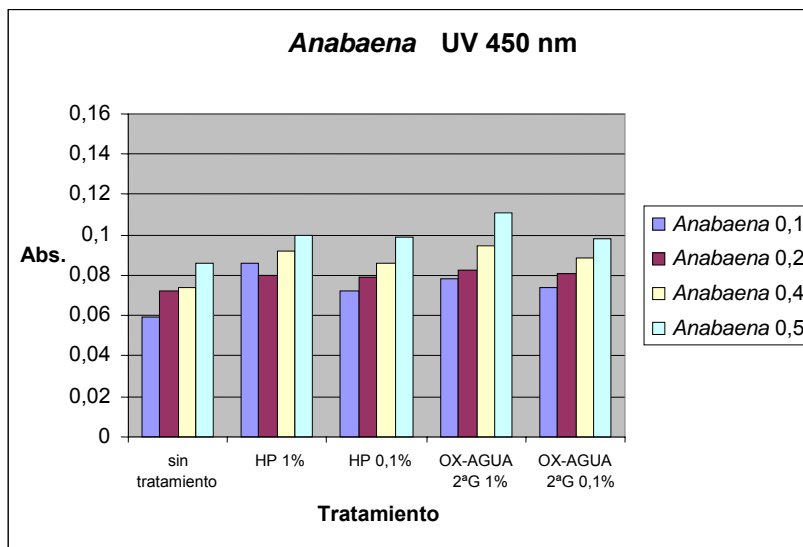
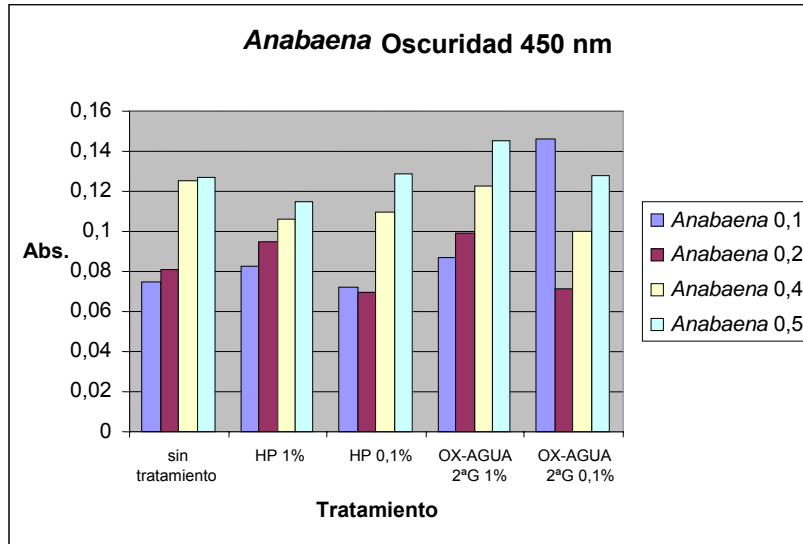
Medidas a 450 nm

Las medidas obtenidas a 450 nm fueron las siguientes:

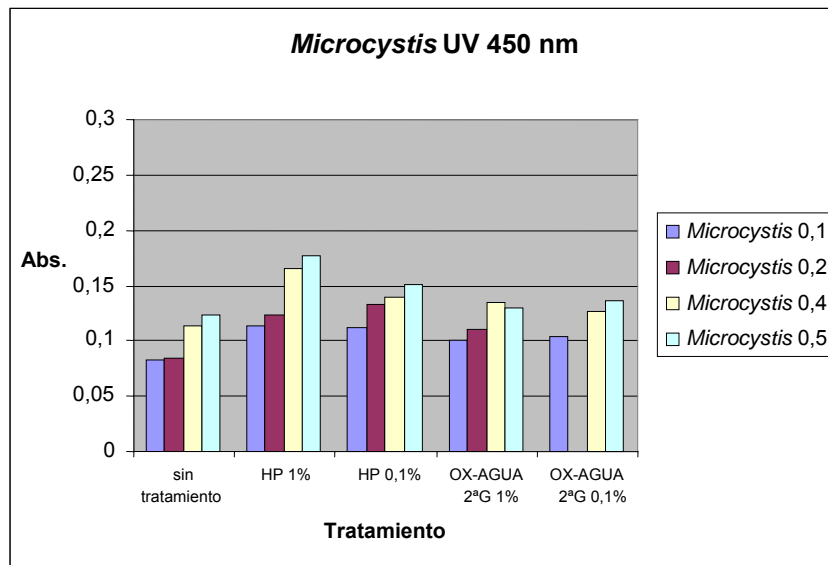
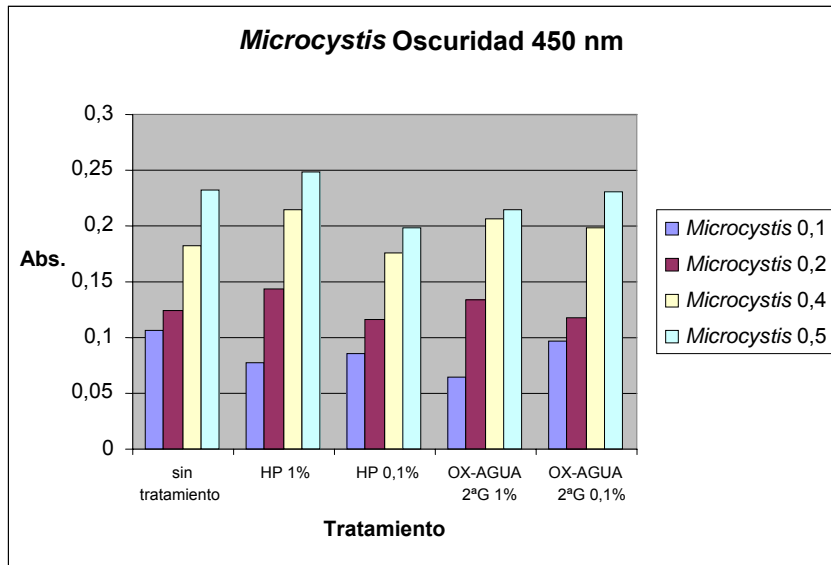
Placa Oscuridad 450 nm									
0,065	0,075	0,081	0,125	0,127	0,107	0,124	0,182	0,232	0,044
0,072	0,083	0,095	0,106	0,115	0,077	0,144	0,214	0,249	0,096
0,057	0,072	0,07	0,11	0,129	0,085	0,116	0,176	0,199	0,04
0,077	0,087	0,099	0,123	0,145	0,065	0,134	0,206	0,215	0,056
0,066	0,146	0,071	0,1	0,128	0,096	0,117	0,198	0,23	0,045

Placa UV 450 nm									
0,055	0,059	0,072	0,074	0,086	0,082	0,084	0,114	0,124	0,046
0,072	0,086	0,08	0,092	0,1	0,114	0,123	0,166	0,176	0,072
0,051	0,072	0,079	0,086	0,099	0,112	0,133	0,14	0,15	0,05
0,081	0,078	0,083	0,095	0,111	0,101	0,111	0,134	0,13	0,062
0,07	0,074	0,081	0,089	0,098	0,103	0,098	0,126	0,136	0,063

Si representamos los datos obtenidos para las muestras de *Anabaena* y *Microcystis*, que son las que contienen pigmentos fotosintéticos, se obtienen las siguientes gráficas:



Representando los valores obtenidos para *Microcystis* se obtienen las siguientes gráficas:



Se observa que la absorbancia obtenida es la misma que en las muestras donde no hay cianobacterias, por lo que posiblemente los reactivos utilizados nos produzcan una señal que nos enmascara la producida por las cianobacterias.

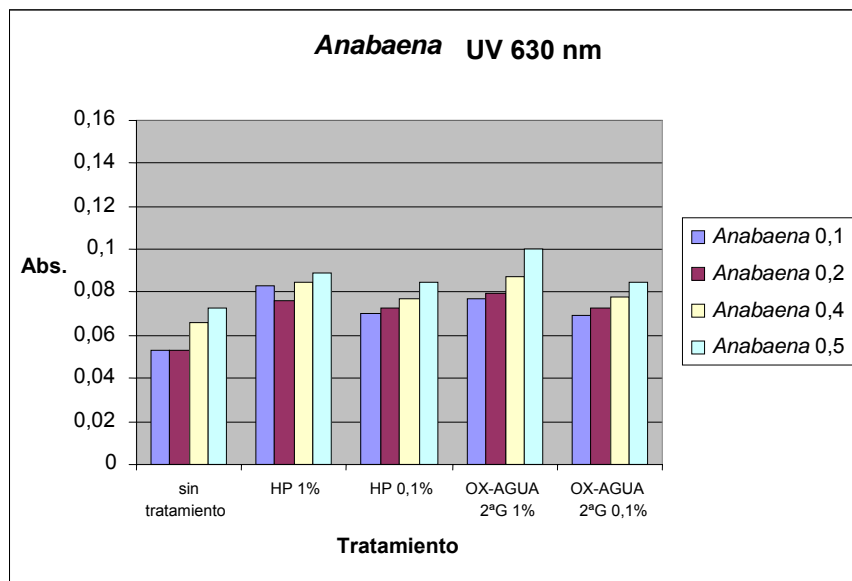
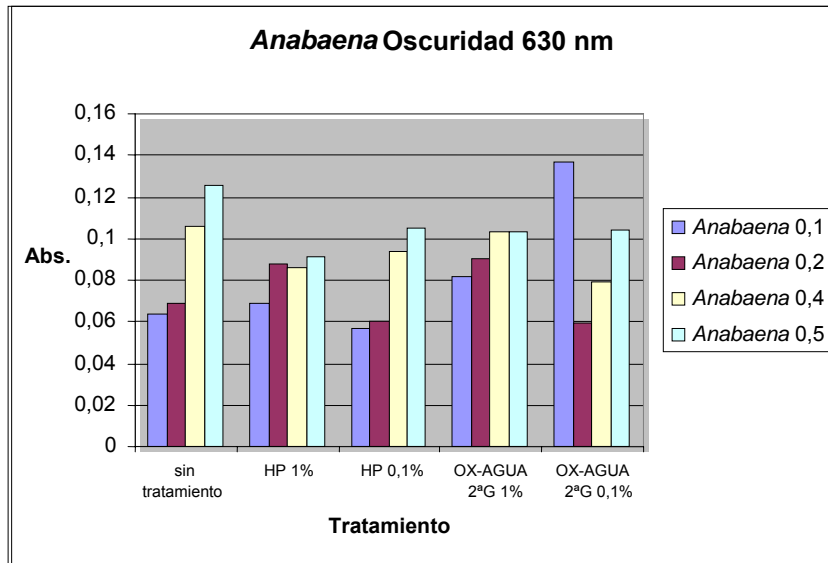
Medidas a 630 nm

Las medidas a 630 nm de las muestras ensayadas son las siguientes:

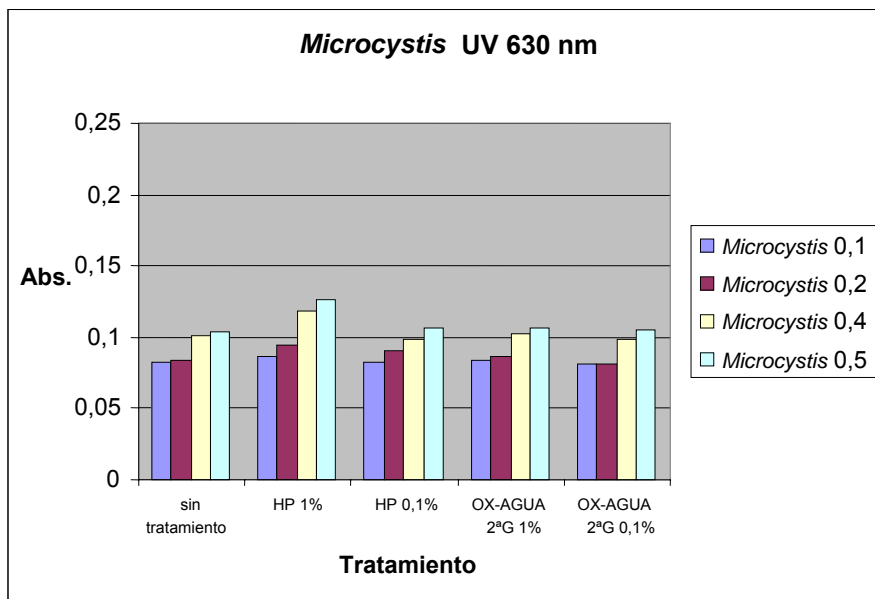
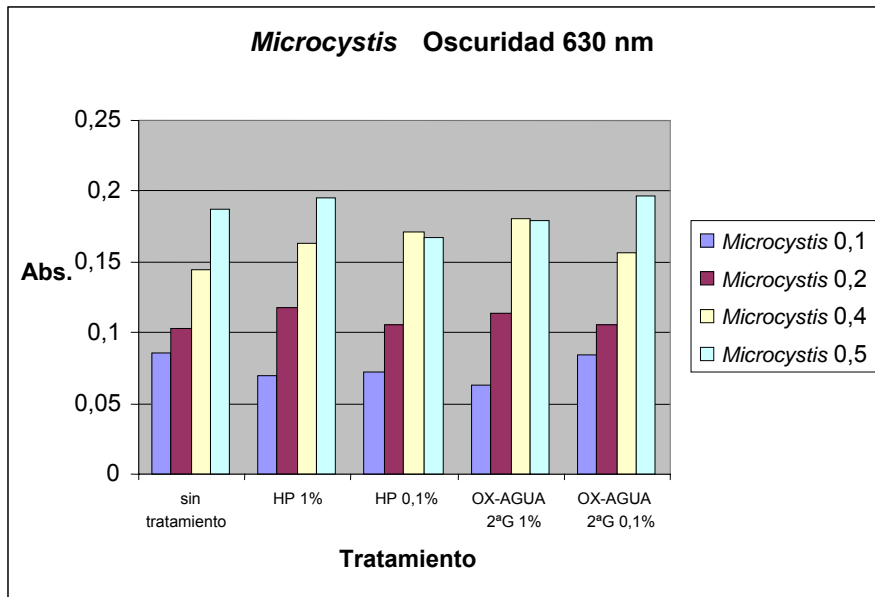
Placa Oscuridad 630 nm									
0,063	0,064	0,069	0,106	0,126	0,086	0,103	0,144	0,187	0,04
0,074	0,069	0,088	0,086	0,091	0,069	0,117	0,163	0,195	0,097
0,058	0,057	0,06	0,094	0,105	0,072	0,106	0,171	0,167	0,037
0,066	0,082	0,09	0,103	0,103	0,063	0,114	0,18	0,179	0,048
0,06	0,137	0,059	0,079	0,104	0,084	0,106	0,157	0,197	0,04

Placa UV 630 nm									
0,055	0,053	0,053	0,066	0,073	0,082	0,084	0,101	0,104	0,041
0,072	0,083	0,076	0,085	0,089	0,086	0,095	0,119	0,126	0,068
0,05	0,07	0,073	0,077	0,085	0,083	0,09	0,099	0,107	0,045
0,082	0,077	0,08	0,087	0,1	0,084	0,086	0,102	0,107	0,06
0,067	0,069	0,073	0,078	0,085	0,081	0,081	0,098	0,105	0,06

Si representamos estos datos para *Anabaena* obtenemos los siguientes resultados:



Las medidas de las muestras de *Microcystis* nos dieron las siguientes gráficas:



Observamos que las medidas no varían mucho entre las muestras que contienen cianobacterias de las que no, probablemente porque los reactivos interfieren en el ensayo.

10. ENSAYOS CON SISTEMAS DE ACTIVACIÓN FÍSICOS

Estudios previos sugerían que la acción sinérgica de agentes biocidas junto con métodos físicos, como ultravioleta podían potenciar la acción oxidante de los productos. Se realizaron distintos experimentos a partir de los cuales se comprueba la veracidad de dichos estudios, ya que OX-AGUA 2ª GENERACIÓN al 0,1% es capaz de degradar una muestra proteica de 200 µg/ml tras un periodo de incubación de 2 horas.

10.1. Estudio de la eficacia frente a microcistina de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN potenciado con ultravioleta y TiO₂

Se prepararon disoluciones de 20 ng/ml, 200 ng/ml y 2 µg/ml de microcistina LR que se sometieron a una dosis de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN del 0,1%. Asimismo se comprobó si la presencia de TiO₂ aumentaba la eficacia del producto, por lo que a muestras de microcistina con 0,1% de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN se añadió TiO₂ a la concentración de 2 g/l. Las muestras se incubaron bajo luz ultravioleta a temperatura ambiente y con agitación suave durante 2 y 4 horas.

Transcurrido este tiempo se paró la reacción eliminando el OX-AGUA 2ª GENERACIÓN mediante los cartuchos de fase reversa y se efectuó el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa. En el ensayo se pusieron un control negativo que no tiene microcistina (no debe existir inhibición), controles positivos que tienen microcistina a las concentraciones del ensayo (20 ng/ml, 200 ng/ml y 2 µg/ml) donde debe existir una inhibición total, y unos controles preparados como las muestras, pero sin microcistina, para ver que el efecto de la inhibición, en caso de que existiese, es debido únicamente a la microcistina.

Las muestras fueron las siguientes:

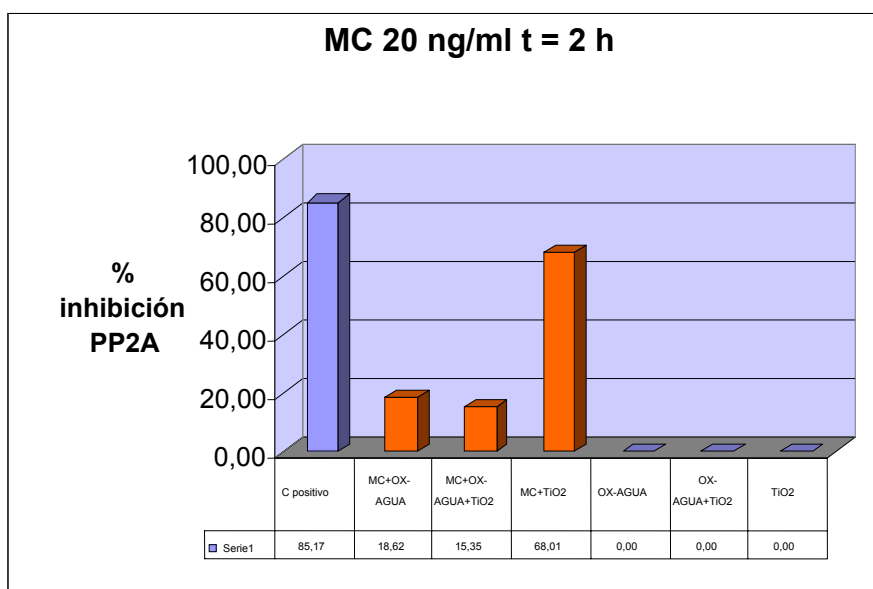
- 1- Control Microcistina LR
- 2- 0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN + Microcistina LR
- 3- 0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN + 2 g/l TiO₂ + Microcistina LR
- 4- 2 g/l TiO₂ + Microcistina LR
- 5- 0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN
- 6- 0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN + 2 g/l TiO₂
- 7- 2 g/l TiO₂

10.1.1. Microcistina LR= 20 ng/ml

Primero se realizó el ensayo con Microcistina a 20 ng/ml, concentración 20 veces superior a la permitida por la legislación actual.

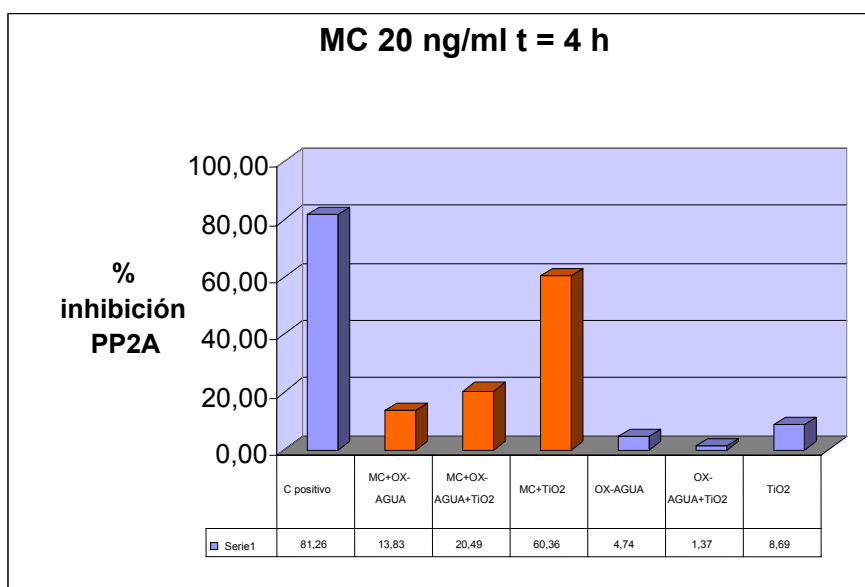
T = 2 horas

Muestras	Absorbancia 405 nm
MC-LR (Control +)	0,1725
0,1% OX-AGUA + Microcistina LR	0,9465
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,9845
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,372
0,1% OX-AGUA	1,552
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂	1,5025
2 g/l TiO ₂	1,4915



T = 4 horas

Muestras	Absorbancia 405 nm
MC-LR (Control +)	0,3225
0,1% OX-AGUA + Microcistina LR	1,4825
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	1,368
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,682
0,1% OX-AGUA	1,639
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂	1,697
2 g/l TiO ₂	1,571



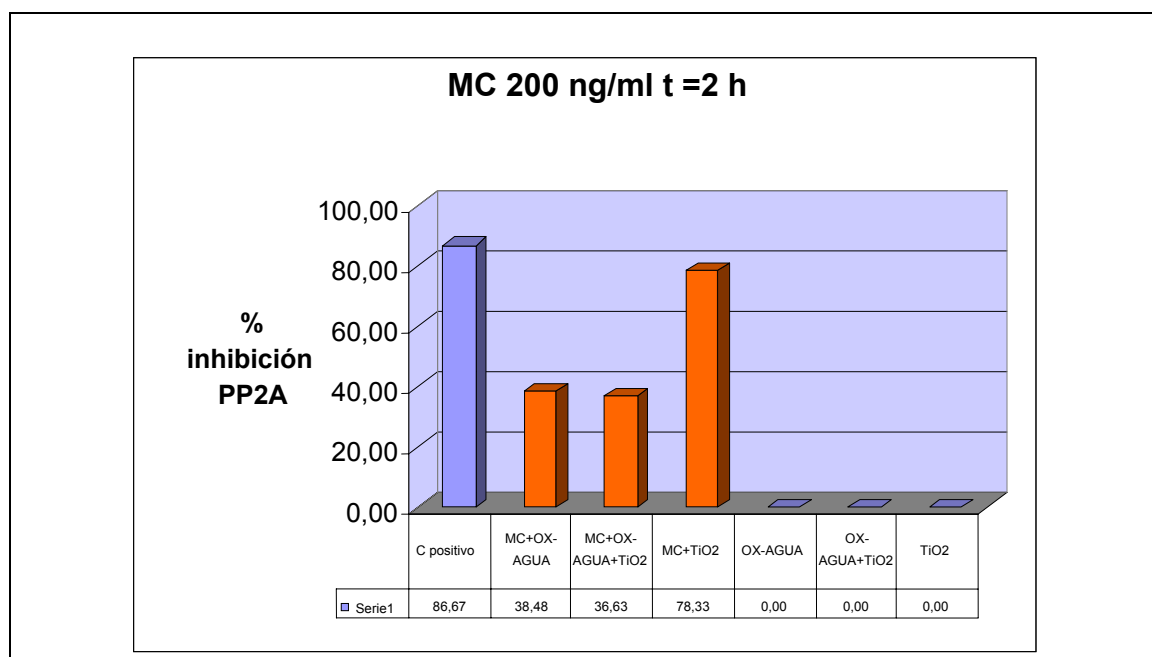
En las muestras de microcistina incubadas con radiación ultravioleta en presencia de OX-AGUA 2^a GENERACIÓN se observa una disminución de la inhibición de la actividad de la protein-fosfatasa, lo cual significa que ha disminuido drásticamente la concentración efectiva de microcistina o cualquier subproducto tóxico en el ensayo. La presencia de TiO₂ en el ensayo no parece mejorar la capacidad biocida del producto.

10.1.2. Microcistina LR= 200 ng/ml

Posteriormente se realizó un ensayo similar con muestras de Microcistina a 200 ng/ml.

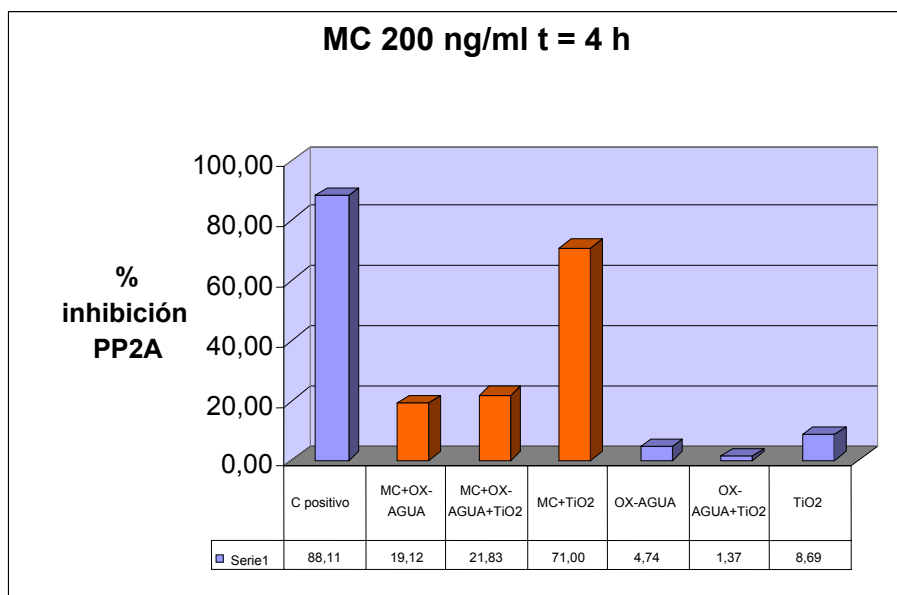
T = 2 horas

Muestras	Absorbancia 405 nm
MC-LR (Control +)	0,155
0,1% OX-AGUA + Microcistina LR	0,7155
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,737
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,252
0,1% OX-AGUA	1,552
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂	1,5025
2 g/l TiO ₂	1,4915



T = 4 horas

Muestras	Absorbancia 405nm
MC-LR (Control +)	0,2045
0,1% OX-AGUA + Microcistina LR	1,3915
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	1,345
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,499
0,1% OX-AGUA	1,639
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂	1,697
2 g/l TiO ₂	1,571



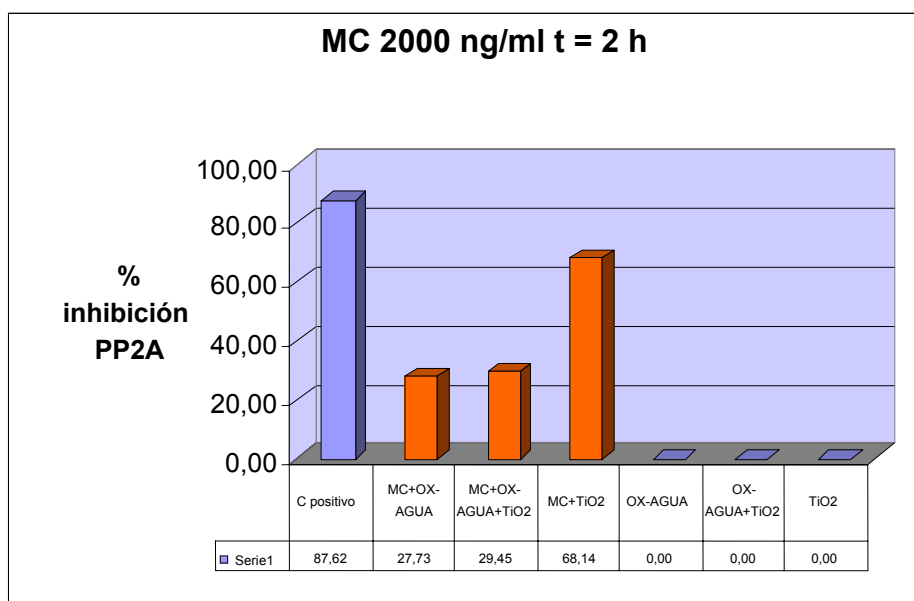
Al igual que en el experimento anterior, se consigue eliminar la toxicidad de la microcistina con un tratamiento basado en OX-AGUA 2^a GENERACIÓN junto con luz ultravioleta, a pesar de que la concentración de microcistina en este ensayo sea 10 veces superior.

10.1.3. Microcistina LR= 2000 ng/ml

Finalmente se realizó el ensayo con Microcistina a 2000 ng/ml, concentración 1000 veces superior a la permitida por la legislación.

T = 2 horas

Muestras	Absorbancia 405nm
MC-LR (Control +)	0,144
0,1% OX-AGUA + Microcistina LR	0,8405
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,8205
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,3705
0,1% OX-AGUA	1,552
0,1% OX-AGUA + 2 g/l TiO ₂	1,5025
2 g/l TiO ₂	1,4915



En este caso no se dispone de datos a las 4 horas. Sin embargo, puede observarse perfectamente que, a pesar de que la concentración de microcistina en el ensayo sea 1.000 veces superior a la permitida por la legislación vigente, se consigue eliminar la toxicidad de la muestra tras 2 horas en un 70%.

10.2. Estudio de la eficacia frente a microcistina de OX-VIRIN potenciado con ultravioleta y TiO₂

Al igual que en la serie de experimentos para ensayar la actividad biocida de OX-AGUA 2^a GENERACIÓN, se prepararon disoluciones de 20 ng/ml, 200 ng/ml y 2 µg/ml de microcistina LR que se sometieron a una dosis de OX-VIRIN del 0,1%. De igual forma, a muestras de microcistina tratadas con 0,1% de OX-VIRIN se añadió TiO₂ a la concentración de 2 g/l. Las muestras se incubaron bajo luz ultravioleta a temperatura ambiente y con agitación suave durante 2 y 4 horas.

Transcurrido este tiempo se paró la reacción eliminando el OX-VIRIN y se efectuó el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa. En el ensayo se pusieron un control negativo que no tiene microcistina (no debe existir inhibición), controles positivos que tienen microcistina a las concentraciones del ensayo (20 ng/ml, 200 ng/ml y 2 µg/ml) donde debe existir una inhibición total y unos controles preparados como las muestras pero sin microcistina para ver que el efecto de la inhibición en caso de que existiese es debido a la microcistina.

Las muestras fueron las siguientes:

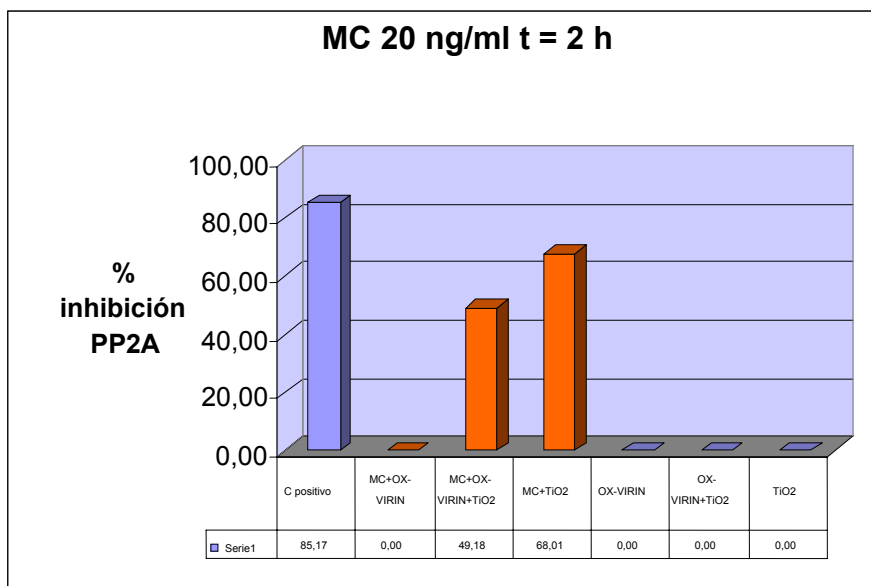
- 1- Control Microcistina LR
- 2- 0,1% OX-VIRIN + Microcistina LR
- 3- 0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO₂ + Microcistina LR
- 4- 2 g/l TiO₂ + Microcistina LR
- 5- 0,1% OX-VIRIN
- 6- 0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO₂
- 7- 2 g/l TiO₂

10.2.1. Microcistina LR= 20 ng/ml

Primero se realizó el ensayo con Microcistina a 20 ng/ml.

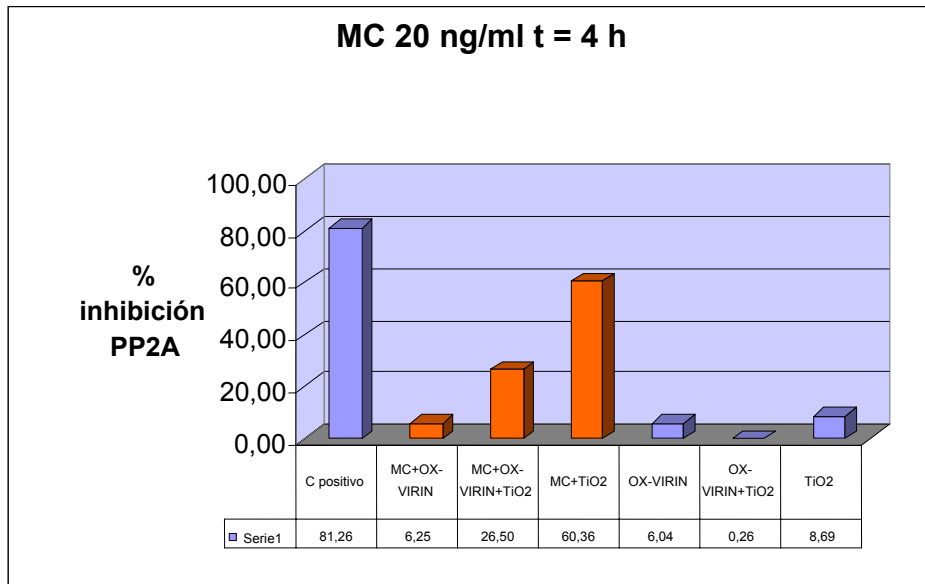
T = 2 horas

Muestras	Absorbancia 405 nm
MC-LR (Control +)	0,1725
0,1% OX-VIRIN + Microcistina LR	1,524
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,591
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,372
0,1% OX-VIRIN	1,463
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂	1,4905
2 g/l TiO ₂	1,4915



T = 4 horas

Muestras	Absorbancia 405 nm
MC-LR (Control +)	0,3225
0,1% OX-VIRIN + Microcistina LR	1,613
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	1,2645
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,682
0,1% OX-VIRIN	1,6165
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂	1,716
2 g/l TiO ₂	1,571



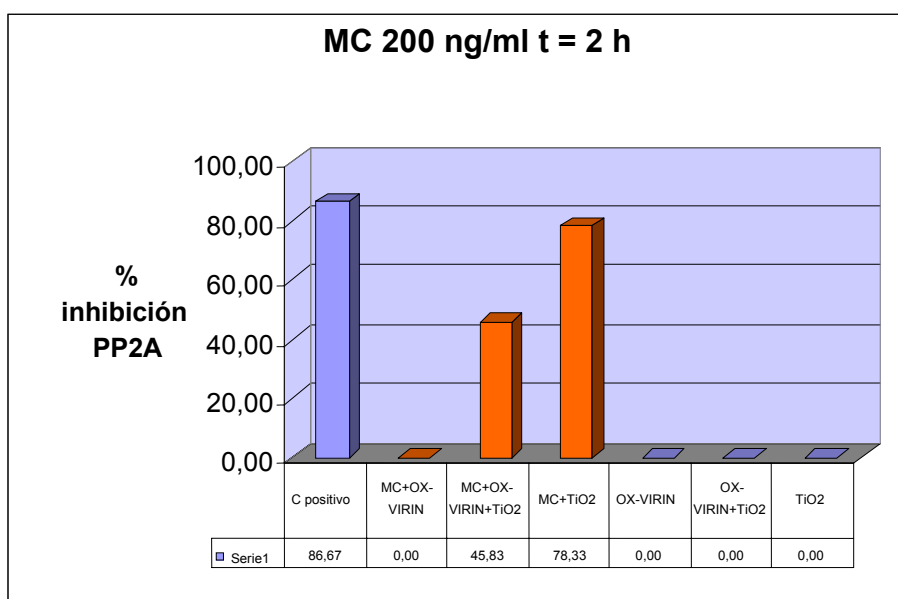
Se observa que el tratamiento de OX-VIRIN con luz ultravioleta consigue eliminar completamente la toxicidad de una muestra de microcistina de 20 ng/ml. Esta eliminación se ve sorprendentemente desfavorecida si incubamos la muestra en presencia de TiO₂.

10.2.2. Microcistina LR= 200 ng/ml

Posteriormente se realizó un ensayo similar con muestras de Microcistina a 200 ng/ml.

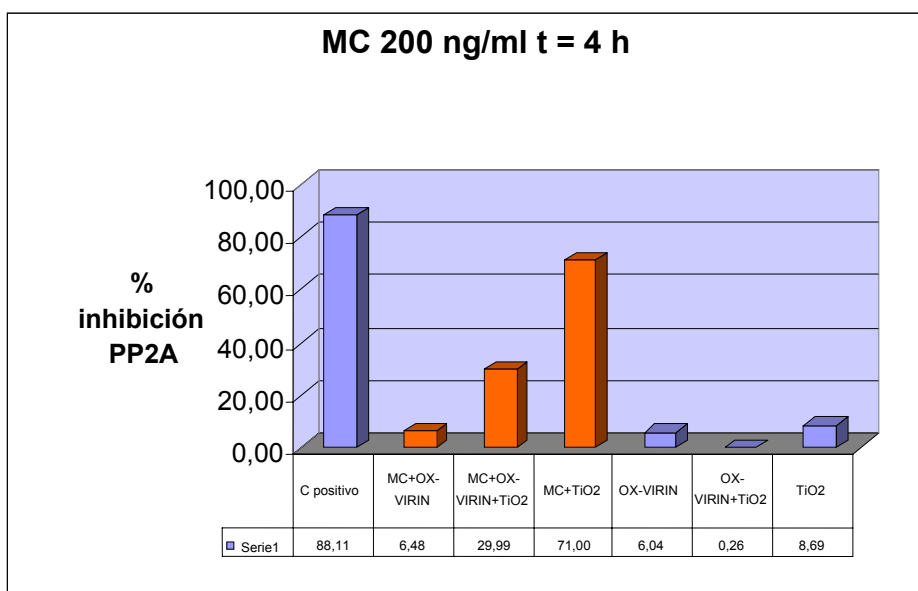
T = 2 horas

Muestras	Absorbancia 405 nm
MC-LR (Control +)	0,155
0,1% OX-VIRIN + Microcistina LR	1,3425
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,63
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,252
0,1% OX-VIRIN	1,463
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂	1,4905
2 g/l TiO ₂	1,4915



T = 4 horas

Muestras	Absorbancia 405nm
MC-LR (Control +)	0,2045
0,1% OX-VIRIN + Microcistina LR	1,609
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	1,2045
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,499
0,1% OX-VIRIN	1,6165
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂	1,716
2 g/l TiO ₂	1,571



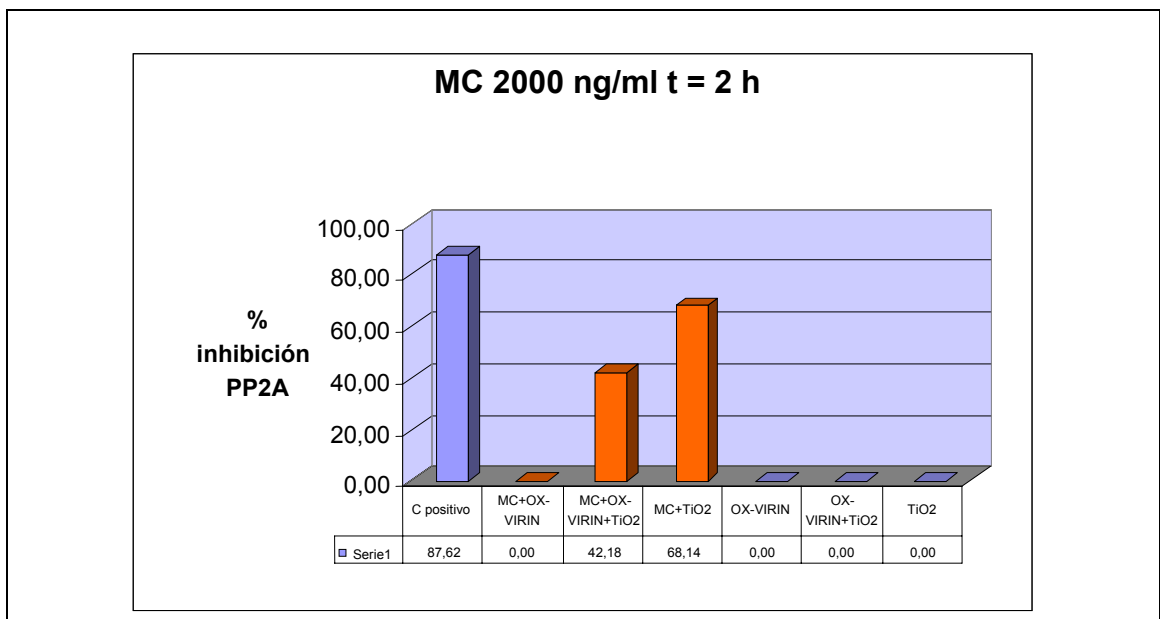
Observamos que este tratamiento también es capaz de eliminar la toxicidad de una muestra de microcistina de concentración 100 veces superior. De igual manera se observa que el TiO₂ no favorece la eliminación.

10.2.3. Microcistina LR= 2000 ng/ml

Finalmente se realizó el ensayo con Microcistina a 2000 ng/ml, concentración 1.000 veces superior a la permitida por la legislación.

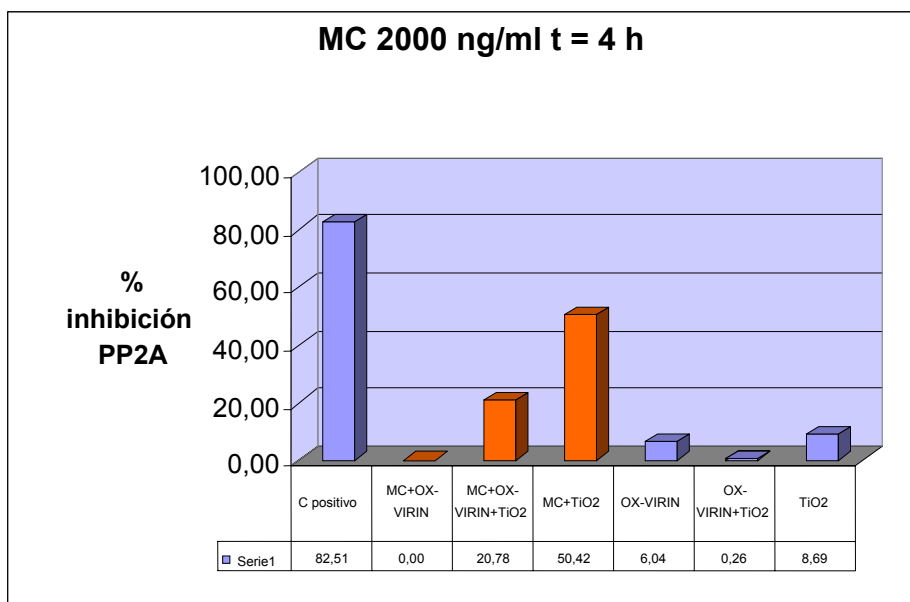
T = 2 horas

Muestras	Absorbancia 405 nm
MC-LR (Control +)	0,144
0,1% OX-VIRIN + Microcistina LR	1,2785
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,6725
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,3705
0,1% OX-VIRIN	1,463
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂	1,4905
2 g/l TiO ₂	1,4915



T = 4 horas

Muestras	Absorbancia 405nm
MC-LR (Control +)	0,301
0,1% OX-VIRIN + Microcistina LR	1,738
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	1,363
2 g/l TiO ₂ + Microcistina LR	0,853
0,1% OX-VIRIN	1,6165
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂	1,716
2 g/l TiO ₂	1,571



Los resultados obtenidos nos muestran que la utilización de OX-VIRIN al 0,1% junto con radiación ultravioleta es un método eficaz en la eliminación de microcistina, ya que elimina su toxicidad al 100% tras un tratamiento de 2 horas. Este tratamiento es capaz de eliminar microcistina a una concentración 1.000 veces superior al máximo permitido por la legislación.

10.3. Estudio de la eficacia frente a *Microcystis* sp. PCC 7806 de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN potenciado con ultravioleta y TiO₂

Una vez estudiada la acción de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN sobre microcistina, se procedió a estudiar su efecto biocida sobre *Microcystis* sp. PCC 7806, una cianobacteria tóxica productora de microcistina. Cultivos de *Microcystis* sp. ($Abs_{600}=0,3$) se sometieron a una dosis de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN del 0,1%. Con el objetivo de estudiar el posible efecto potenciador del TiO₂ sobre la capacidad oxidante del producto, a muestras de *Microcystis* sp. con OX-AGUA 2ª GENERACIÓN se le añadió TiO₂ a la concentración de 2 g/l y 0,1 g/l. Las muestras se incubaron bajo luz ultravioleta a temperatura ambiente y con agitación suave durante 2 horas.

Transcurrido este tiempo se extrajo la microcistina de las muestras mediante un protocolo de dos extracciones en metanol-TFA y tras diluir las muestras 1/10, se efectuó el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa. En el ensayo se pusieron un control negativo que no contiene *Microcystis* sp., y por tanto microcistina (no debe existir inhibición) y un control positivo consistente en cultivo de *Microcystis* sp. sin tratar con los productos. Además, como en todos los ensayos, se realizó una recta de calibrado con concentraciones crecientes de microcistina.

Las muestras fueron las siguientes:

Recta de calibrado

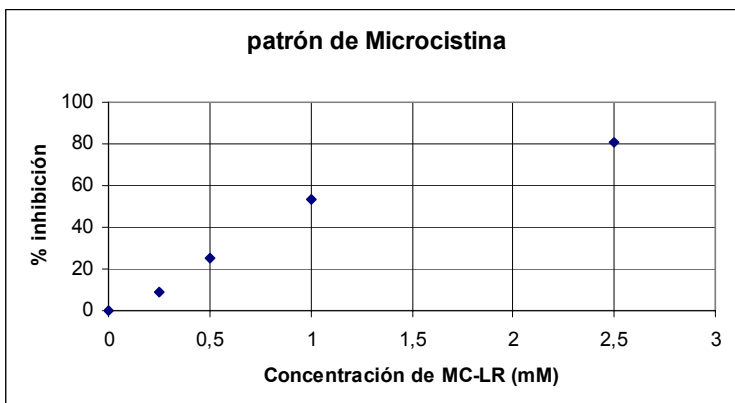
- 1- Microcistina 2,5 mM
- 2- Microcistina 1,0 mM
- 3- Microcistina 0,5 mM
- 4- Microcistina 0,25 mM
- 5- Microcistina 0 mM

Muestras

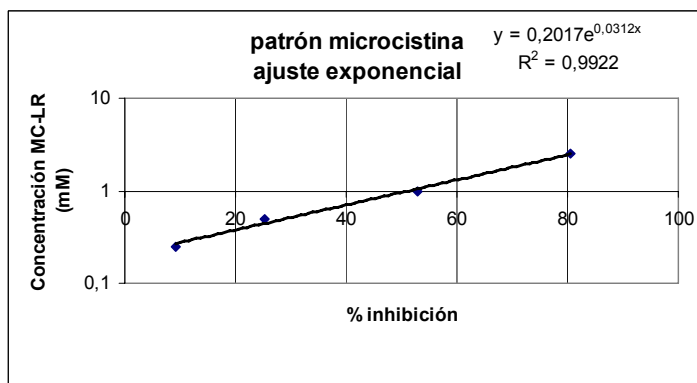
- 1- Control *Microcystis* sp.
- 2- 0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN + *Microcystis* sp.
- 3- 0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN + 2 g/l TiO₂ + *Microcystis* sp.
- 4- 0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN + 0,1 g/l TiO₂ + *Microcystis* sp.
- 5- Control negativo

Muestras de la recta de calibrado	Absorbancia 405 nm
Microcistina 2,5 mM	0,4495
Microcistina 1,0 mM	1,087
Microcistina 0,5 mM	1,7295
Microcistina 0,25 mM	2,1005
Microcistina 0 mM	2,314

Calculando el porcentaje de inhibición de la enzima PP2A a partir de los datos de absorbancia a 405 nm para cada muestra, obtenemos la siguiente representación gráfica:

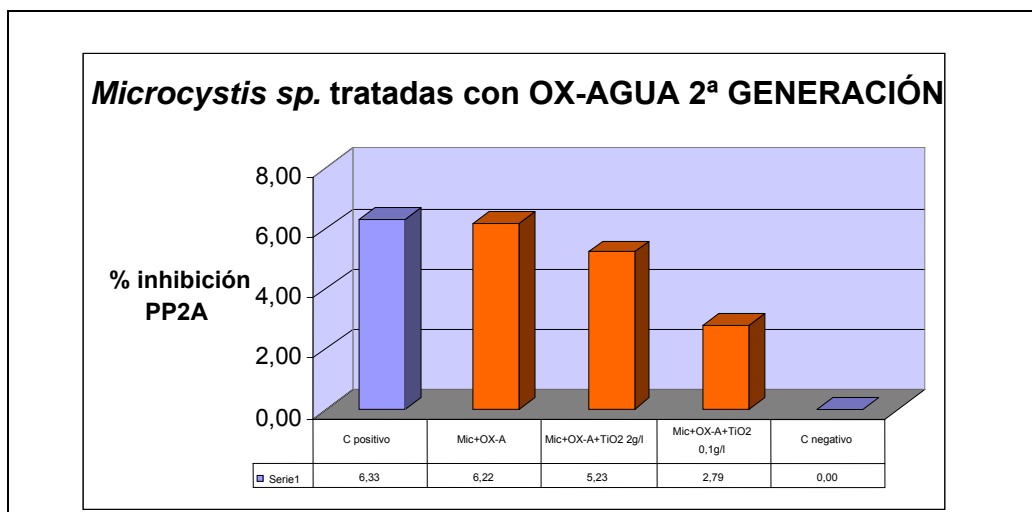


Si se realiza un ajuste exponencial a los resultados obtenidos, tenemos la siguiente recta patrón:



Los valores de absorbancia a 405 nm para las muestras problema fueron los siguientes:

Muestras	Absorbancia 405nm
Control <i>Microcystis</i> sp.	2,1675
0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN+ <i>Microcystis</i> sp.	2,17
0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN + 2 g/l TiO ₂ + <i>Microcystis</i> sp.	2,193
0,1% OX-AGUA 2ª GENERACIÓN + 0,1 g/l TiO ₂ + <i>Microcystis</i> sp.	2,2495
Control negativo	2,3255



Podemos concluir que OX-AGUA 2ª GENERACIÓN no favorece la degradación de microcistina en una muestra de *Microcystis sp.* respecto al resultado obtenido si incubamos la muestra únicamente con radiación ultravioleta. Sin embargo, sí que se mejora su destrucción si combinamos la acción de OX-AGUA 2ª GENERACIÓN con TiO_2 . De hecho, una dosis de 0,1 g/l de TiO_2 , combinada con UV y OX-AGUA 2ª GENERACIÓN, elimina mejor la toxicidad que una concentración de 2 g/l.

10.4. Estudio de la eficacia frente a *Microcystis sp.* PCC 7806 de OX-VIRIN potenciado con ultravioleta y TiO₂

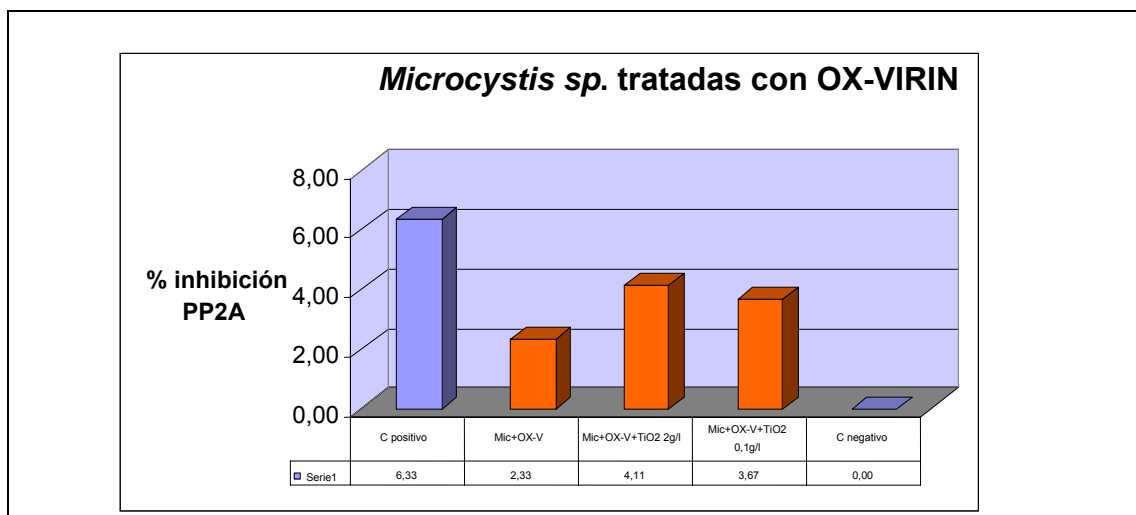
En esta serie de experimentos, se estudió el efecto de OX-VIRIN al 0,1% sobre cultivos de *Microcystis sp.* PCC 7806 (Abs₆₀₀=0,3). Asimismo, se ensayó el efecto de TiO₂ como potenciador de la actividad oxidativa de OX-VIRIN. Las muestras se incubaron bajo luz ultravioleta a temperatura ambiente y con agitación suave durante 2 horas.

Transcurrido este tiempo se extrajo la microcistina de las muestras mediante un protocolo de dos extracciones en metanol-TFA y tras diluir las muestras 1/10, se efectuó el ensayo de inhibición de la protein-fosfatasa. En el ensayo se pusieron un control negativo que no contiene *Microcystis sp.*, y por tanto microcistina (no debe existir inhibición) y un control positivo consistente en cultivo de *Microcystis sp.* sin tratar con los productos.

Las muestras fueron las siguientes:

- 1- Control *Microcystis sp.*
- 2- 0,1% OX-VIRIN + *Microcystis sp.*
- 3- 0,1% OX- VIRIN + 2 g/l TiO₂ + *Microcystis sp.*
- 4- 0,1% OX- VIRIN + 0,1 g/l TiO₂ + *Microcystis sp.*
- 5- Control negativo

Muestras	Absorbancia 405nm
Control <i>Microcystis sp.</i>	2,1675
0,1% OX-VIRIN+ <i>Microcystis sp.</i>	2,26
0,1% OX-VIRIN + 2 g/l TiO ₂ + <i>Microcystis sp.</i>	2,219
0,1% OX-VIRIN + 0,1 g/l TiO ₂ + <i>Microcystis sp.</i>	2,229
Control negativo	2,3255



Podemos concluir que OX-VIRIN favorece en gran medida la degradación de microcistina en una muestra de *Microcystis sp.* respecto al resultado obtenido si incubamos la muestra únicamente con radiación ultravioleta. Sin embargo, al igual que ocurría con las muestras de microcistina, la presencia de TiO₂ dificulta la degradación.

11. CONCLUSIONES

Diferentes ensayos realizados con los Productos OX (OX-AGUA, OX-VIRIN, OX-AIRE TORRES DE REFRIGERACIÓN, OX-AGUA 2ª GENERACIÓN), basados en peróxido de hidrógeno y ácido peracético, pueden dar lugar a la eliminación de microcistina y sus derivados tóxicos. En dichos ensayos se prueban diferentes concentraciones y modificaciones químicas de los productos. Como conclusión puede obtenerse que OX-VIRIN, en combinación con sales de hierro tiene capacidad de destrucción de la toxina, sin embargo la concentración a la que deben usarse estos productos para la eliminación total es demasiado elevada para su aplicación comercial.

Se han realizado ensayos en los que se combinan diferentes concentraciones de productos OX (OX-AGUA 2ª GENERACIÓN y OX-VIRIN) con sistemas físicos de activación, tales como radiación ultravioleta. De los resultados de dichos ensayos puede desprenderse la conclusión de que la combinación de sistemas de activación físicos con los productos OX (OX-AGUA 2ª GENERACIÓN y OX-VIRIN) permite el desarrollo de una tecnología, completamente nueva y comercialmente viable, que consigue la eliminación satisfactoria de la microcistina y cualquier otro subproducto tóxico de degradación, sin riesgo alguno para el medio ambiente.

Las dosis a las que se deben usar los productos en estos casos son aceptables para su aplicación a nivel industrial, por lo que el resto de experiencias e investigaciones que se realicen a partir de ahora irán encaminadas hacia la optimización de los parámetros que conforman dicho sistema de desinfección, tanto en sus aspectos químicos como de diseño de los sistemas y su instalación.

La combinación de radiación ultravioleta, tanto con OX-AGUA 2ª GENERACIÓN como con OX-VIRIN se manifiesta como la mejor opción de todos los sistemas/productos probados, ya que permite la eliminación en el menor tiempo posible y con las dosis más bajas de producto.

En el tiempo de realización del presente proyecto no ha sido posible la finalización de protocolos de actuación adaptados a las necesidades de OX-CTA, ya que no se ha terminado de desarrollar la tecnología del nuevo sistema de eliminación de microcistina (un prototipo). Por la misma razón no ha sido posible la realización de ensayos piloto y en instalaciones reales. Una vez se haya desarrollado un prototipo se realizará una serie de ensayos piloto y se podrán concluir dichos protocolos.

A pesar de que se va a trabajar principalmente en el desarrollo del sistema de desinfección que combine radiación ultravioleta con los Productos OX, se puede por una parte probar otros sistemas físicos, ya propuestos, como por ejemplo los ultrasonidos, o incluso abrir/continuar una línea de investigación relativa a la combinación con sales de hierro, y a la implementación en estaciones de potabilización, ya que frecuentemente se usan sales de hierro como floculante en dichas estaciones potabilizadoras.

Como aportación del desarrollo de este proyecto para la empresa OX-CTA y para la sociedad, en general podemos destacar que, gracias a esta colaboración con el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza, se han podido utilizar resultados para demostrar la actividad de los Productos OX como alguicidas y se abre una nueva expectativa que permitirá reducir los riesgos de microcistina en agua potable.

REFLEXIONES TRAS EL ESTUDIO

El riesgo sobre la salud humana de la cloración del agua es evitable. En la actualidad existen métodos de desinfección y líneas de potabilización alternativos al cloro y a los procedimientos usuales, con igual capacidad desinfectante y menor formación de compuestos clorados y bromados.

La empresa OX-CTA y el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza investigan conjuntamente en metodologías de eliminación de cianotoxinas (microcistina) mediante la utilización de Productos OX, biodegradables y respetuosos con el medio ambiente, en combinación con un método físico de desinfección. El objetivo es aumentar de forma considerable la capacidad de desinfección de los productos mediante la sinergia entre ambos sistemas, químico y físico. Estos

sistemas forman parte de las tecnologías de oxidación avanzada (AOT's) y no generan ningún tipo de subproducto tóxico ni peligroso para el medio ambiente. El funcionamiento del sistema de desinfección resultante se basará en la generación de especies químicas muy activas y de una gran eficacia frente a microorganismos y bacterias, pero de una vida muy corta y cuya degradación no implique ningún residuo.

El Sistema OX está basado en la tecnología de la fotocatalisis: Se utiliza una fuente de radiación ultravioleta, que incide sobre un material semiconductor (dióxido de titanio) inmovilizado en el interior de un reactor de fotocatalisis. Al incidir la radiación ultravioleta de longitud de onda adecuada sobre el TiO_2 , se pueden generar radicales hidroxilo, especies químicas muy reactivas y con una capacidad de oxidación superior a los oxidantes convencionales (cloro, ozono o peróxidos). Dicha generación de radicales puede verse incrementada a través de la combinación del sistema con peróxido de hidrógeno, lo que incrementa la eficacia haciendo más eficaz el sistema.

En este trabajo OX-CTA, junto con el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza, ha desarrollado una metodología utilizando los Productos OX para eliminar controladamente las cianobacterias tóxicas, así como sus cianotoxinas, las microcistinas.

El trabajo está orientado a su posible aplicación en las estaciones de tratamiento de agua (ETAP). Uno de los pasos utilizados en estas ETAP's es la coagulación-floculación. Se trata de un proceso que permite, además de rebajar la cantidad de contaminantes del agua, la eliminación de microcistina. Si se añade un paso final utilizando el Método OX puede proporcionarse un agua limpia, desinfectada y sin riesgo de toxicidad debido a microcistina, por la oxidación final de todos los productos o subproductos que pudiera haber.

Además de las alternativas propuestas como Métodos OX existen otras que podrían ser utilizadas en combinación con los mismos, como el carbón activo, que es un método que se basa en la adsorción y consiste en retirar del agua las sustancias solubles mediante el filtrado a través de un lecho de este material, consiguiéndose que las distintas sustancias a eliminar pasen a través de los poros de los que se compone, separando y reteniendo en la superficie interna de los gránulos los compuestos más pesados.

Futuras investigaciones van en la línea de rebajar dosis de actuación y ajustar parámetros del sistema, por lo tanto minimizar los costes y disminuir tiempos de actuación.

Además de las conclusiones concretas extraídas de los resultados del desarrollo del proyecto para el que el CES de Aragón nos concedió el Premio a un Proyecto de Investigación 2005 hemos considerado de interés plantear unas reflexiones que reflejan por dónde debería continuar la investigación en el control de microcistina y otras toxinas que suponen un riesgo para la salud pública.

Se debería seguir trabajando en prevención de enriquecimiento de nutrientes en masas de agua: bioseguridad (protección y restauración), aumentar estudios de monitorización de embalses/aguas brutas para agua de consumo como los que desarrollan entidades tales como CEDEX, UAM, US, MMA. Como tarea pendiente queda una evaluación más exhaustiva de los tratamientos que se hacen en las ETAPs; desarrollar métodos de detección de degradación de MC y de toxicidad sin animales vivos; buscar métodos de eliminación que no nos generen más problemas de los que ya tenemos que solucionar:

Pero ante todo hay que remarcar que el problema de microcistina y de otras toxinas es un problema que atañe a TODOS: científicos, gestores, sanitarios, salud pública, confederaciones, empresas... Cada uno con su perspectiva puede aportar datos que lleven a control del riesgo que supone la presencia de toxinas, en particular microcistina en agua de consumo humano y animal.