



Canal de
Isabel II

CUADERNOS DE I+D+i

12

Estudio sobre la dinámica
de Cianotoxinas en dos embalses de
abastecimiento de Canal de Isabel II



© Canal de Isabel II - 2010

Autores:
Antonio Quesada de Corral

Dirección del Estudio:
Joseba Iñaki Urrutia Gutiérrez

Agradecimientos:

Queremos agradecer la colaboración en los trabajos que acompañaron la ejecución de este proyecto a los siguientes investigadores: Samuel Cirés, Lars Wörmer, David Carrasco, Sergio Puente, Celia Ratón, Helena Galán y a la coordinación del estudio realizada por Rafael Heredero Rodríguez, de la Subdirección de IDi de Canal de Isabel II

ISBN: 978-84-938193-0-9
Depósito Legal: M-39984-2010
Maquetación e impresión: Grupo Erreuve



CUADERNOS DE I+D+i

12

Estudio sobre la dinámica de cianotoxinas en dos embalses
de abastecimiento de Canal de Isabel II



EXCLUSIÓN DE RESPONSABILIDAD



Las afirmaciones recogidas en el presente documento reflejan la opinión de los autores y no necesariamente la de Canal de Isabel II.

Tanto Canal de Isabel II como los autores de este documento declinan todo tipo de responsabilidad sobrevenida por cualquier perjuicio que pueda derivarse a cualesquiera instituciones o personas que actúen confiadas en el contenido de este documento, o en las opiniones vertidas por sus autores.

PRESENTACIÓN

Los cuadernos de I+D+i de Canal de Isabel II forman parte de la estrategia de gestión del conocimiento de la empresa y del desarrollo del Plan de Investigación, Desarrollo e Innovación.

Son elemento de difusión de proyectos e iniciativas desarrollados y auspiciados desde Canal de Isabel II para la innovación en las áreas relacionadas con el servicio de agua en el entorno urbano.

Exponen las diferentes problemáticas abordadas en cada proyecto junto con los resultados obtenidos. La intención al difundirlos mediante estas publicaciones es compartir las experiencias y conocimientos adquiridos con todo el sector de servicios de agua, con la comunidad científica y con cuantos desarrollan labores de investigación e innovación. La publicación de estos cuadernos pretende contribuir a la mejora y eficiencia de la gestión del agua y, en consecuencia, a la calidad del servicio prestado a los ciudadanos.

Los cuadernos de I+D+i ya publicados son los que figuran en la presente tabla.

Nº colección	Cuadernos Investigación, Desarrollo e Innovación publicados
1	Transferencias de derechos de agua entre demandas urbanas y agrarias. El caso de la Comunidad de Madrid
2	Identificación de rachas y tendencias hidrometeorológicas en el ámbito del sistema de Canal de Isabel II
3	Participación de Canal de Isabel II en el Proyecto Internacional de Eficiencia en la Gestión (IDMF)
4	Microcomponentes y factores explicativos del consumo doméstico de agua en la Comunidad de Madrid
5	El agua virtual y la huella hidrológica en la Comunidad de Madrid
6	Estudio de potenciales de ahorro de agua en usos residenciales de interior
7	Investigación sobre potenciales de eficiencia con el empleo de lavavajillas
8	Precisión de la medida de los consumos individuales de agua en la Comunidad de Madrid
9	Proyecto de investigación para la definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones de Pez Cebra
10	Eficiencia en el uso del agua en jardinería en la Comunidad de Madrid
11	Técnicas de teledetección y sistemas de información geográfica para la evaluación de la demanda de agua para usos de exterior en la Comunidad de Madrid

FICHA TÉCNICA

Título del proyecto	Estudio sobre la dinámica de cianotoxinas en dos embalses de la Comunidad de Madrid.
Línea de investigación	Agua de consumo y salud.
Unidades de Canal de Isabel II implicadas	<ul style="list-style-type: none">• Subdirección de Calidad de las Aguas.• Subdirección de I+D+i.
Participación externa	Universidad Autónoma de Madrid.
Objeto y justificación del proyecto	<p>El Real Decreto 140/2003 de control de las aguas de abastecimiento, regula la cantidad de microcistina, una toxina producida en ocasiones por cianobacterias presentes en las algas cianofíceas o verdeazuladas, que puede producir efectos citotóxicos, neurotóxicos y hepatotóxicos.</p> <p>Las cianotoxinas suponen un riesgo para la calidad de las aguas de los embalses, por lo que es importante estudiar los mecanismos vitales de las cianobacterias para poder predecir la aparición, evolución y finalización de los afloramientos llamados "blooms", así como conocer sus estados latentes y la toxicidad asociada.</p>
Contribución al estado del arte	El proyecto representa un avance en el conocimiento del ciclo vital de las cianobacterias y las cianotoxinas que generan. Los resultados alcanzados se utilizarán para desarrollar estrategias de tratamiento, control y predicción.
Resumen del desarrollo del proyecto e hitos relevantes	<p>En dos embalses de Canal de Isabel II se han desarrollado los siguientes experimentos, realizados desde julio a octubre de 2007:</p> <ul style="list-style-type: none">• Mediante la instalación de trampas de sedimentación, sobre el metalimnion y a tres metros sobre el fondo del embalse, se evaluó la magnitud de los procesos sedimentarios de las cianotoxinas producidas, la relevancia de los fenómenos de degradación de la toxina, así como la importancia de la resuspensión de ésta y su vuelta a la columna de agua.• Con el ensayo de microcosmos se evaluó la capacidad natural de degradación de las microcistinas. Para esto, se extrajeron las toxinas durante un afloramiento de cianobacterias tóxicas y se pusieron en contacto con las bacterias presentes en la columna de agua. El agua filtrada se dispone en microcosmos ("cubitainer" de 15 litros de capacidad), tres de éstos en presencia de la toxina aislada y de las poblaciones naturales de bacterias, mientras que otros dos funcionan, a modo de control, con toxinas, pero habiendo sido esterilizados, para estimar otras fuentes de degradación de la toxina (adsorción, radiación UV, temperatura).
Resumen de resultados obtenidos	<p>Los resultados del estudio en dos embalses reflejaron, además de una baja proporción de cianobacterias tóxicas durante el año de estudio, las siguiente manifestaciones:</p> <ul style="list-style-type: none">• Se sugiere que los sedimentos pueden actuar como un almacén de toxinas, en su forma particulada, lo que puede favorecer la vuelta al sistema ante procesos de resuspensión del mismo (por ejemplo con la circulación del embalse). No se han observado diferencias significativas en las tasas de degradación de las diversas especies químicas de las cianotoxinas.• Las formas particuladas de las microcistinas son más resistentes a la degradación y depredación. Sin embargo, cuando las toxinas se encuentran en disolución, se produce una biodegradación natural de las mismas, con una semana de retardo en condiciones experimentales. Lentamente al inicio, para acelerarse el proceso en la segunda semana, hasta degradar todas las microcistinas en ese período.
Líneas de investigación abiertas para la continuación de los trabajos	<ul style="list-style-type: none">• Estudio de los inóculos de cianobacterias tóxicas en los sedimentos y procesos que conducen a su desarrollo masivo.• Papel de las bacterias capaces de degradar la cianotoxina microcistina en embalses de la Comunidad Autónoma de Madrid.

RESUMEN EJECUTIVO

Las cianobacterias son algas potencialmente productoras de toxinas y están limitadas en aguas para abastecimiento en España por el Real Decreto 140/2003 a un valor menor de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas, que es la cianobacteria más común.

El conocimiento existente es muy escaso sobre los efectos, la cuantificación, el tratamiento y la dinámica vital de las cianobacterias, desde sus mecanismos de producción hasta su dispersión en la columna de agua, sedimentación y su desaparición por degradación bacteriana.

Canal de Isabel II ha desarrollado este Proyecto de investigación en colaboración con la Universidad Autónoma de Madrid, con el objetivo de avanzar en el conocimiento de las cianobacterias para poder predecir la aparición de los afloramientos algales, identificar los estados latentes de las cianobacterias, conocer las tasas de sedimentación, estudiar la toxicidad asociada y su degradación y desarrollar las estrategias de prevención, control y tratamiento de las cianobacterias más apropiadas para cada momento.

En los embalses de Santillana y Valmayor del Canal de Isabel II se han desarrollado los siguientes experimentos entre julio y octubre de 2007:

- Análisis de las **tasas de sedimentación** de las toxinas que permanecen asociadas a restos celulares o células en degradación. Mediante la instalación de trampas de sedimentación, sobre el metalimnion y a tres metros sobre el fondo del embalse, se evaluó la magnitud de los procesos sedimentarios de las cianotoxinas producidas, la relevancia de los fenómenos de degradación de la toxina, así como la importancia de la resuspensión de ésta y su vuelta a la columna de agua.
- Estudio de la **biodegradación** por bacterias de estos compuestos en microcosmos. Con el ensayo de microcosmos se evaluó la capacidad natural de degradación de las microcistinas. Para esto, se extrajeron las toxinas durante un afloramiento de cianobacterias tóxicas y se pusieron en contacto con las bacterias presentes en la columna de agua. El agua filtrada se dispuso en cinco contenedores "cubitainer" de 15 litros de capacidad, tres de éstos en presencia de la toxina aislada y de las poblaciones naturales de bacterias, mientras que los otros dos funcionaban a modo de control, con toxinas pero habiendo sido esterilizados para estimar otras fuentes de degradación de la toxina (adsorción, radiación UV o temperatura).

El análisis de sedimentación en ambos embalses se realizó en un año con una baja proporción de cianobacterias tóxicas, principalmente microcistinas. La degradación de células y toxinas en el proceso de sedimentación es mínima. El estudio concluye que los sedimentos pueden actuar como un almacén de toxinas, en su forma particulada, lo que puede favorecer la vuelta al sistema ante procesos de resuspensión del mismo, por ejemplo con la circulación del embalse.

El estudio de biodegradación por bacterias naturales muestra que las formas particuladas de las microcistinas son más resistentes a la degradación y depredación. Sin embargo, cuando las toxinas se encuentran en disolución, se produce una biodegradación natural de las mismas en condiciones experimentales. Las tasas de biodegradación son bifásicas. Comienza lentamente durante la primera semana, para acelerarse el proceso en la segunda hasta degradar todas las microcistinas en ese período. No se han observado diferencias significativas en las tasas de degradación de las diversas especies químicas de las cianotoxinas.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN página 14

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO página 18

3. METODOLOGÍA página 22

- 3.1. Analizar las tasas de sedimentación de las toxinas que permanecen asociadas a restos celulares o células en degradación
- 3.2. Ensayo de microcosmos para evaluar la capacidad natural de degradación de las microcistinas
- 3.3. Concentración de toxina

4. RESULTADOS página 30

- 4.1. Tasa de sedimentación de las toxinas
- 4.2. Degradación de microcistinas

5. CONCLUSIONES página 54

- 5.1. Respecto al análisis de las tasas de sedimentación
- 5.2. Proceso de sedimentación en la columna de agua
- 5.3. Procesos de biodegradación natural
- 5.4. Tasas de biodegradación bifásicas

ANEXOS página 58

- Anexo 1. Glosario de términos
- Anexo 2. Referencias
- Anexo 3. Índice de figuras
- Anexo 4. Índice de tablas

1

Introducción

Entre los muchos inconvenientes que se puede encontrar una empresa de abastecimiento en sus recursos naturales merece la pena destacar la abundancia de fitoplancton, familiarmente conocido como "algas".

El desarrollo extraordinario de algas en los embalses suele estar ligado a los aportes de sales de nitrógeno y fósforo provenientes de vertidos puntuales (las depuradoras), o difusos (ganado, vegetación y otros usos del terreno).

Pero no todas las algas son igual de problemáticas en el tratamiento de las aguas en la Estación de Tratamiento de Agua Potable, en adelante ETAP. Hay que destacar la presencia de aquellas que disponen de sistemas de flotación que dificultan su precipitación, empeoran las operaciones de coagulación en el tratamiento, aportan sustancias sápidas, difíciles de retirar y además, potencialmente pueden producir sustancias tóxicas. Estas son las denominadas cianobacterias, o cianofíceas¹, organismos simples, cuya evolución ha sido escasa, según reflejan los registros fósiles, que han colonizado todos los medios naturales y que se han adaptado perfectamente a vivir en cualquier embalse, sobre todo los que reciben altas concentraciones de sales de fósforo, gracias a su capacidad de obtener de la atmósfera el nitrógeno preciso para su desarrollo.

Todos los embalses que el Canal de Isabel II gestiona presentan, en un momento u otro del año, el florecimiento de cianofíceas (Gordo et al., 1999). En algunos casos su presencia es fugaz y pasa desapercibida, mientras que en otros (El Atazar) es capaz de llamar la atención por colorear las masas de agua de un color rojizo, entre otros inconvenientes. Algunas de estas algas son productoras potenciales de cianotoxinas (Huisman et al., 2005), sustancias que presentan como efectos más relevantes sobre mamíferos, aves o peces, afecciones hepatotóxicas, neurotóxicas o citotóxicas que pueden concluir en la muerte de los individuos.

Mediante mecanismos aún no determinados, dentro de una población de cianofíceas, se desarrollan uno o varios clones con capacidad de producir cianotoxinas, que normalmente acaban en el medio acuático. La más conocida de las cianotoxinas es la microcistina, aunque en propiedad habría que decir las microcistinas², ya que en la actualidad se conocen más de 70 congéneres de este compuesto.

Las empresas de abastecimiento se regulan en España por el Real Decreto 140/2003, donde aparece una limitación de la microcistina con un valor paramétrico³ coincidente con el valor guía recomendado por la Organización Mundial de la Salud de 1 µg L⁻¹ de microcistinas. En el caso de nuestro país, se están realizando notables esfuerzos para monitorizar estos compuestos por las diferentes autoridades competentes; compañías de distribución, ayuntamientos y confederaciones hidrográficas. En algunas ocasiones estos esfuerzos se centran en la monitorización de la toxina y no en el estudio de las cianobacterias productoras, momentos de aparición de éstas, causas de la aparición, sucesión ecológica y distribución de las toxinas.

Las microcistinas son compuestos intracelulares que no son excretados al medio circundante en condiciones normales, sino en momentos de lisis celular debido a la muerte de la célula (Chorus y Bartram, 1999). En la mayor parte de los ecosistemas acuáticos donde aparecen cianobacterias formadoras de toxinas, las máximas concentraciones de estos compuestos se encuentran en el interior celular y sólo una pequeña parte en disolución en el agua circundante (Sivonen y Jones, 1999). Esta distribución de toxinas ocurre, en ocasiones, incluso después de la lisis celular. Este proceso de 'desaparición' de las microcistinas puede ser debido a varios

¹ Cianofícea: Algas verde-azuladas, también conocidas como cianobacterias. Organismo unicelular, de apenas unos micrómetros de tamaño. Apartado Glosario de términos.

² Microcistinas: Toxinas producidas por algunas especies de cianofíceas, entre las que destacan los géneros de *Microcystis*, *Anabaena* y *Aphanizomenon*, entre otras. Apartado Glosario de términos.

³ Valor paramétrico: Valor representativo de una población de datos, como la Media o la Desviación Típica. Apartado Glosario de términos.

factores distintos tales como la degradación biológica por bacterias (Christoffersen et al., 2002), la degradación física por radiación UV (Tsuji et al., 1995) o el hundimiento de los restos celulares en la columna de agua (Rapala et al., 1994).

Datos previos en embalses de la Comunidad de Madrid demuestran que la biodegradación de las cianotoxinas tiene lugar de manera espontánea en la columna de agua cuando se encuentran en disolución (Wörmer, 2004), pero los factores que la controlan no han podido ser dilucidados. La literatura internacional es notablemente escasa en información sobre la biodegradación de estos compuestos en ambientes naturales (Rapala et al., 1994) y además esta escasa información se refiere a ecosistemas escandinavos cuya dinámica podría ser netamente distinta a la de ambientes mediterráneos.

En este proyecto se había propuesto el estudio de la dinámica de la distribución de las microcistinas en el embalse de Santillana, en el que habitualmente se encuentran florecimientos de cianobacterias productoras de microcistinas. Sin embargo, en este embalse en 2007 no apareció ningún florecimiento de cianobacterias productoras de microcistinas, suficientemente prolongado en el tiempo, que permitiera obtener unas conclusiones contundentes.

De esta manera, se decidió realizar en paralelo el mismo estudio en el embalse de Valmayor. El estudio se ha realizado analizando, por un lado, la distribución de las toxinas una vez producidas en diferentes lugares de la columna de agua y por otro lado, su degradación en bioensayos por poblaciones bacterianas naturales.

2

Objetivos del proyecto

En este proyecto se estableció como objetivo primario el estudiar la dinámica de las microcistinas, desde su producción hasta su dispersión en la columna de agua y su desaparición por degradación bacteriana.

Los objetivos pormenorizados de esta propuesta son los siguientes:

- **Objetivo 1.** Analizar las tasas de sedimentación de las toxinas que permanecen asociadas a restos celulares o células en degradación.
- **Objetivo 2.** Ensayo de microcosmos para evaluar la capacidad natural de degradación de microcistinas.

3

Metodología

3.1. Analizar las tasas de sedimentación de las toxinas que permanecen asociadas a restos celulares o células en degradación

Se instalaron trampas de sedimento con tres cilindros, Figura 1; a dos profundidades, (por encima del metalimnion⁴, y a 3 metros por encima del fondo del embalse), que se vaciaron con frecuencia mensual; en ellas se analizó la composición taxonómica de las partículas, el contenido en clorofila, el contenido en carbono orgánico, el peso seco y libre de cenizas, así como el contenido en microcistinas.

Figura 1. Trampa de sedimento dispuesta en 2007. Embalses de Santillana y Valmayor



Para evitar la entrada de luz en el material sedimentado cada uno de los vasos se cubre, completamente, con cinta aislante negra.

En el embalse de **Santillana** las muestras provienen de las siguientes fechas:

- 17/07/2007 (sólo agua),
- 01/08/2007,
- 13/08/2007,
- 11/09/2007 (no se incluyen las trampas hipolimnéticas por estar demasiado cerca del fondo), y
- 22/10/2007.

En el embalse de **Valmayor** las fechas de muestreo fueron las siguientes:

- 13/09/2007,
- 27/09/2007,
- 15/10/2007 y
- 29/10/2007

Figura 2. Sistema de tres boyas y plataformas flotantes



⁴ Metalimnion: Gradiente máximo de temperatura que se produce en las masas de agua durante la estación cálida. Separa dos capas, una más superficial o epilimnion, de otra, más profunda o hipolimnion. Apartado Glosario de términos.

3.1.1. Composición taxonómica

Se analiza mediante dos tipos de determinaciones, la fluorométrica⁵ y la microscópica.

Los pigmentos fotosintéticos de las algas son capaces de absorber luz de una longitud de onda -ante una excitación de baja energía- y emitir con longitud distinta, pero de forma característica para los principales grupos de algas.

La determinación fluorométrica *in situ* permite asignar la clorofila determinada *in vivo* a los diferentes grupos algales: cianobacterias, algas verdes, diatomeas y criptofitas.

La determinación microscópica se hizo siguiendo la metodología de Komarek y Anagnostidis (1999), y Sanchis y colaboradores (2004), en muestras tras la utilización de técnicas de sedimentación y de flotación.

3.1.2. Contenido en Clorofila

Se analizó extrayendo las clorofilas de las partículas mediante metanol al 90%, durante 24h a 4° C y empleando las técnicas espectrofotométricas habituales (Marker et al 1980).

3.1.3. Peso seco y libre de cenizas y contenido de carbono

Se analizaron pesando, en filtros de fibra de vidrio pretarados, cierta cantidad de material de las trampas de sedimento, tras su secado a 105° C, durante 24 h y tras su incineración en horno de mufla⁶ a 475° C durante 24h.

3.1.4. Contenido en microcistinas

Se analizó, extrayendo las microcistinas con metanol al 90% y tras evaporar y cambiar de solvente analizando su contenido en dichas toxinas por cromatografía líquida (HPLC⁷), siguiendo los gradientes y condiciones de Lawton y colaboradores (1994).

⁵ Determinación fluorométrica: Método analítico para la determinación de elementos traza. Está basado en la capacidad de ciertos metales para ser transformados en complejos orgánicos asociados con iones fluorescentes, que pueden absorber luz de una longitud de onda y emitir con longitud distinta. A esta emisión se denomina fluorescencia y es proporcional a la concentración del analito a determinar. Apartado Glosario de términos.

⁶ Horno de Mufla: Cámara cerrada con un interior (cámara de cocción) recubierto de material refractario y un exterior aislante. Puede alcanzar temperaturas de 1.500° C. En el análisis químico suele utilizarse para medir inorgánica o cenizas de una muestra. Apartado Glosario de términos.

⁷ HPLC: High-Performance Liquid Chromatography. Cromatografía líquida de alta precisión. Apartado Glosario de términos.

3.2. Ensayo de microcosmos para evaluar la capacidad natural de degradación de microcistinas

Durante los periodos de desarrollo de las algas, realizamos bioensayos, con muestras naturales obtenidas del embalse de Valmayor, que permitieron estudiar la biodegradación de las microcistinas por bacterias. El ensayo en microcosmos⁸ (Cubitainer⁹ de 15 litros, Figura 3) consiste en la extracción de las toxinas contenidas en la biomasa algal, su puesta en contacto con las bacterias presentes en la columna de agua y el seguimiento de la desaparición de la toxina.

La extracción de las toxinas presentes en la masa de agua se realizó tras retener la biomasa algal en filtros y su posterior extracción en solución metanólica. Tras la clarificación y el lavado con cambios de disolvente se determinó la concentración inicial de toxina. El agua del embalse, de la misma zona donde se ha obtenido la biomasa algal, se filtró por filtros GFF¹⁰ que retienen todas las partículas mayores de 0,7 µm, dejando exclusivamente la mayor parte de las bacterias, que suelen ser menores de ese tamaño.

Figura 3. Cubitainer



⁸ Ensayo en microcosmos: Ensayos o experimentos a pequeña escala, normalmente desarrollados en el laboratorio, con unas condiciones controladas concretas. Apartado Glosario de términos.

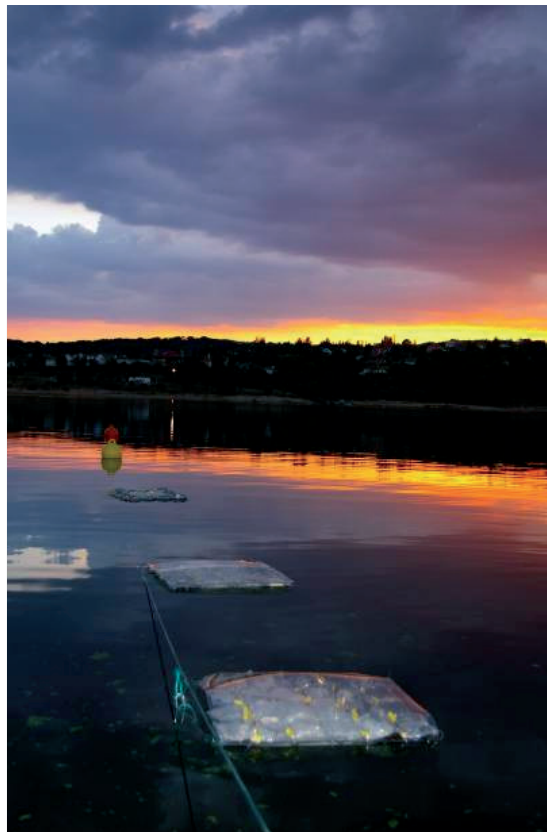
⁹ Cubitainer: Contenedores de diversas capacidades, construido en materiales plásticos. Puede tener sistemas de llenado progresivo y tapado hermético. Apartado Glosario de términos.

¹⁰ GFF: Filtros GFF: Filtros Glass Filter, de tamaño de poro "F", marca comercial Millipore.

El agua filtrada se dispone en microcosmos (Cubitainer, Figura 4). Tres de ellos, en presencia de la toxina aislada y de las poblaciones naturales de bacterias; mientras que otros dos funcionaron a modo de control, con toxinas, pero habiendo sido esterilizados para ver otras fuentes de desaparición de la toxina (adsorción, radiación ultravioleta, temperatura, etc.,).

Se analizaron las poblaciones de bacterias por citometría de flujo. Se utilizó el equipo (Beckman Coulter) Cytomics FC 500 MPL, tras la tinción de los ácidos nucleicos de las bacterias con el fluorocromo SITO 9. Los recuentos se realizaron añadiendo una suspensión calibrada de microesferas y se estimaron los individuos utilizando los gráficos de complejidad, tamaño y fluorescencia.

Figura 4. Cubitainer flotante



3.3. Concentración de toxina

Microcistinas (MC)

Se determina en fracción sestónica¹¹ por Cromatografía Líquida (HPLC¹²), lo que permite informar sobre la presencia cierta de las diferentes especies químicas (de las más de 70 existentes), y las concentraciones de cada una de las que existen patrones comerciales, aspecto fundamental para interpretar la toxicidad potencial de cada muestra.

La metodología HPLC fue la siguiente: se extrajeron las microcistinas con metanol al 90%; los extractos se centrifugaron a 12.500 *g*, a temperatura ambiente, durante 10 minutos y se pasaron a través de un filtro de teflón (PTFE¹³) de 4 milímetros de diámetro y 0,5 μm de tamaño de poro. Finalmente se analizaron las microcistinas en fracciones de 0,15 mililitros.

El equipo de HPLC utilizado fue de la casa Waters, modelo 2690 "Alliance", dotado de un inyector automático y conectado en serie con un detector con *array* de diodos, modelo 996. Este sistema permite registrar simultáneamente el tiempo de retención de los distintos compuestos fraccionados y su espectro de absorción, las dos características utilizadas para la identificación de las diferentes microcistinas. Como éstas presentan un máximo de absorción a 238-239 nm, se eligió como longitud de onda de referencia en los cromatogramas 238 nm.

Las características de la columna empleada fueron: Purospher C-18 (Merck), de 4,6 x 250 mm, con partículas de 5 μm de diámetro. La separación cromatográfica se realizó empleando el gradiente binario de acetonitrilo-trifluoroacético y agua trifluoroacético, que es una modificación del descrito por Lawton (1994).

La velocidad de flujo fue 1 mL min⁻¹, y el tiempo de cromatografía 50 minutos. Los patrones comerciales de microcistinas MC-LR, MC-RR, MC-YR utilizados fueron de la casa Calbiochem. En las muestras se han detectado otras toxinas que mostraron concentraciones muy importantes y que hemos atribuido a la variante FR, dado su tiempo de retención y su espectro de absorción en el ultravioleta (UV), pero dado que no se dispone de estándares puros de dicha toxina no podemos asegurar que la asignación sea correcta. De cualquier manera, este compuesto se ha analizado por espectrometría de masas para asegurar la asignación correcta.

¹¹ Fracción sestónica: Fracción del material sólido particulado, que se encuentra en suspensión en una masa de agua. Está compuesto por el Plancton, o materia viva; y el Tripton, o materia no viva. Apartado Glosario de términos.

¹² HPLC: High-Performance Liquid Chromatography. Cromatografía líquida de alta resolución. Apartado Glosario de términos.

¹³ PTFE: Filtro Teflón Poli Fluoro Etileno.

4

Resultados

4.1. Tasa de sedimentación de las toxinas

4.1.1. Embalse de Santillana

4.1.1.1. Proporciones de grupos algales, concentración de clorofila y taxonomía

En subsuperficie, lugar de la máxima concentración de clorofila (Cl) de toda la columna de agua, se aprecia cómo la proporción de cianobacterias fue elevada desde el mes de agosto, suponiendo valores por encima del 30 por ciento de la biomasa total de fitoplancton.

En el mes de octubre las cianobacterias alcanzaron la máxima proporción. Se dieron valores superiores al 80 por ciento de la biomasa total, coincidiendo además con valores elevados de biomasa de fitoplancton $66 \mu\text{g Cl L}^{-1}$. Durante el periodo de muestreo las concentraciones de clorofila total en esta capa de agua oscilaron entre 20 y $73 \mu\text{g Cl L}^{-1}$.

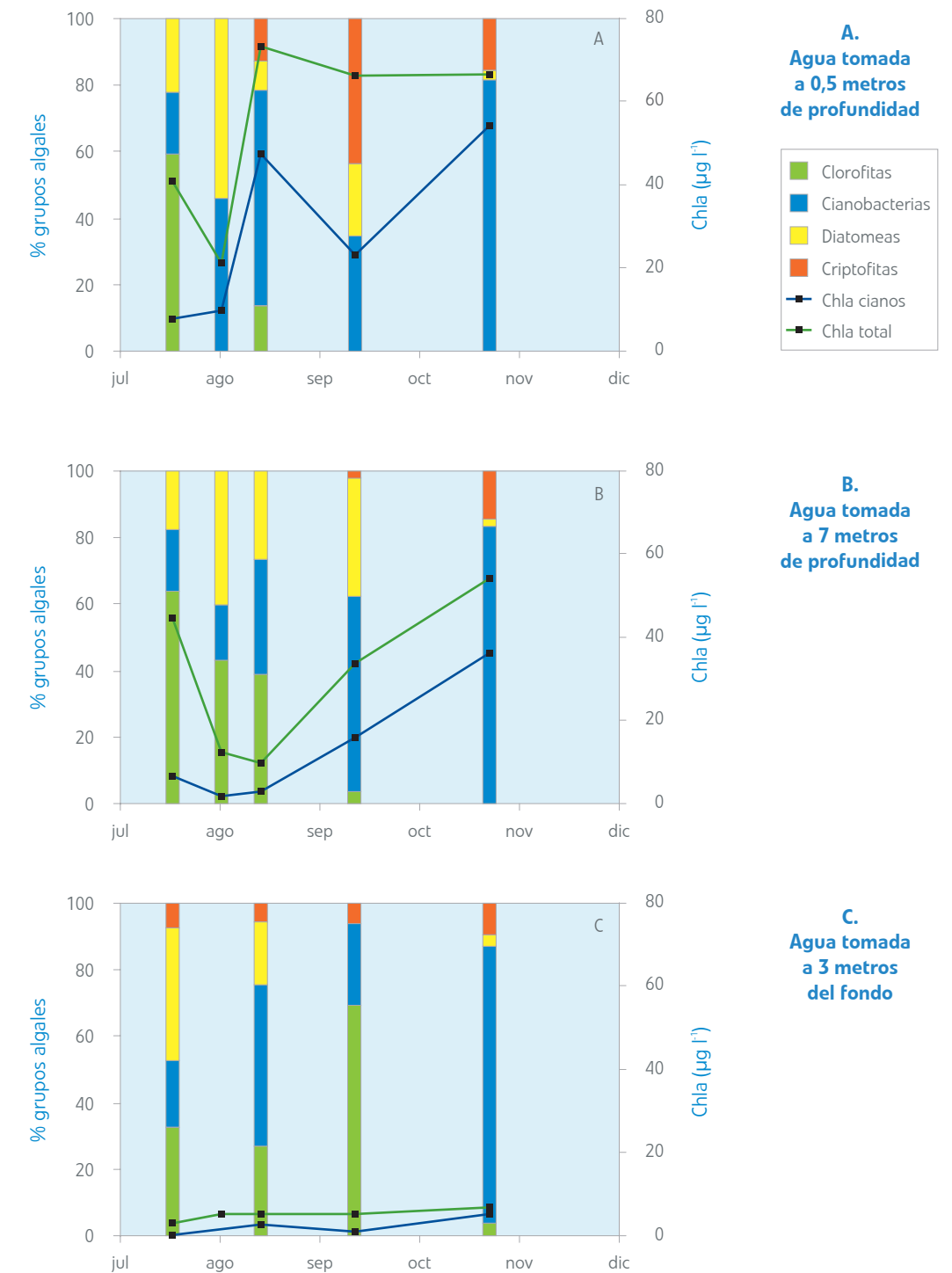
Analizando las proporciones de los grupos algales en las muestras obtenidas sobre el **metalimnion** (con una profundidad de 7 metros) observamos que ha ocurrido una selección de los grupos, lo que nos indica que el **epilimnion**¹⁴ no es homogéneo en todos los momentos. De esta manera, las capas más profundas del **epilimnion** están proporcionalmente enriquecidas en algas verdes y diatomeas y empobrecidas en cianobacterias (las algas verdes pasan de un valor promedio del 14,6 por ciento en subsuperficie, al 29,9 por ciento a 7 metros). Por otro lado, el incremento de biomasa registrado en el segundo muestreo del mes de agosto en subsuperficie que se debió a cianobacterias no apareció en paralelo en la muestra de 7 metros, lo que indica la gran tendencia a la flotación de las cianobacterias que aparecieron en ese momento. De hecho, el aumento de la presencia de cianobacterias de esa muestra de media profundidad, se evidencia en el muestreo de un mes después, coincidiendo con el declive en subsuperficie de dicha población. Por otro lado, las proporciones de grupos algales fueron muy similares en el último muestreo del mes de octubre (Figura 5) debido probablemente a los procesos de mezcla y desestratificación de la columna de agua que homogenizaron el fitoplancton al menos en el **epilimnion**.

Estudiando los resultados obtenidos de la muestra de agua **hipolimnética**¹⁵ (3 metros sobre el fondo del embalse) observamos en primer lugar, que la concentración total de clorofila fue muy inferior, alrededor del 10 por ciento de los valores registrados en las capas superficiales. En cuanto a la proporción de los grupos algales, se evidencia una estructura de grupos netamente distinta, con un mayor aumento de la proporción de algas verdes sobre el resto de los grupos. La disminución de la concentración de clorofila en el **hipolimnion** era de esperar, debido a los procesos de dilución de los organismos producidos en capas superficiales que al sedimentar se diluyen en una capa con concentraciones muy inferiores. Sin embargo, la variación de la estructura de la comunidad debe ser explicada considerando procesos diferenciales en la sedimentación (flotación) o bien procesos de depredación sobre grupos o clases de tamaño específicas.

¹⁴ Epilimnion: En una masa de agua estratificada, es la capa superior, situada por encima del metalimnion. Ver apartado Glosario de términos.

¹⁵ Hipolimnion: En una masa de agua estratificada, es la capa inferior, situada por debajo del metalimnion. Ver apartado Glosario de términos.

Figura 5. Proporción relativa de grupos algales y concentración de clorofila total y clorofila de cianobacterias. Embalse de Santillana, temporada 2007



En subsuperficie encontramos una alta diversidad de cianobacterias dominada, en la primera parte del periodo de muestreo, por *Aphanizomenon flos-aquae* y *Anabaena flos-aquae* (Figuras 6 y 7). En la segunda parte dominaron las *Woronichinia naegeliana* (Figura 8) disminuyendo el número de taxones de cianobacterias potencialmente tóxicas.

Figura 6. *Aphanizomenon flos-aquae* y *Microcystis flos-aquae*. Muestras de Santillana
La barra representa 50 μm

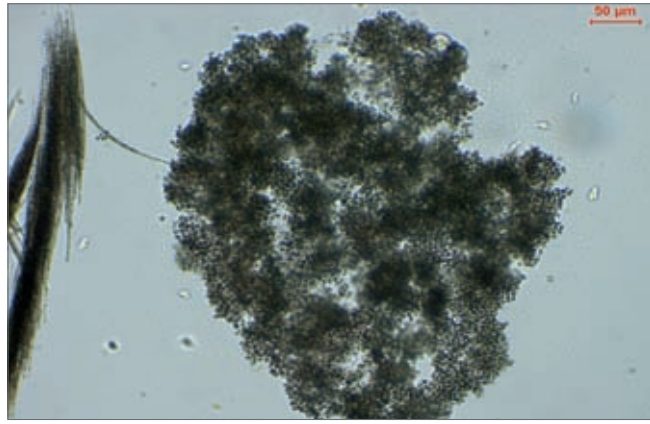


Figura 7. *Anabaena flos-aquae*. Muestras de Santillana. La barra de escala representa 10 μm

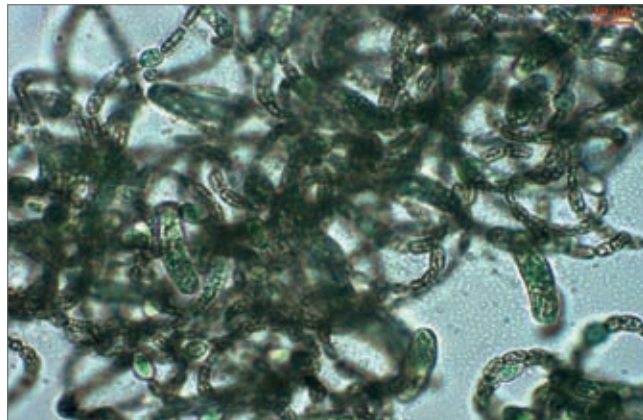
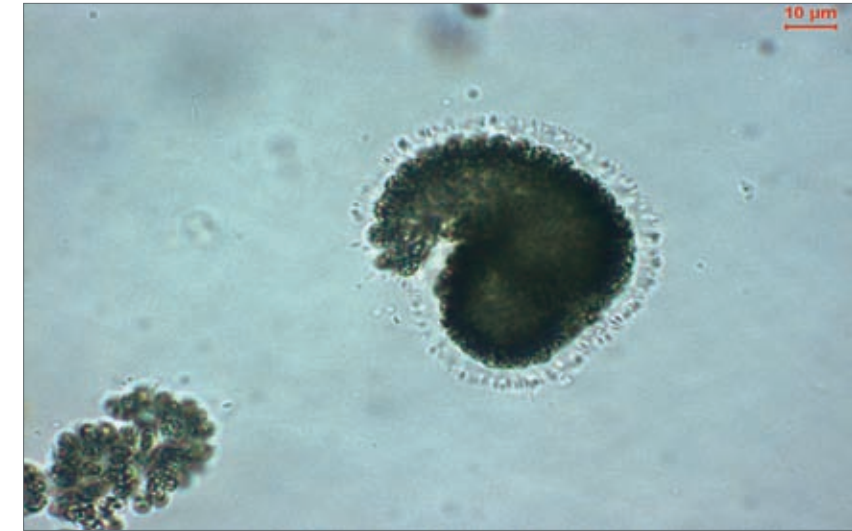
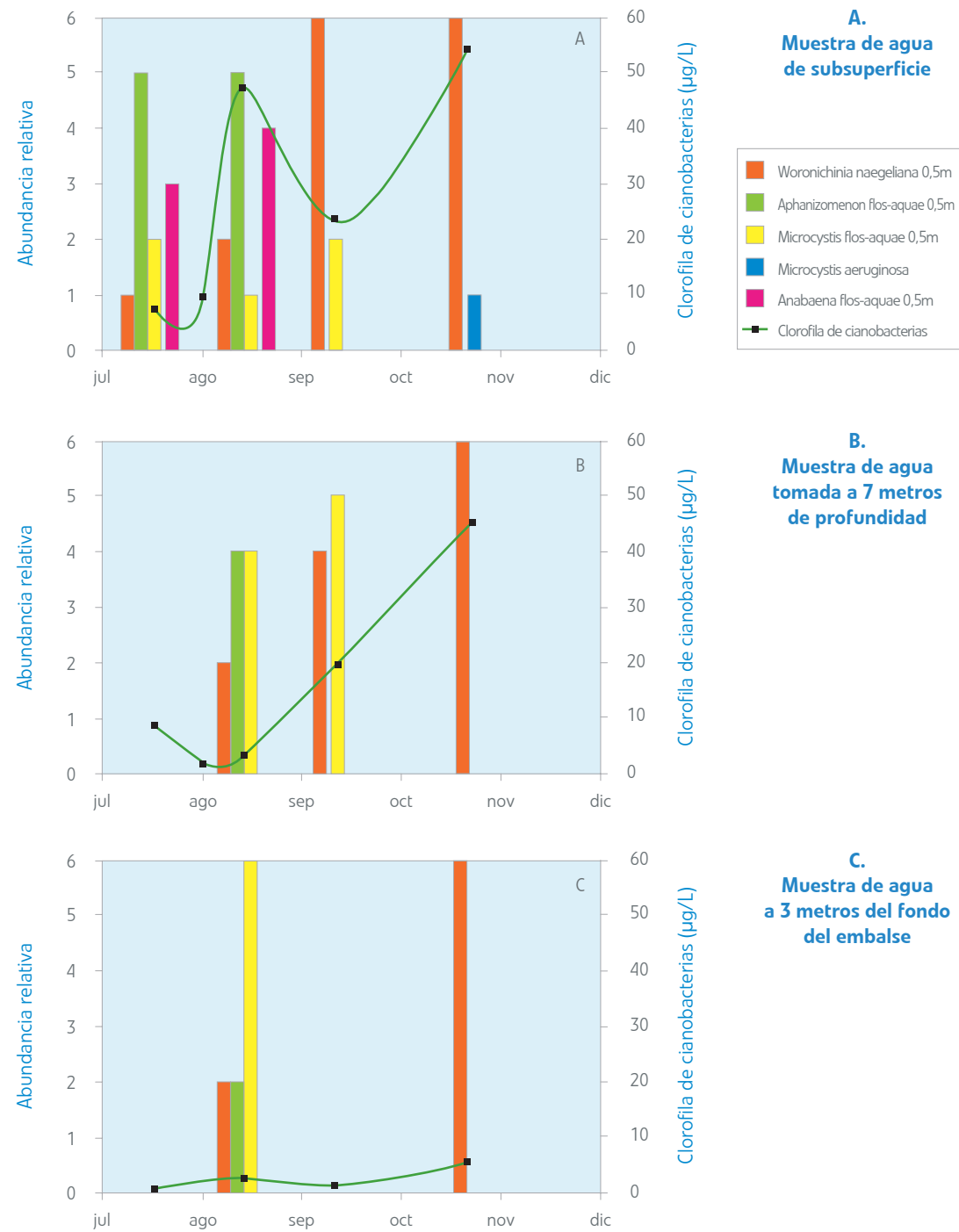


Figura 8. *Woronichinia naegeliana*. Muestras de Santillana. La barra de escala representa 10 μm



Respecto a la composición taxonómica de cianobacterias en cada una de las muestras (Figura 9) se observa una distribución taxonómica peculiar, de manera que la comunidad de subsuperficie muestra unas tendencias similares a las de las otras profundidades estudiadas en lo que se refiere a los taxones dominantes.

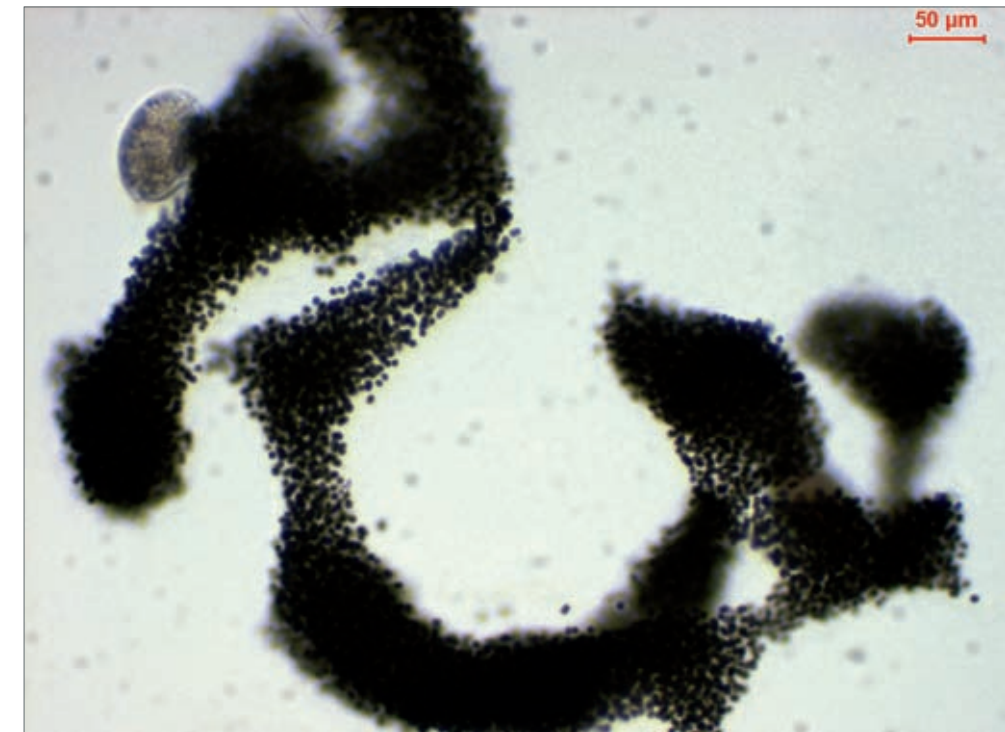
Figura 9. Abundancia relativa de los taxones de cianobacterias potencialmente tóxicos



En la muestra a 7 metros de profundidad también aparece al principio *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae* y *Microcystis aeruginosa* (Figura 10). La comunidad se va enriqueciendo progresivamente en *Woronichinia naegeliana* que desplaza a los demás taxones.

Un proceso muy similar se encuentra en la muestra de agua del hipolimnion, con un gran aumento de *Woronichinia naegeliana* al final del periodo de muestreo, aunque hay que destacar la muy baja concentración de clorofila presente en esa muestra, lo que hace que las técnicas de flotación para concentrar los organismos no sean muy precisas. De cualquier manera, los datos presentados en este apartado permiten mostrar el escenario en el que tiene lugar la sedimentación y acumulación en las trampas.

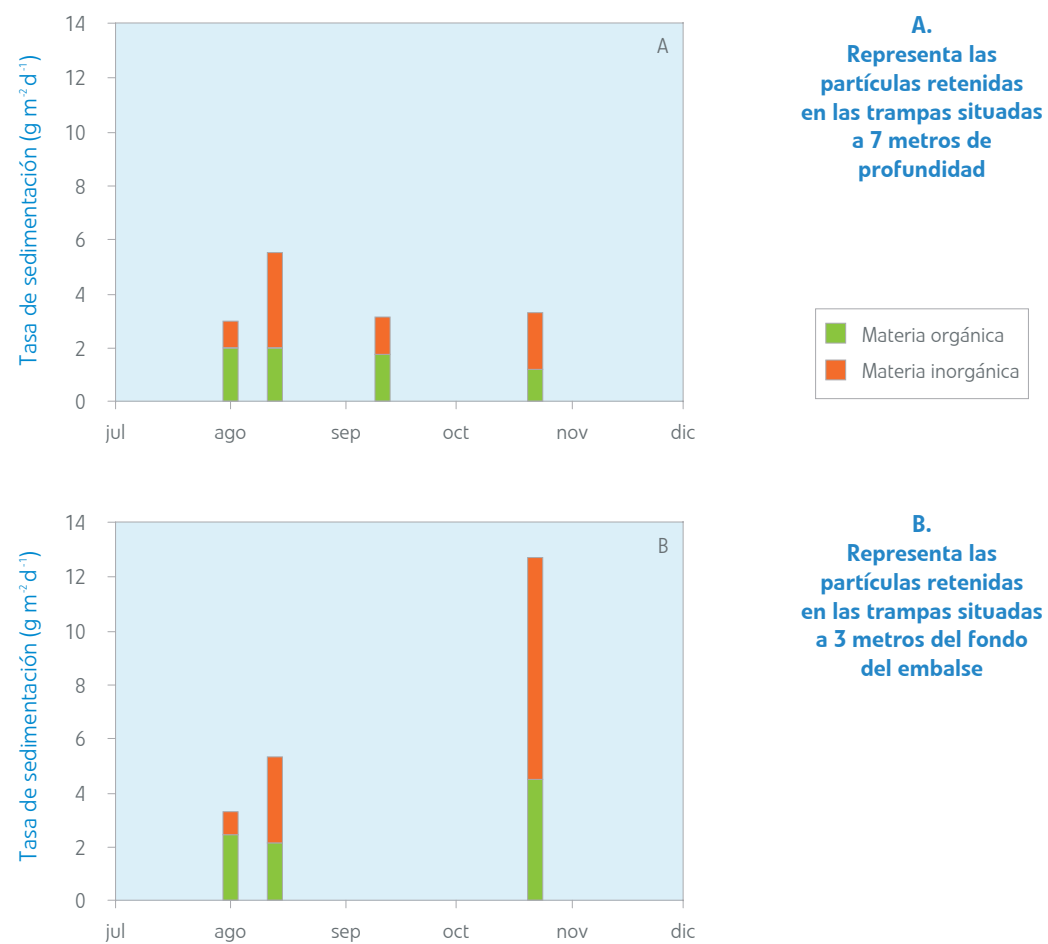
Figura 10. *Microcystis aeruginosa*. Muestras de Santillana. La barra de escala representa 50 µm



4.1.1.2. Tasas de sedimentación

La Figura 11 muestra las tasas de sedimentación de la materia orgánica e inorgánica durante el periodo de muestreo. En estos resultados se evidencia que la sedimentación de la materia orgánica es muy importante, significando en término medio valores cercanos al 50 por ciento de la materia sedimentada entre las trampas colocadas a ambas profundidades, como cabe esperar en ambientes eutróficos.

Figura 11. Tasas de sedimentación de materia orgánica e inorgánica. Embalse de Santillana



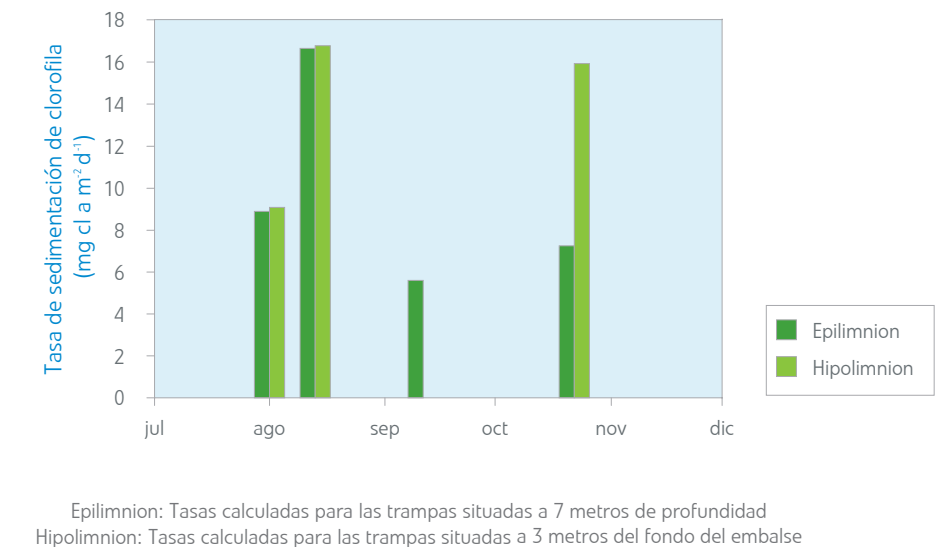
No se representan los datos obtenidos en las trampas hipolimnéticas del 11/9/2007, ya que debido a la bajada del nivel del embalse, éstas quedaron demasiado cerca del fondo, pudiendo haber estado sometidas a procesos de resuspensión

Las tasas de sedimentación tanto de materia orgánica como inorgánica fueron muy similares entre las dos profundidades investigadas, lo que nos indica que la contribución (tanto de materia orgánica como inorgánica) es mayoritariamente superficial, en cualquier caso por encima de los 7 metros donde se situó la primera trampa de sedimentación.

Si las tasas de sedimentación fueran superiores en el fondo que a media profundidad querría decir que hay aportes profundos, bien de resuspensión o de entradas profundas de agua cargadas de partículas. Por otro lado, la similitud en los valores nos indica que no hay grandes procesos de pérdida por depredación o advección.

Las tasas de sedimentación de la clorofila (Figura 12) muestran que los valores fueron muy similares en ambas trampas, lo que refuerza la hipótesis de la escasa pérdida de biomasa en la columna de agua.

Figura 12. Tasas de sedimentación de clorofila en el embalse de Santillana



Un caso excepcional fue el registrado en el muestreo de octubre en la trampa de fondo. En ella se encontró una muy alta tasa de sedimentación (superior al doble de las tasas anteriores), que atribuimos a los procesos de mezcla que tenían lugar en esas fechas, que provocaron la resuspensión de los sedimentos y la posterior sedimentación de éstos en el interior de las trampas. De hecho, se evidencia que la tasa de sedimentación de clorofila, en este momento de muestreo, fue mucho mayor en la trampa hipolimnética que en la epilimnética lo que indudablemente nos habla de un origen no superficial de esa biomasa algal.

Las tasas de sedimentación de las diferentes especies de cianobacterias muestran claramente los elevados valores, que pudieron cifrarse en unos totales aproximados de 200 millones de células de cianobacterias sedimentando por metro cuadrado y día, lo que supone una verdadera lluvia de cianobacterias.

Es de resaltar los valores tan similares de tasas de sedimentación que aparecieron en ambos grupos de trampas (Figura 13), lo que indica una falta de selectividad de las especies, por lo que podemos estimar que los procesos de pérdida de la biomasa cianobacteriana por depredación o degradación deben ser bajos.

En las trampas de mayor profundidad, cabe destacar la aparición de *Microcystis aeruginosa* y su ausencia en las de media, indicando que esta población debía tener una distribución profunda. Los valores excepcionalmente elevados registrados en la trampa profunda en el mes de octubre los atribuimos a procesos de resuspensión del lecho del embalse y no a verdadera sedimentación de las partículas de capas superiores.

Respecto a la sedimentación de microcistinas en el embalse de Santillana, a pesar de haber extraído y sometido a HPLC la totalidad de las muestras, no se detectaron toxinas en las muestras en la columna de agua, debido a que sus concentraciones debieron estar por debajo del límite de detección, cifrado en 0,026 µg de microcistina por litro. Sin embargo, sí se detectaron y se determinaron concentraciones relativamente pequeñas de microcistinas en algunas de las trampas instaladas, pero solamente en alguna de las fechas (Tabla 1).

Los resultados indican que, a pesar de que las concentraciones en el agua fueron inferiores a lo detectable, en las trampas de sedimento se acumularon toxinas, con tasas de sedimentación cercanas a 20 µg MC total m⁻² d⁻¹. Además, estas tasas fueron muy similares en las trampas situadas para ambas profundidades lo que parece indicar que no hubo procesos de degradación de la toxina en su recorrido de sedimentación en la columna de agua. De cualquier manera, los valores son muy bajos y pueden estar sometidos a desviaciones importantes.

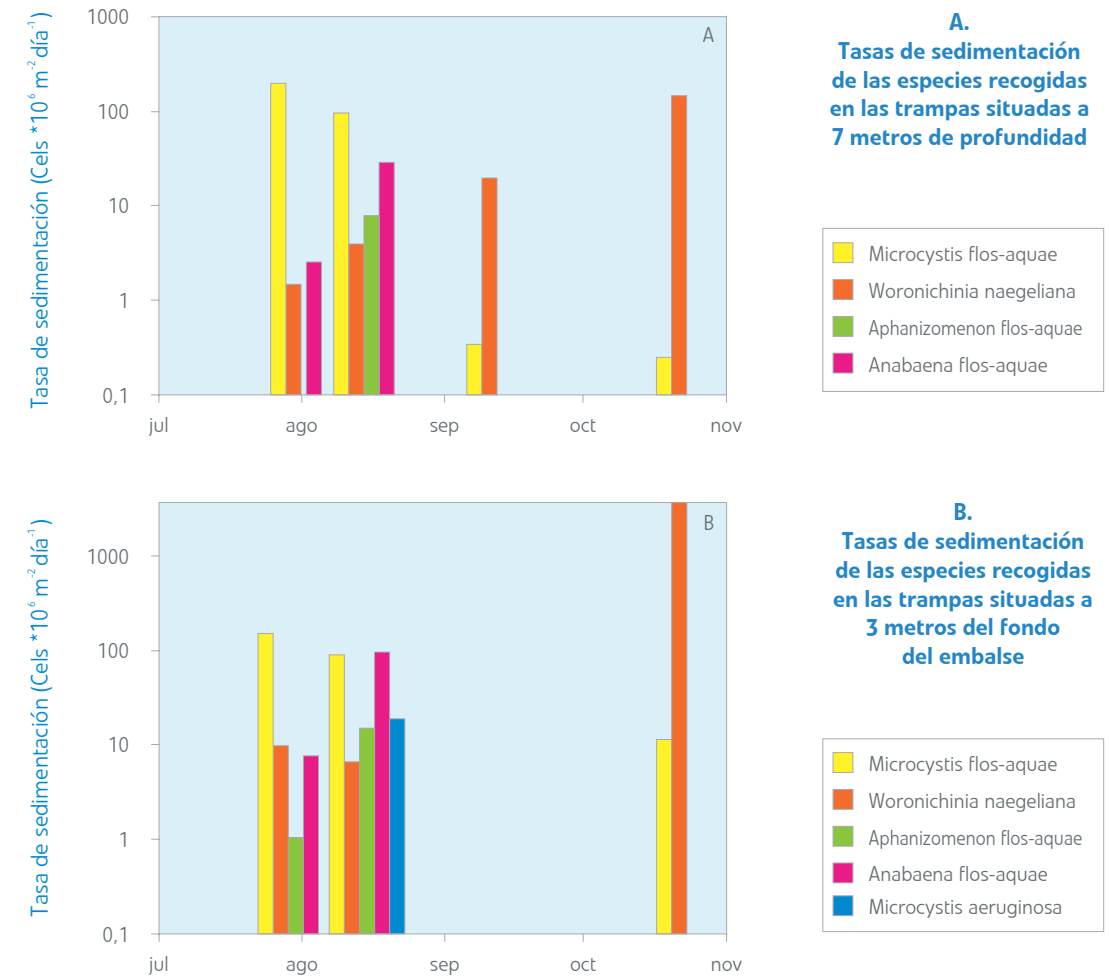
Tabla 1. Tasas de sedimentación de microcistinas. Embalse de Santillana

Fecha	Profundidad	Tipo de toxina	Tasa (µg MC/m ² d)
01/08/2007	7 m	MC-LR	19,06
	17 m	MC-LR	18,75
13/08/2007	7 m	MC-RR	15,3 ± 2,34
	17 m	MC-RR	18,8 ± 8,48
		MC-LR	3,18

(Sólo se incluyen las fechas en las que la concentración de toxina estuvo por encima del límite de detección)

Estos valores refuerzan la idea de que los sedimentos suponen un reservorio de cianotoxinas importante, incluso en situaciones en que las cianobacterias tóxicas son muy minoritarias y los sistemas de detección no permiten otorgar valores de concentración a las células en suspensión.

Figura 13. Tasas de sedimentación de las diferentes especies de cianobacterias. Embalse de Santillana



4.1.2. Embalse de Valmayor

4.1.2.1. Proporciones de grupos algales, concentración de clorofila y taxonomía

En subsuperficie, lugar de la máxima concentración de clorofila de toda la columna de agua, se aprecia cómo la proporción de cianobacterias fue baja, excepto en el último muestreo (Figura 14), momento en el que alcanzaron valores del 42 por ciento de toda la biomasa algal, aunque hay que remarcar que en ese momento la concentración de clorofila fue muy baja (inferior a $2 \mu\text{g L}^{-1}$).

Las concentraciones de clorofila total en el periodo de muestreo, en esta capa de agua, oscilaron entre $1,6$ y $41,8 \mu\text{g Cl L}^{-1}$.

Analizando las proporciones de los grupos algales en las muestras obtenidas sobre el metalimnion, a una profundidad de 10 metros, observamos que una vez más, las cianobacterias ocupan una posición secundaria, aunque en este caso las *Criptofitas* tampoco fueron muy abundantes, dominando la comunidad las *algas verdes* y las *diatomeas*.

Se observa que las proporciones de los grupos algales son similares a las que encontramos en subsuperficie, si descontamos la contribución de las criptofitas, que al tener capacidad natatoria pueden situarse en la profundidad óptima para su fisiología.

Las cianobacterias fueron mayoritarias en el primer muestreo del mes de octubre y la concentración de cianobacterias fue muy similar a los valores encontrados en las muestras de subsuperficie. Estos resultados parecen indicar que el epilimnion estuvo bien mezclado y las proporciones de grupos algales fueron muy similares con excepción de las criptofitas por su capacidad natatoria.

Analizando los resultados obtenidos de la muestra de agua hipolimnética, a 3 metros sobre el fondo del embalse, observamos en primer lugar, que la concentración total de clorofila fue inferior a la encontrada en superficie (Figura 14. C.). Sin embargo, si descontamos la concentración de clorofila debida a criptofitas los valores fueron del mismo orden de magnitud aunque algo inferiores.

En cuanto a la proporción de los grupos algales, se evidencia una estructura de grupos distinta a la encontrada en las otras capas de agua investigadas, con un mayor aumento de la proporción de algas verdes en el segundo y cuarto muestreo y de cianobacterias en el tercero. La variación de la estructura de la comunidad en las diferentes capas debe ser explicada considerando procesos diferenciales en la sedimentación (flotación) o bien procesos de depredación sobre grupos o clases de tamaño específicas, aunque las concentraciones de clorofila fueron tan pequeñas que podrían no ser significativas.

En lo que respecta a la composición taxonómica de cianobacterias en cada una de las muestras de agua (Figura 15) se observa una distribución taxonómica en la que aparece una presencia importante de *Microcystis aeruginosa*, tanto en superficie como en el fondo, aunque no asoma a profundidad media, donde encontramos *Microcystis novacekii* (Figura 16) que estuvo presente en superficie en fechas anteriores (datos no mostrados).

Figura 14. Proporción relativa de grupos algales y concentración de clorofila total y clorofila de cianobacterias. Embalse de Valmayor, temporada 2007

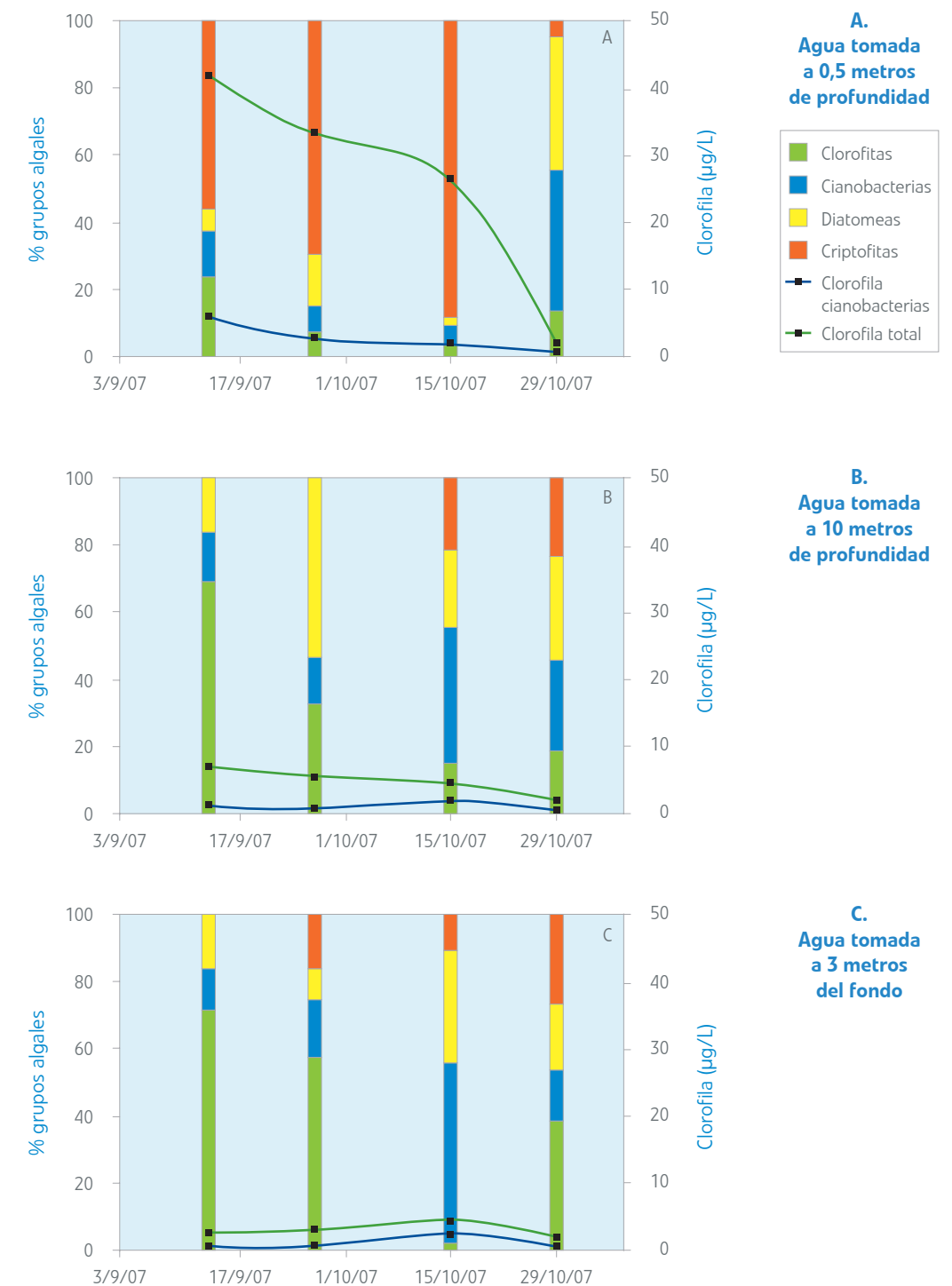
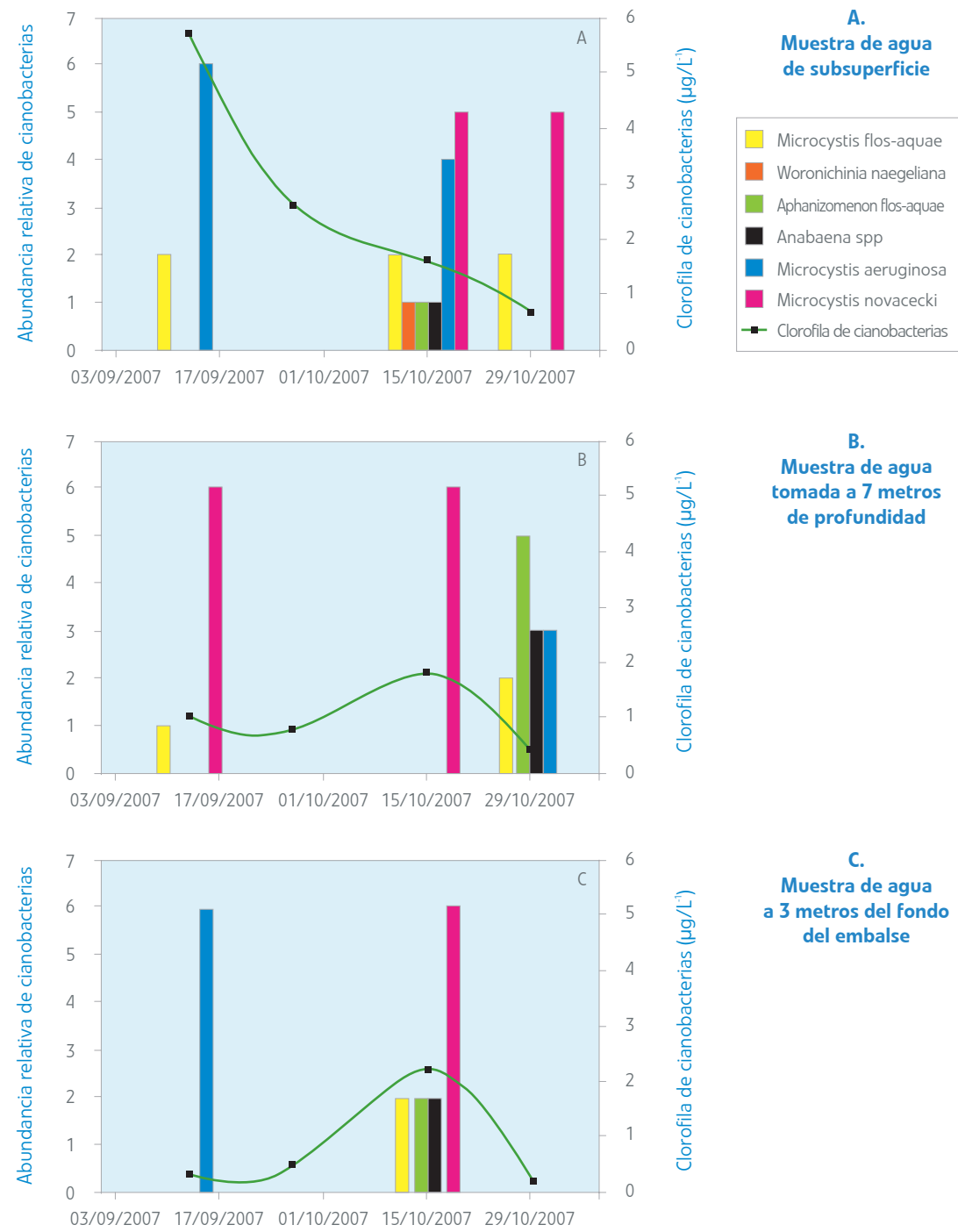


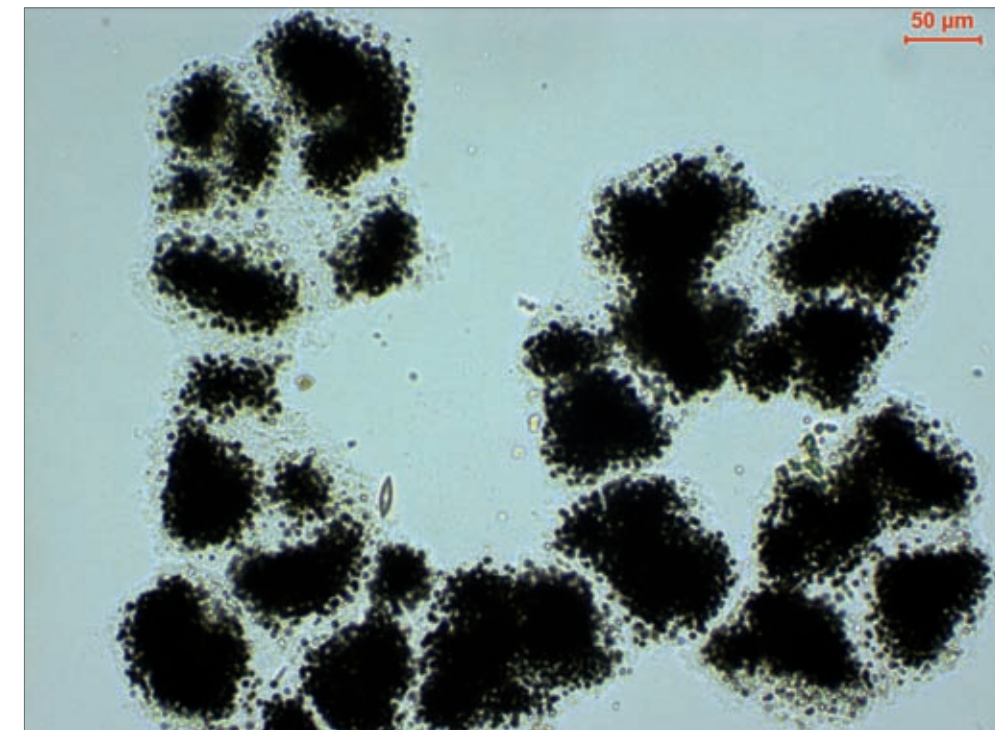
Figura 15. Abundancia relativa de los taxones de cianobacterias potencialmente tóxicos. Embalse de Valmayor



De cualquier forma, se aprecia que la comunidad que apareció en el primer muestreo de octubre en superficie está representada a media profundidad en el último muestreo. No se encontró en este caso en la muestra hipolimnética porque la concentración de clorofila de cianobacterias era muy baja y no se detectaron cianobacterias flotantes en dicha muestra.

En cualquier caso, merece la pena destacar que no se observa una estructura vertical tan nítida como se esperaba, lo que indudablemente es debido a la peculiar estructura térmica de la columna de agua que no permitió una estratificación suficiente para una distribución escalonada de la biomasa.

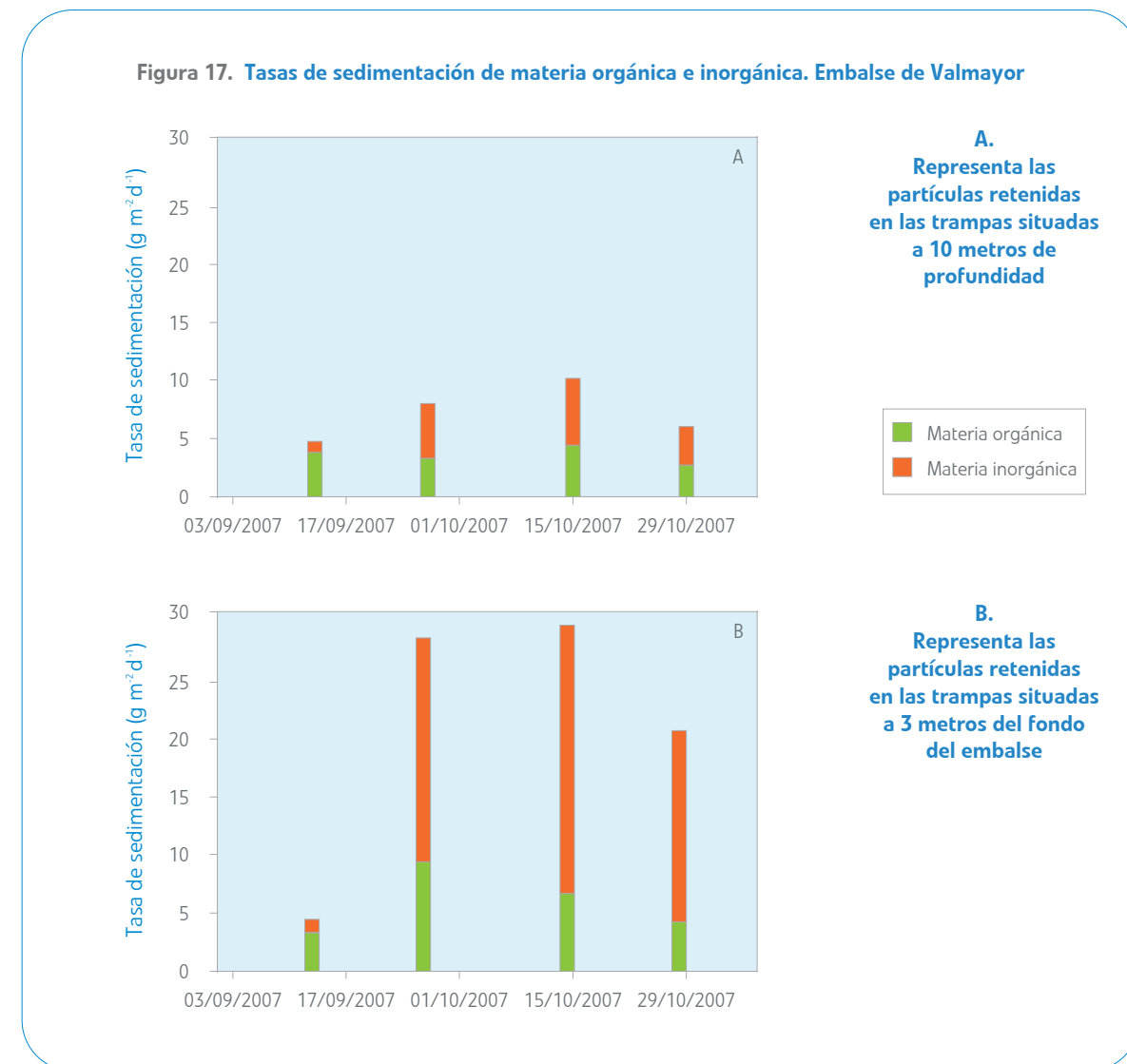
Figura 16. *Microcystis novacekii*. Muestras de Valmayor. La barra de escala representa 50 µm



4.1.2.2. Tasas de sedimentación

La Figura 17 muestra las tasas de sedimentación durante el periodo de muestreo. Las tasas de sedimentación de materia tanto orgánica, como inorgánica, en las trampas de sedimento dispuestas a las dos profundidades arrojaron valores muy diferentes.

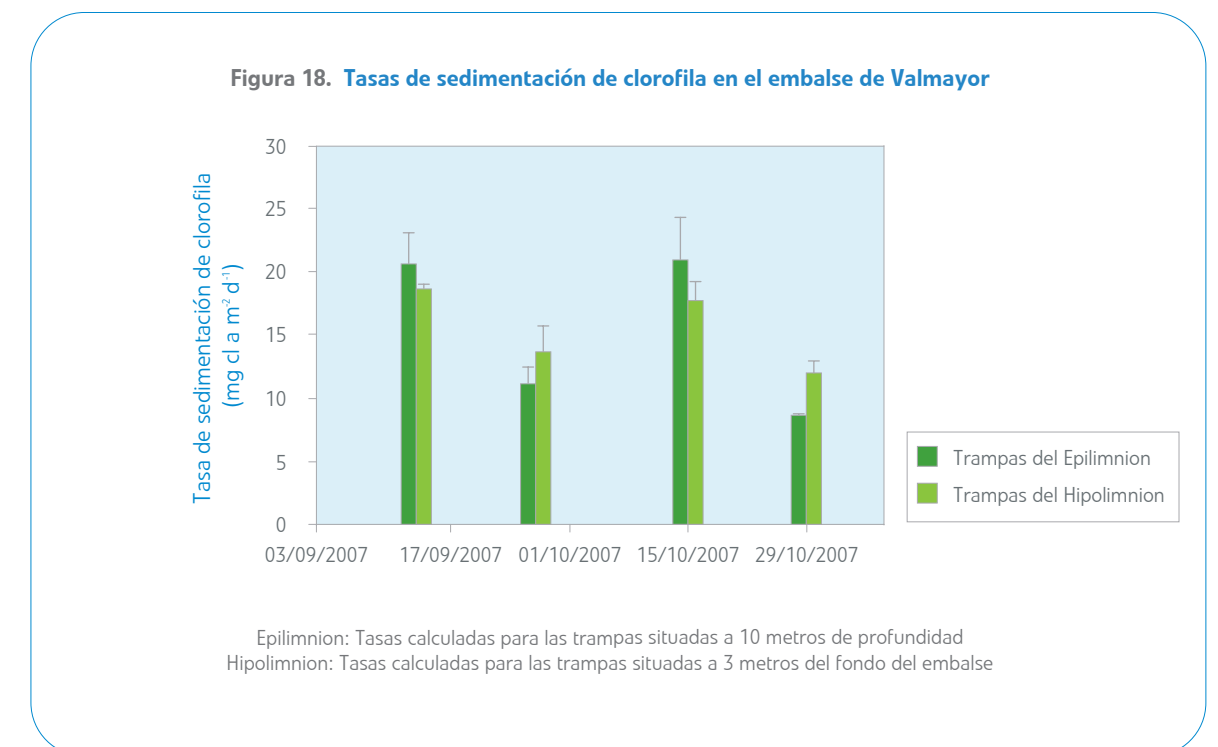
Mientras que los valores fueron inferiores a $10 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en las trampas situadas a 10 metros, alcanzaron valores de $30 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en las trampas profundas. Estas diferencias fueron especialmente acusadas en los muestreos finales y fueron similares en el primer periodo de muestreo. Esos datos indican que, con excepción del primer muestreo, hubo un aporte de materia, tanto orgánica como inorgánica, en el espacio que existe entre la trampa de fondo y la trampa de 10 metros.



Esta entrada de materia en profundidad puede ser explicada tanto por la resuspensión del fondo como por la posible entrada de agua en profundidad cargada con partículas tanto orgánicas como inorgánicas. La presencia del trasvase desde el embalse de San Juan podría explicar el proceso de entrada profunda de agua y también los procesos de resuspensión.

Queda evidenciado en estos resultados que la sedimentación de la materia orgánica en la capa superficial de la columna de agua es muy importante, significando en término medio valores cercanos al 50 por ciento del total de la materia sedimentada en las trampas colocadas a 10 metros de profundidad, como corresponde a ambientes eutróficos. Sin embargo, en las trampas profundas, el aporte fue mayoritariamente de materia inorgánica.

Las tasas de sedimentación de la clorofila (Figura 18) muestran que los valores fueron muy similares en ambas trampas. En algunas ocasiones las tasas de sedimentación fueron mayores en las trampas hipolimnéticas; en otros casos en las trampas epilimnéticas. No obstante, no aparecen grandes diferencias entre las trampas situadas a ambas profundidades. Es interesante constatar que el contenido en clorofila de la materia orgánica en la trampa de sedimento profunda era notablemente inferior al contenido de clorofila de la materia orgánica de la trampa a 10 metros (como promedio se cifra en 3,1 frente a $4,2 \text{ mg CL g}^{-1}$ materia orgánica). Posiblemente esto se deba a que la materia orgánica presente en las trampas profundas esté más degradada o tenga un origen diferente.



Las tasas de sedimentación de las diferentes especies de cianobacterias muestran de nuevo elevados valores. Se pueden cifrar en tasas de sedimentación totales que oscilaron entre 413 y 9.500 millones de células de cianobacterias sedimentando por metro cuadrado y día. Estos valores de sedimentación fueron similares en ambas trampas. Es de resaltar los patrones de sedimentación tan similares que aparecieron en ambos grupos de trampas (Figura 19), lo que indica una falta de selectividad de las especies que están sedimentando. Sin embargo, es destacable que los valores de sedimentación fueron siempre superiores en las trampas profundas, que en las trampas epilimnéticas, (por término medio, el 44 por ciento superiores en las trampas profundas), por lo que podemos inferir que en el caso del embalse de Valmayor, o bien la actividad biológica alcanza cotas muy profundas o bien la resuspensión de los sedimentos está contribuyendo de forma notable al material sedimentado en las trampas profundas.

En lo que respecta a la sedimentación de las microcistinas en el embalse de Valmayor, se muestra en la Figura 20, cómo existieron concentraciones moderadas de dichos compuestos, alcanzando valores máximos superiores a $8 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas totales en subsuperficie. Es de destacar la presencia de una variante de microcistinas, la MC-FR, que aunque no podemos asegurar su presencia, por la inexistencia de estándares comerciales, dado su tiempo de retención y su espectro de absorción, podemos suponer que se trata de este compuesto.

En las muestras de agua de las otras dos profundidades se encontraron valores de microcistinas muy bajos, de $0,19$ y $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas LR y FR respectivamente, en la muestra de 10 metros y de $0,04$ y $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas LR y FR, respectivamente, en la muestra de 17 metros.

La MC-FR fue máxima tanto en la columna de agua, como en las trampas de sedimentación. Dicha toxina presenta valores de toxicidad 5 veces inferiores a los de la MC-LR pero, alrededor de tres veces superiores a los de la MC-RR. Es necesario recordar que la concentración de clorofila debida a cianobacterias en agua en subsuperficie era muy baja, alrededor de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, lo que nos indica la extremada toxicidad de las cianobacterias presentes en el embalse durante este verano, capaces de producir casi el doble de microcistinas que de clorofila.

Las tasas de sedimentación de microcistinas de entre 100 y $300 \mu\text{g MC m}^{-2} \text{d}^{-1}$ observados en las trampas dispuestas a 10 metros (Figura 21) indican que, si consideramos que la distribución de toxina siguiera un hipotético gradiente lineal entre los $8 \mu\text{g L}^{-1}$ de superficie y los $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ a 10 metros de profundidad, alrededor del 2 por ciento de la toxina presente en la columna de agua sedimenta cada día. Estos valores indican la importancia del proceso de sedimentación de la toxina que hace que los sedimentos sean potencialmente unos grandes acumuladores de toxina, ya que hemos comprobado que, al menos en la columna de agua, los procesos de degradación o depredación de las cianobacterias y de sus toxinas son relativamente poco importantes. Las tasas de sedimentación de toxinas en las trampas profundas son muy superiores, aproximadamente el doble, a las tasas de sedimentación registradas en las trampas de 10 metros. Esto puede ser debido, bien la actividad biológica con crecimiento y producción de toxina en la capa de agua entre 10 y 17 metros; o también, a la entrada profunda de agua que contuviese estos organismos y sus toxinas; o a la resuspensión de los sedimentos de fondo, siendo esta hipótesis la más probable.

Figura 19. Tasas de sedimentación de las diferentes especies de cianobacterias. Embalse de Valmayor

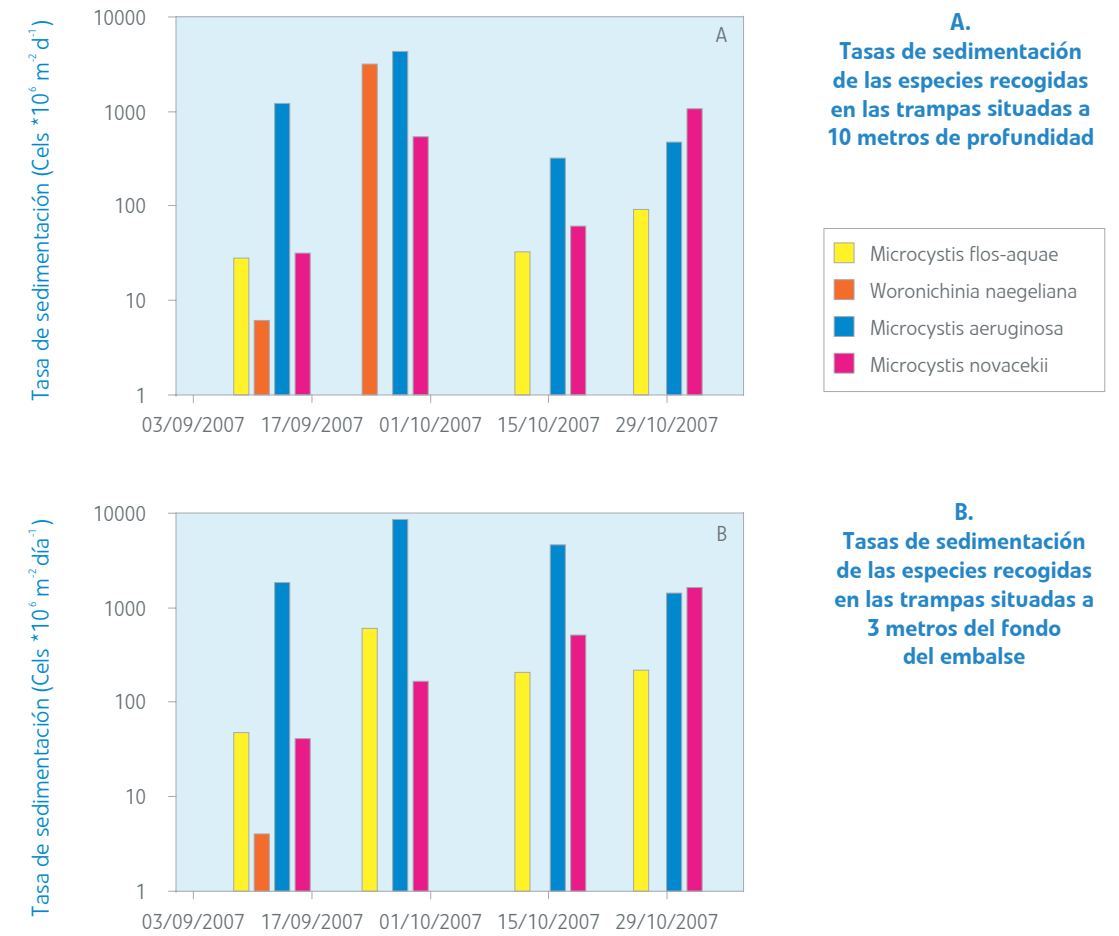
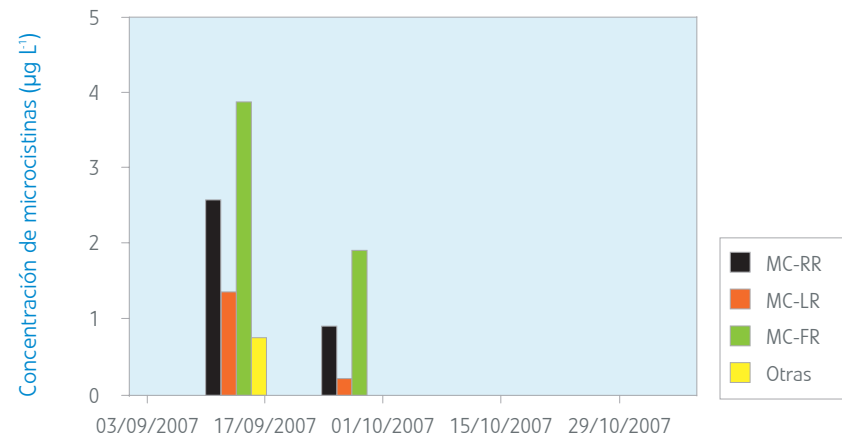
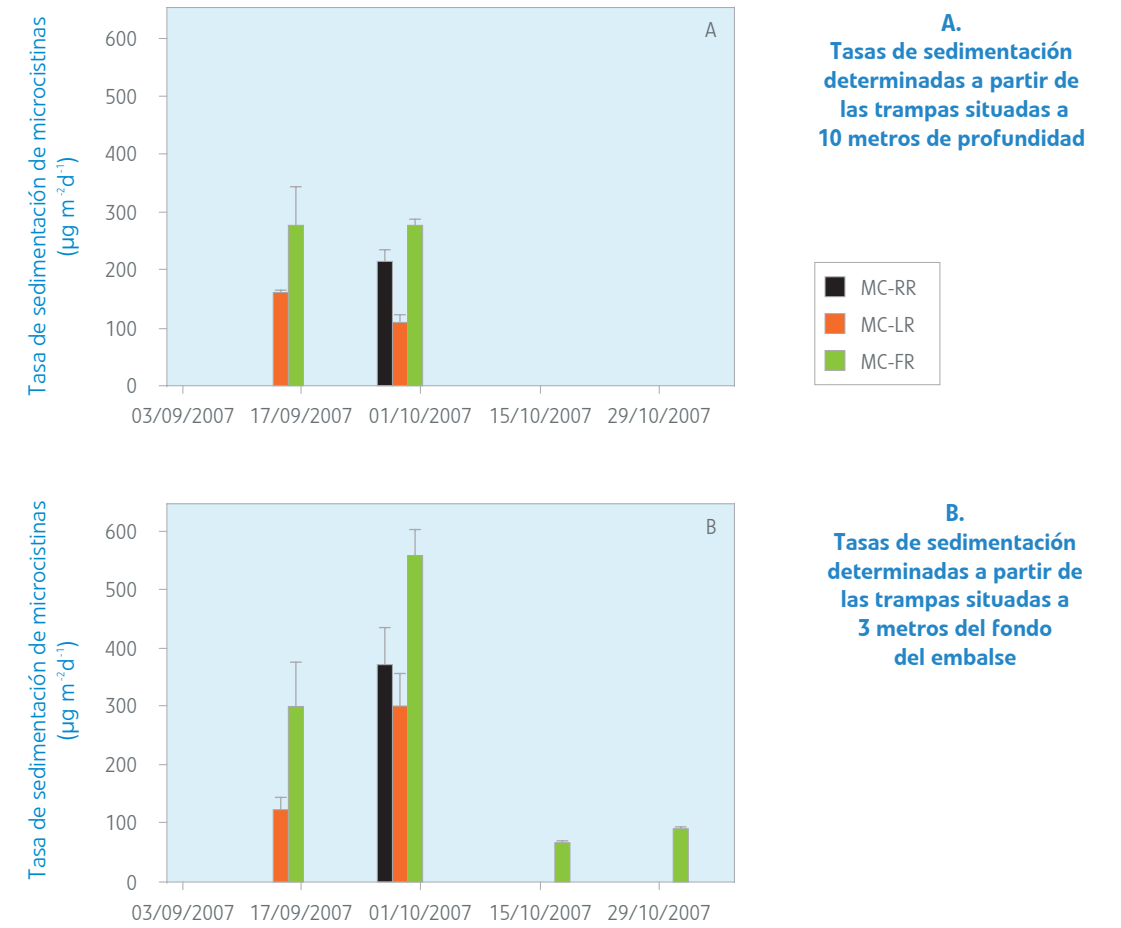


Figura 20. Concentraciones de microcistinas en la fracción sestónica de las muestras de agua de Valmayor tomadas en subsuperficie



Los datos expuestos reflejan una relación importante entre la presencia de cianobacterias del género *Microcystis* (Figura 19) y la presencia de microcistinas (Figura 21), de manera que se observa una relación que muestra que a partir de cierta abundancia de células del género *Microcystis* se puede determinar la presencia de microcistinas.

Figura 21. Tasas de sedimentación de las diferentes especies de microcistinas encontradas en el embalse de Valmayor



4.2. Degradación de microcistinas

Los resultados obtenidos en los estudios de biodegradación de las microcistinas se muestran en la Figura 22. Se observa claramente que las concentraciones de las diferentes microcistinas incluidas en los microcosmos el primer día se mantuvieron más o menos constantes durante la primera semana de exposición con la comunidad de bacterias del embalse de Valmayor. Tras este periodo de una semana, comienza un rápido descenso de las microcistinas, de manera que en la siguiente semana (día n° 12), las concentraciones de microcistinas habían descendido aproximadamente a un 50 por ciento del valor inicial. Esta rápida degradación se mantuvo hasta la total degradación de las microcistinas, el día n° 22; aunque el día n° 18 ya sólo permanecía una mínima parte (menos del 2 por ciento) de la concentración inicial de microcistinas.

Los resultados obtenidos con el contenedor control, que se esterilizó por filtración y posteriormente, se añadió el extracto de microcistinas, demostraron que la degradación observada se debía a la actividad bacteriana y no a procesos de adsorción o degradación química o física. Respecto a las tasas de degradación de cada una de las especies químicas analizadas, no existen diferencias significativas entre ellas. Estos datos confirman que cuando las microcistinas se encuentran en disolución su degradación tiene lugar tras un breve periodo de una semana. Este periodo puede ser debido, bien a que las poblaciones de bacterias degradadoras son minoritarias en el momento del comienzo del experimento y se van enriqueciendo de forma relativa por exclusión competitiva al escasear otros recursos nutritivos, o bien, a que se requiere un periodo en presencia de microcistinas en disolución para activar las rutas enzimáticas de degradación de las poblaciones bacterianas preexistentes. Cualquiera de las dos posibilidades deber ser comprobada pero en cualquier caso, los resultados mostrados sobre la rápida biodegradación natural de las microcistinas en disolución pueden tener importantes implicaciones tanto científicas, como de gestión del recurso hídrico.

Los datos mostrados en la Figura 23 indican que las poblaciones de bacterias crecieron en los mesocosmos, como era de esperar, alcanzando la máxima abundancia de bacterias el quinto día de experimento. Estos datos indican que las poblaciones naturales de bacterias del embalse de Valmayor degradan otras sustancias orgánicas (que proceden de los extractos del fitoplancton) antes que las microcistinas y que precisamente la degradación de las microcistinas empieza cuando las poblaciones bacterianas comienzan a disminuir dado el agotamiento de los nutrientes orgánicos. El que la degradación de las toxinas sea lenta y no promueva un nuevo pico de crecimiento de bacterias parece indicar que existe una subpoblación de bacterias degradadoras y que éstas no son muy abundantes, ya que su crecimiento queda enmascarado.

Figura 22. Biodegradación de microcistinas en microcosmos. Embalse de Valmayor

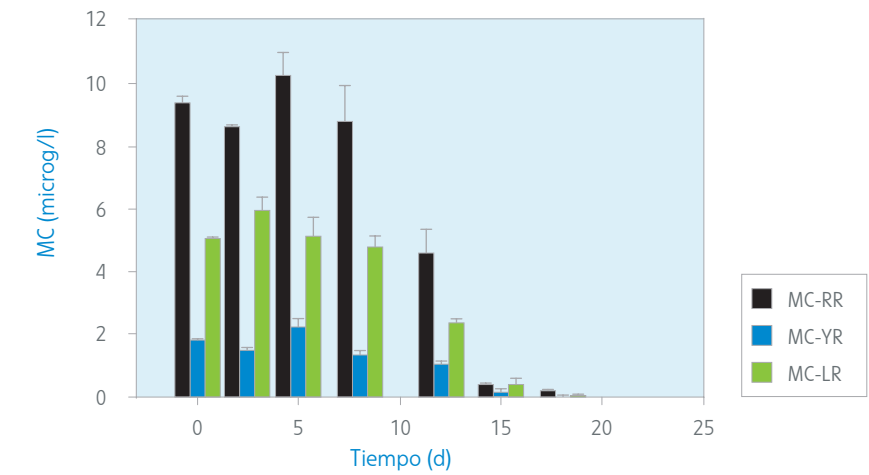
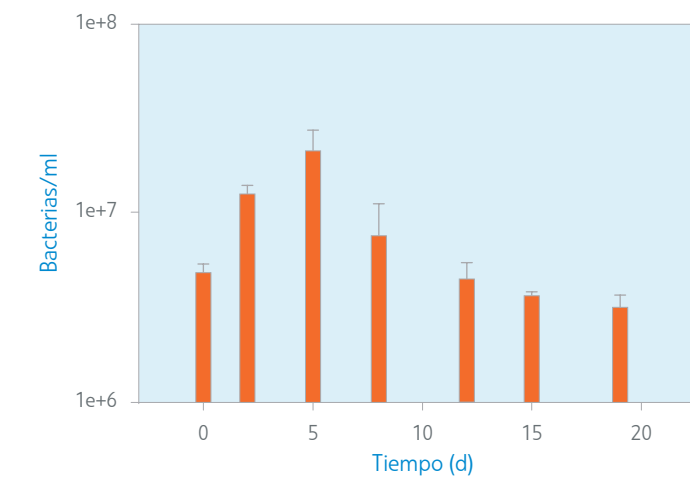


Figura 23. Abundancia de bacterias presentes en cada uno de los mesocosmos en los ensayos de degradación



5

Conclusiones

Los resultados del “**Estudio sobre la dinámica de cianotoxinas en dos embalses de abastecimiento de Canal de Isabel II**” se condensan en las siguientes conclusiones:

5.1. Respecto al análisis de las tasas de sedimentación

En los embalses estudiados, durante este ciclo, ambos mostraron bajas proporciones de cianobacterias potencialmente tóxicas.

No obstante, se encontraron microcistinas en diferentes concentraciones. La presencia de cianotoxinas en el material en sedimentación está relacionada con la abundancia de células del género *Microcistis*.

5.2. Proceso de sedimentación en la columna de agua

En el proceso de sedimentación en la columna de agua las pérdidas de células y de toxinas son mínimas. Es por ello que tanto la degradación, cuando el material en sedimentación está en forma particulada, como la depredación de las células, no parecen ser muy relevantes.

Las tasas de sedimentación encontradas muestran que los sedimentos funcionan como un reservorio de toxinas, cuando éstas se encuentran en forma particulada, por lo que significan un riesgo en caso de resuspensión.

5.3. Procesos de biodegradación natural

Estos procesos de biodegradación natural tienen lugar de manera espontánea en la masa de agua, al menos cuando la toxina se encuentra en disolución.

5.4. Tasas de biodegradación bifásicas

Las tasas de biodegradación son bifásicas, de manera que durante la primera semana (en las condiciones experimentadas) no ocurre dicha degradación, pero desde ese momento tiene lugar una rápida degradación de manera que en una semana todas las microcistinas añadidas son degradadas.

No existe una selección en cuanto a la degradación de las diferentes especies químicas ensayadas, mostrando todas tasas similares.

Anexo 1. Glosario de términos

1. **Cianofíceas:** También conocidas como cianobacterias, son algas verde-azuladas, unicelulares, de apenas unos micrómetros de tamaño.
2. **Cubitainer:** Contenedores de diversas capacidades construido por materiales plásticos y puede tener sistemas de llenado progresivo y tapado hermético.
3. **Determinación Fluorométrica:** Método analítico para la determinación de elementos traza. Está basado en la capacidad de ciertos metales para ser transformados en complejos orgánicos asociados con iones fluorescentes, que pueden absorber luz de una longitud de onda y emitir con otra longitud distinta. A esta emisión se denomina fluorescencia y es proporcional a la concentración del analito a determinar.
4. **Ensayo en microcosmos:** Ensayos o experimentos a pequeña escala, normalmente desarrollados en el laboratorio, con unas condiciones controladas concretas.
5. **Epilimnion:** En una masa de agua estratificada, es la capa superior, situada por encima del metalimnion.
6. **Fracción sestónica:** Fracción del material sólido particulado, que se encuentra en suspensión en una masa de agua. Está compuesto por el plancton o materia viva, y el tripton o materia no viva.
7. **Filtros GFF:** Filtros Glass Filter, de tamaño de poro "F", marca comercial Millipore.
8. **Filtros PTFE:** Filtros Teflón Poli Fluoro Etileno.
9. **Hipolimnion:** En una masa de agua estratificada, es la capa inferior, situada por debajo del metalimnion.
10. **Horno de mufla:** Cámara cerrada con un interior (cámara de cocción) recubierto de material refractario y un exterior aislante. Puede alcanzar temperaturas de 1500° C. En el análisis químico, suele utilizarse para medir inorgánica o cenizas de una muestra.
11. **HPLC:** High-Performance Liquid Chromatography. Cromatografía líquida de alta precisión.
12. **Metalimnion:** Gradiente máximo de temperatura que se produce en las masas de agua durante la estación cálida. Separa dos capas, una más superficial o epilimnion de otra más profunda o hipolimnion.
13. **Microcistinas:** Toxinas producidas por algunas especies de cianofíceas, entre las que destacan los géneros *Microcystis*, *Anabaena* y *Aphanizomenon* entre otras.
14. **Valor paramétrico:** Valor representativo de una población de datos, como la media o la desviación típica.

Anexo 2. Referencias

- Chorus, I, y Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water. E & FN Spon.
- Christoffersen, K., Lyck, S. and Winding, A. (2002). Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 125-136.
- Gordo, M.C., Fernández del Campo, F., González-Ramos, D.M., Hernández-Asensio, M, Macía, M. Padilla, C. Quesada, A. y Inocencio, R. (1999). Presencia de microorganismos en las aguas prepotables y sus consecuencias: cianobacterias tóxicas. XIX Jornadas de la Asociación Española de Abastecedores de Aguas 301-315.
- Huisman, J., Matthijs, H.C.P. y Visser P.M. (2005). Harmful cyanobacteria. Springer.
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1999). Cyanoprocaryota 1. Teil, Chroococcales. Gustav Fisher Verlag Jene. Stuttgart, 548 pp.
- Lawton, L.A., Edwards, C. and Codd G.A. (1994). Extraction and high-performance liquid-chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119, 1525-1530.
- Marker, A.F., Nusch, E.A., Rai, H., Riemann, B. (1980). The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardisation of methods, conclusion and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.* 14, 91-106.
- Rapala, J., Lahti, K., Sivonen, K. and Niemelä, S. I. (1994). Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 423-428.
- Real Decreto 140/2003. Por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad de agua de consumo humano. BOE 45, 21 de febrero de 2003.
- Sanchis D., Carrasco, D. y Quesada, A. (2004). *Microcystis* genus (cyanobacteria / Cyanophyte) from a Spanish reservoir: taxonomic implications. *Nova Hedwigia*, 79: 479-495.
- Sivonen, K. y Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. En: Toxic cyanobacteria in water (eds. I. Chorus y J. Bartram). E & FN Spon.
- Tsuji, K.; Watanuki, T.; Kondo, F.; Watanabe, M.F.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Uchida, H. and Harada, K. (1995). Stability of microcystins from cyanobacteria. 2. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon*, 33 (12): 1619-1631.

WHO (World Health Organization) (1999).

Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus I y J Bartram (eds). E – FN Spon Publishers.

Wörmer, L. (2004).

Seguimiento de la presencia y dinámica de diversos tipos de toxinas producidas por cianobacterias disueltas en agua en el embalse de Santillana.

Proyecto fin de carrera. Universidad Autónoma de Madrid.

Anexo 3. Índice de figuras

Figura 1. Trampa de sedimento dispuesta en 2007. Embalses de Santillana y Valmayor - Pág. 24

Figura 2. Sistema de tres boyas y plataformas flotantes - Pág. 25

Figura 3. Cubitainer - Pág. 27

Figura 4. Cubitainer flotante - Pág. 28

Figura 5. Proporción relativa de grupos algales y concentración de clorofila total y clorofila de cianobacterias. Embalse de Santillana, temporada 2007 - Pág. 33

Figura 6. Aphanizomenon flos-aquae y Microcystis flos-aquae. Muestras de Santillana - Pág. 34

Figura 7. Anabaena flos-aquae. Muestra de Santillana - Pág. 34

Figura 8. Woronichinia naegeliana. Muestras de Santillana - Pág. 35

Figura 9. Abundancia relativa de los taxones de cianobacterias potencialmente tóxicos - Pág. 36

Figura 10. Microcystis aeruginosa. Muestras de Santillana - Pág. 37

Figura 11. Tasas de sedimentación de materia orgánica e inorgánica. Embalse de Santillana - Pág. 38

Figura 12. Tasas de sedimentación de clorofila en el embalse de Santillana - Pág. 39

Figura 13. Tasas de sedimentación de las diferentes especies de cianobacterias. Embalse de Santillana - Pág. 41

Figura 14. Proporción relativa de grupos algales y concentración de clorofila total y clorofila de cianobacterias. Embalse de Valmayor, temporada 2007 - Pág. 43

Figura 15. Abundancia relativa de los taxones de cianobacterias potencialmente tóxicos. Embalse de Valmayor - Pág. 44

Figura 16. Microcystis novacekii. Muestras de Valmayor - Pág. 45

Figura 17. Tasas de sedimentación de materia orgánica e inorgánica. Embalse de Valmayor - Pág. 46

Figura 18. Tasas de sedimentación de clorofila en el embalse de Valmayor - Pág. 47

Figura 19. Tasas de sedimentación de las diferentes especies de cianobacterias. Embalse de Valmayor - Pág. 49

Figura 20. Concentraciones de microcistinas en la fracción sestónica de las muestras de agua de Valmayor tomadas en subsuperficie - Pág. 50

Figura 21. Tasas de sedimentación de las diferentes especies de microcistinas encontradas en el embalse de Valmayor - Pág. 51

Figura 22. Biodegradación de microcistinas en microcosmos. Embalse de Valmayor - Pág. 53

Figura 23. Abundancia de bacterias presentes en cada uno de los mesocosmos en los ensayos de degradación - Pág. 53

Anexo 4. Índice de tablas

Tabla 1. Tasas de sedimentación de microcistinas. Embalse de Santillana - Pág. 40

Canal de  Isabel II

Canal de  Isabel II

www.cyii.es

Canal de Isabel II
Santa Engracia, 125. 28003 Madrid