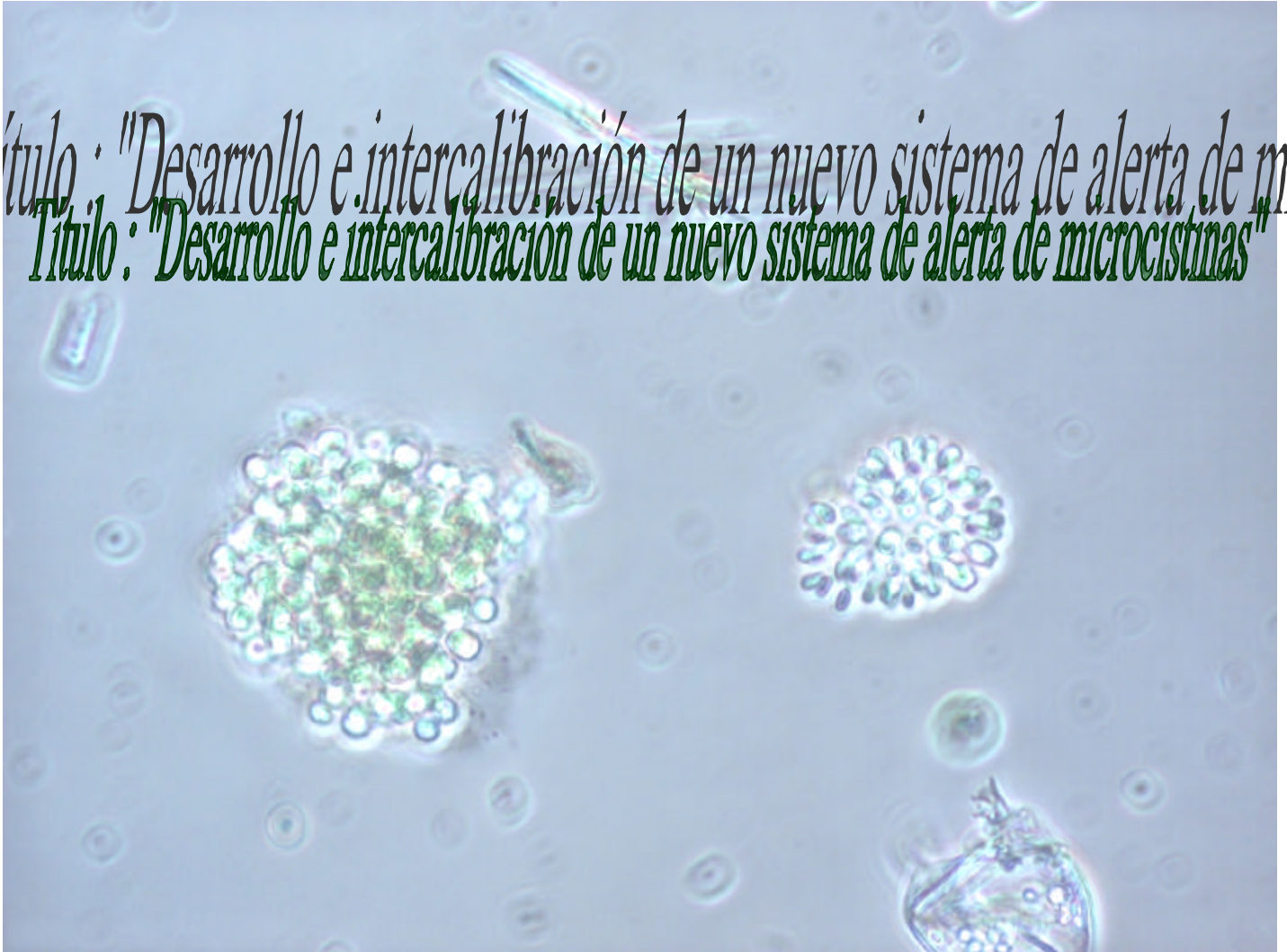




MEMORIA JUSTIFICATIVA DE LAS ACCIONES REALIZADAS

Título : "Desarrollo e intercalibración de un nuevo sistema de alerta de microcistinas"
Título : "Desarrollo e intercalibración de un nuevo sistema de alerta de microcistinas"





1. TITULO DEL PROYECTO SUBVENCIONADO

“Desarrollo e Intercalibración de un nuevo sistema de alerta, basado en recuentos de microalgas, detección de colonias productoras de toxinas, test de microcistina y Bioensayo en cultivos celulares”



Embalse de Ullibarri Octubre 2007 (Bloom algal)



2. DEFINICION DE LA ACTUACIÓN

a. ANTECEDENTES.

La captación mayoritaria de AMVISA es el embalse de Ullibarri-Gamboa. Para establecer las condiciones del proceso de potabilización y obtener un agua que cumpla con creces la reglamentación actual realizamos una serie de controles en el agua captada desde este origen.

Entre estos controles, realizamos vigilancia de la evolución tanto de microalgas totales como de los distintos grupos de microalgas, con especial hincapié en la vigilancia de la evolución de las cianobacterias. Por legislación realizamos también el control de los niveles de microcistina, con los métodos actualmente disponibles.

En los resultados de esta vigilancia hemos detectado la presencia de cianobacterias potencialmente productoras de toxina, cuyos recuentos aumentan en determinadas épocas del año, siendo altos en algunos de los años desde que estamos realizando esta investigación (Bibliografía-1).

b. PROBLEMÁTICA.

Las cianobacterias contienen en su interior toxinas que afectan a animales y al hombre. Aproximadamente 40 especies de cianobacterias producen potentes toxinas (Bibliografía-2).

Las primeras intoxicaciones de poblaciones humanas por el consumo de agua contaminada por cepas tóxicas de cianobacterias fueron descritas en Australia, Inglaterra, China y África del Sur. En Brasil se conocen varios casos pero el más grave fue el episodio de Caruaru en 1996 donde murieron más de 50 enfermos sometidos a hemodiálisis en los que se utilizó agua contaminada con cianotoxinas. (Bibliografía-3,4,5).

Hay estudios que apuntan a que una ingesta continua de bajas cantidades de toxinas de cianobacterias es un promotor de cáncer hepático (Bibliografía-6,7).

La toxina más conocida es la microcistina, pero dentro de esta se conocen hasta 60 variedades, todas con distinta toxicidad (Bibliografía-8). Además hay otras toxinas menos conocidas, que en algunos casos, al encontrarse presentes en el agua, han



resultado de acción sinérgica, de forma que poca concentración de varios tóxicos han resultado de una toxicidad total alta.

Teniendo en cuenta las perspectivas de cambio global, con la probabilidad de aumento de la temperatura del agua, existe la preocupación de que las masas de agua tiendan en mayor medida a la eutrofización, con un aumento en los bloom de algas y, por tanto, en el número de episodios tóxicos que se registren.

c. ESTUDIOS ANTERIORES Y PLANTEAMIENTO DEL PRESENTE PROYECTO.

Durante los últimos años, hemos desarrollado varios proyectos coordinados con el grupo ALBIOTOX (Biotecnología de microalgas: Producción y toxicidad), de la Universidad Complutense de Madrid, mediante los cuales hemos establecido un sistema de niveles de alerta basado en:

- recuentos de microalgas,
- recuentos de cianobacterias,
- test de microcistinas
- bioensayos en ratón

Dichos niveles están establecidos para llevar a cabo modificaciones, en el tratamiento en la Estación de Tratamiento de Agua Potable de Araka, ante la posible presencia de tóxicos procedentes de las cianobacterias en el agua del embalse de Ullibarri y del río Zadorra (Bibliografía-1).

Sin embargo observamos que estos niveles de alerta establecidos son mejorables:

- A) En cuanto a los recuentos de cianobacterias, puesto que no todas las colonias observadas son productoras de toxina, el diferenciar si las colonias que observamos son o no productoras de toxinas nos permitiría incluir un escalón mas fino en nuestros niveles de alerta.

- B) En cuanto a la técnica de bioensayo en ratón, buscamos encontrar un bioensayo que elimine la utilización de animales vivos. El realizar un bioensayo es fundamental pues permite cubrir la poca correspondencia que puede existir entre recuentos de cianobacterias y niveles de toxicidad real en el agua. Igualmente nos permitirá medir el efecto sinérgico que puede



existir al encontrarse una suma de varios contaminantes, algo que no se puede determinar por ninguna otra técnica.

3. DESARROLLO DEL PROYECTO POR OBJETIVOS

3. 1.- Puesta a punto e intercalibración de la técnica de detección de daño celular, en cultivo de hepatocitos humanos, ante presencia de tóxicos en el agua de origen.

Desde 2008 hemos trabajado en el mantenimiento y replica de cultivos celulares. En 2009 seleccionamos y comenzamos a trabajar con una línea de hepatocitos humanos. Realizamos las primeras pruebas para su uso como bioensayo, introduciendo muestras con toxicidad conocida y evaluando al microscopio el posible daño celular.

Tras los resultados de estas pruebas nos decantamos por buscar un "**test de proliferación**", que permitiera medir de forma objetiva este daño celular. Nuestro objetivo inicial era, con el uso de este test, calibrar un bioensayo con una relación **dosis-efecto**, comenzando desde dosis bajas de tóxicos.

Entre final de 2009 y principios de 2010 vimos los distintos test de proliferación del mercado y seleccionamos uno de ellos que se adaptaba bien a nuestra dinámica de trabajo, el **kit de proliferación MTT de Innoprot**. Preparamos el protocolo de ensayo, adquirimos el material necesario, optimizamos el cultivo celular en microplaca y realizamos los primeros ensayos. Una vez puesto a punto quedamos a la espera de poder organizar un ejercicio de ínter calibración entre varios laboratorios especializados.

En Junio de 2010, previo a la intercalibración, se vuelven a hacer ensayos con distintas muestras, para observar la reproducibilidad. Se detectan una serie de puntos débiles y se rectifican, redactando de nuevo el protocolo de ensayo.

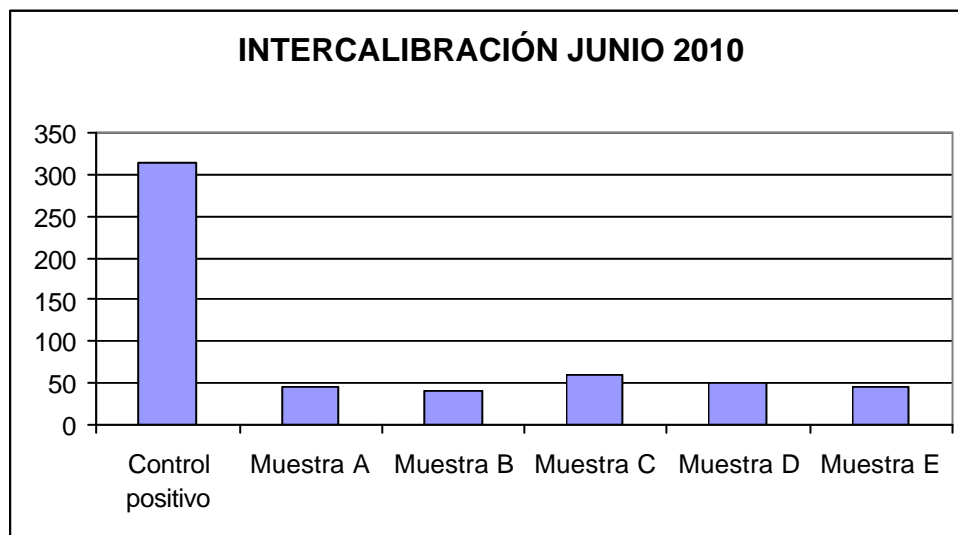
En Julio de 2010 se realizan ensayos con las muestras que nos envían desde la UCM. El resultado de las 5 muestras testadas es que todas presentan una toxicidad baja y muy parecida.



TABLA 1

MUESTRA	RESULTADO (Absorbancia)
Medio sin células	84 (0,084)
Medio con células (crecimiento máximo)	399 (0,399)
Muestra A	354 (0,354)
Muestra B	359 (0,359)
Muestra C	339 (0,339)
Muestra D	350 (0,350)
Muestra E	354 (0,354)

Gráfico 1





La asesoría contratada con la Universidad Complutense, que es la que ha organizado el ejercicio de intercalibración, realiza un estudio de los resultados y una serie de estudios posteriores en sus instalaciones para calibrar el test en dosis-efecto. En sus conclusiones presentan el kit como :

- A dosis medias y altas (por encima de 0,4 ppb de microcistina LR equivalente): Ensayo muy fiable, con elevada repetitibilidad y reproducibilidad.
- A dosis bajas (0,1 ppb) no se logra una adecuada reproducibilidad, en ocasiones los resultados salen bien y otras no se detecta nada.

Tras una investigación detallada detectan que tras los diversos pases que hacemos para mantener el cultivo (con frecuencia semanal), han aparecido hepatocitos con resistencia a la microcistina, de forma que al cabo de un tiempo, una vez alcanzado el equilibrio entre resistentes y no resistentes, el test no detecta dosis bajas de microcistina.

Durante los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre de 2010 se realizan varios ensayos, introduciendo patrones comerciales de microcistina, muestras de interlaboratorios, una muestra de embalse con episodio de toxicidad y muestras naturales de nuestro embalse (Ullibarri).

Dentro de las muestras introducidas de nuestro embalse, se procesan muestras correspondientes a dos semanas con recuentos de cianobacterias en el nivel de alerta 1 y muestras con niveles de microcistina superiores a 0,5 ppb con el kit comercial que utilizamos habitualmente. Se adjuntan tablas y gráficos con resultados de los distintos ensayos.



TABLA 2
8-sept-2010

MUESTRA	RESULTADO (Absorbancia)	Observaciones
Medio sin células	63 (0,063)	
Medio con células (crecimiento máximo)	459 (0,459)	
Ull 17/8 concentrado de 5l	396 (0,396)	Recuento cianobacterias entre 5.000 y 10.000 col/l
Ull 20/8 concentrado de 5l	401 (0,401)	Recuento cianobacterias entre 5.000 y 10.000 col/l
Ullib 20/8 filtrado	456 (0,456)	
Ull 3/9 concentrado de 5l	419 (0,419)	Recuento cianobacterias inferior a 5.000 col/l
Ull 3/9 filtrado	469 (0,469)	

GRÁFICO 2

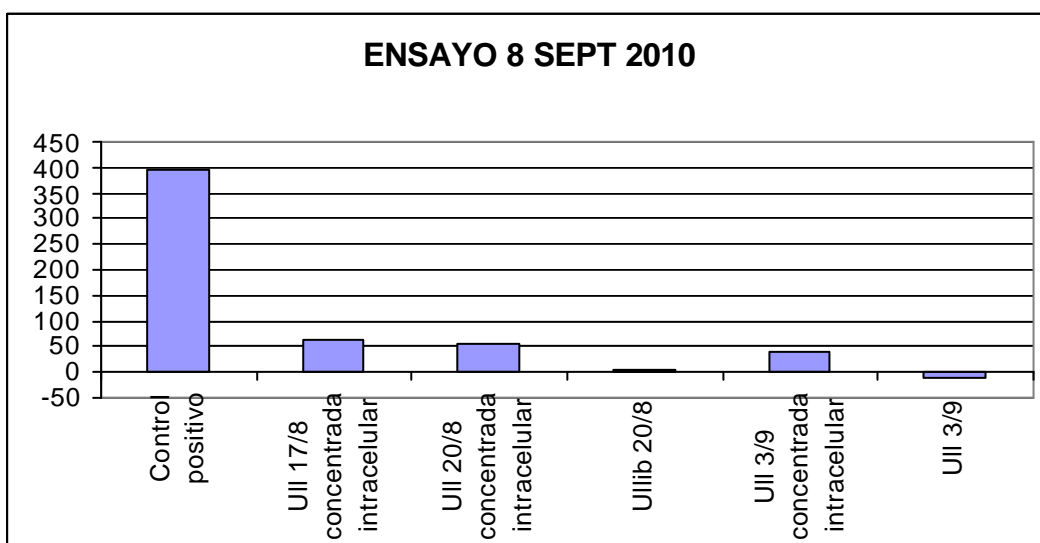




TABLA 3
5-oct-2010

MUESTRA	RESULTADO (Absorbancia)	Observaciones
Medio sin celulas	143 (0,143)	
Medio con celulas (crecimiento máximo)	457 (0,457)	
UII 29/9 concentrado de 5l	509 (0,509)	Recuento cianobacterias inferior a 5.000 col/l
UII 29/9 filtrado	408 (0,408)	Microcistina <0,25 ppb
Patrón zeu 0,25 ppb	421 (0,421)	
Patrón zeu 0,5 ppb	521 (0,521)	
Patrón zeu 1 ppb	459 (0,459)	
Patrón zeu 2,5 ppb	472 (0,472)	

GRAFICO 3

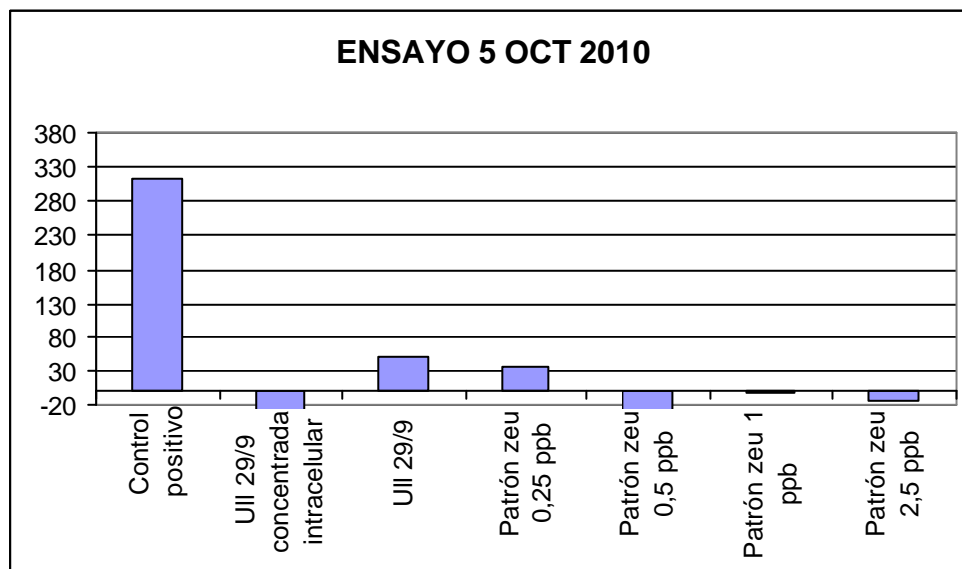




TABLA 4
26-oct-2010

MUESTRA	RESULTADO (Absorbancia)	Observaciones
Medio sin células	53 (0,053)	
Medio con células (crecimiento máximo)	446 (0,446)	
Ull 13/10 concentrado de 5l	367 (0,367)	Recuento cianobacterias inferior a 5.000 col/l
Ull 13/10 filtrado	392 (0,392)	Microcistina <0,25 ppb
Ull 13/10 disuelto	381 (0,381)	Microcistina 0,9 ppb (kit comercial)
Ull 8/10 disuelto	386 (0,386)	Microcistina 0,9 ppb (kit comercial)
Patrón zeu 0,25 ppb	337 (0,337)	
Patrón zeu 0,5 ppb	355 (0,355)	
Patrón zeu 1 ppb	309 (0,309)	
Patrón zeu 2,5 ppb	382 (0,382)	

GRAFICO 4

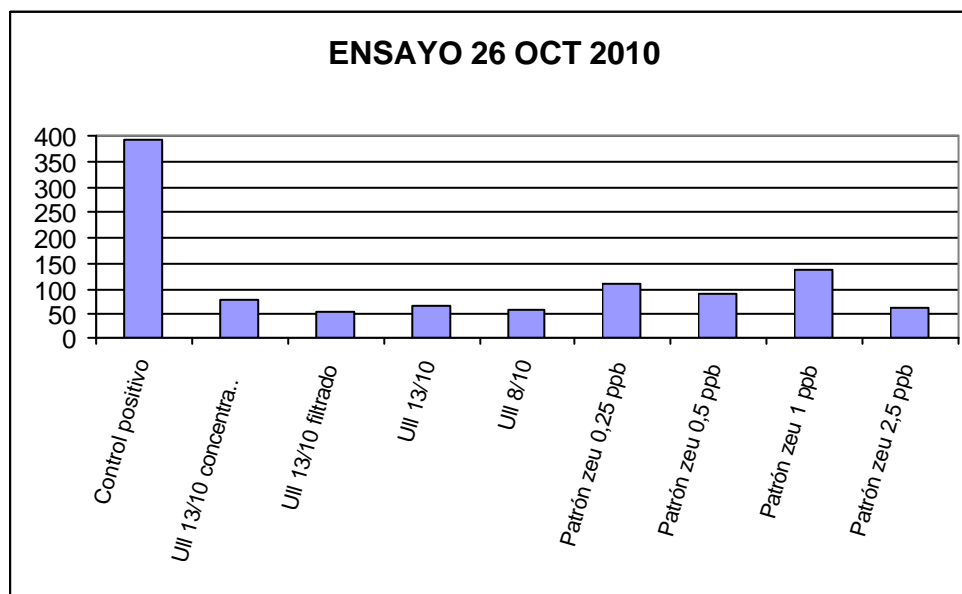
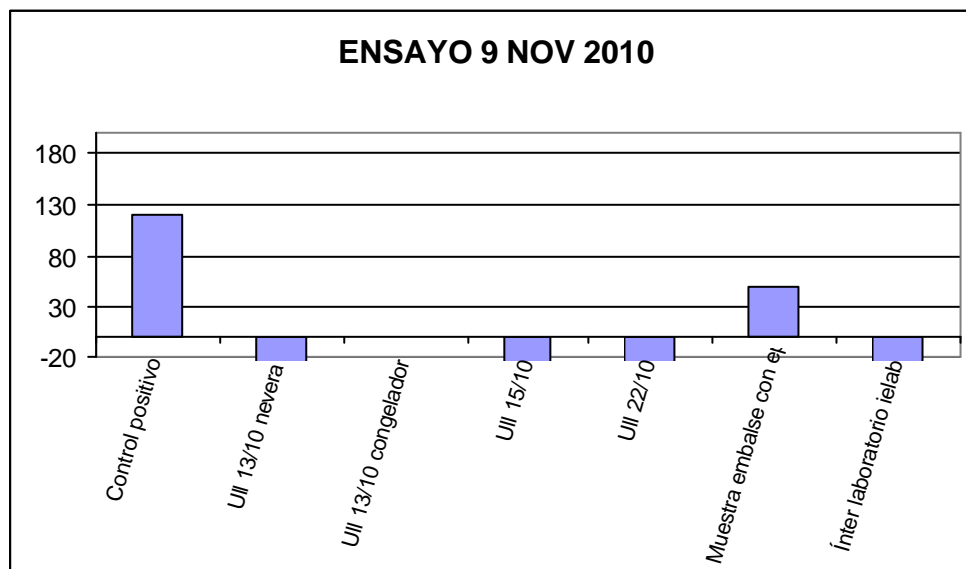




TABLA 5
9-nov-2010

MUESTRA	RESULTADO (Absorbancia)	Observaciones
Medio sin células	115 (0,115)	
Medio con células (crecimiento máximo)	235 (0,235)	
Ull 13/10 disuelto conservado en nevera	303 (0,303)	Microcistina 0,9 ppb (kit comercial)
Ull 13/10 disuelto conservado en congelador	236 (0,236)	Microcistina 0,9 ppb (kit comercial)
Ull 15/10 disuelto	272 (0,272)	Microcistina 0,7ppb (kit comercial)
Ull 22/10 disuelto	300 (0,300)	Microcistina 0,6pb (kit comercial)
Muestra embalse con episodio tóxico	185 (0,185)	
Ínter laboratorio IELAB	262 (0,262)	Microcistina 0,9 ppb (valor ínter laboratorio)

GRAFICO 5

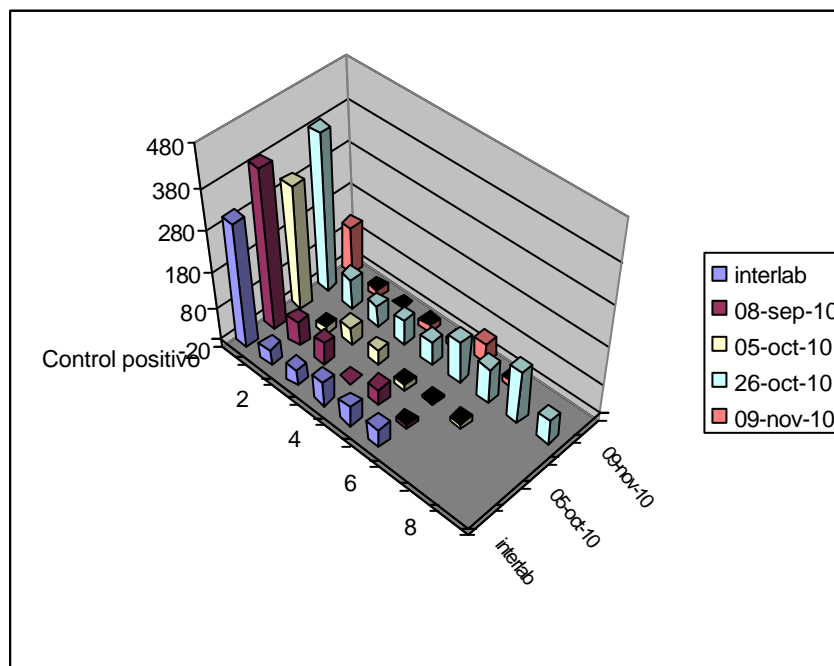




Tras el estudio de los resultados y el envío de las muestras que han dado resultados de microcistina mayor de 0,5 ppb en el kit comercial que utilizamos (MicroCystest de ZEU), concluimos lo siguiente:

- Las muestras de interlaboratorios y los patrones del kit MicroCystest no muestran toxicidad. Esto es porque se trata de microcistina conjugada, para evitar problemas de toxicidad. Es decir, aunque funcionan con los kit de ensayo diseñado para detectar microcistinas, no dañan a las células de hepatocitos, pues su toxicidad ha sido anulada.
- Las muestras que procesamos tras filtrar varios litros y extraer la toxina intracelular presentan una ligera toxicidad, en algunos casos. Esto indica presencia de toxinas intracelulares. Sin embargo en el agua procesada sin concentrar no hay toxicidad.
- Las muestras que presentaban microcistina $>0,5$ ppb en nuestro kit comercial fueron enviadas a la UCM para su determinación por otras técnicas. El resultado fue que la máxima toxicidad fue de 0,31 ppb. Esto es coherente con nuestra experiencia con el kit MicroCystest, que sobreestima la concentración real de microcistina, y es coherente con los resultados del bioensayo, en que se detecta que las muestras no presentan toxicidad.

Grafico 6





3. 2.- Puesta a punto e intercalibración de una técnica para la detección de colonias productoras de toxina.

Existen varios estudios sobre la diferenciación de microalgas a partir de su unión con distintas lectinas (Bibliografía-9). Nos proponemos comprobar si, para las colonias que están presentes en nuestras captaciones, la distinta afinidad de unión con lectinas nos permite establecer de forma rápida una diferenciación entre colonias capaces de producir toxinas y colonias que no van a producirla.

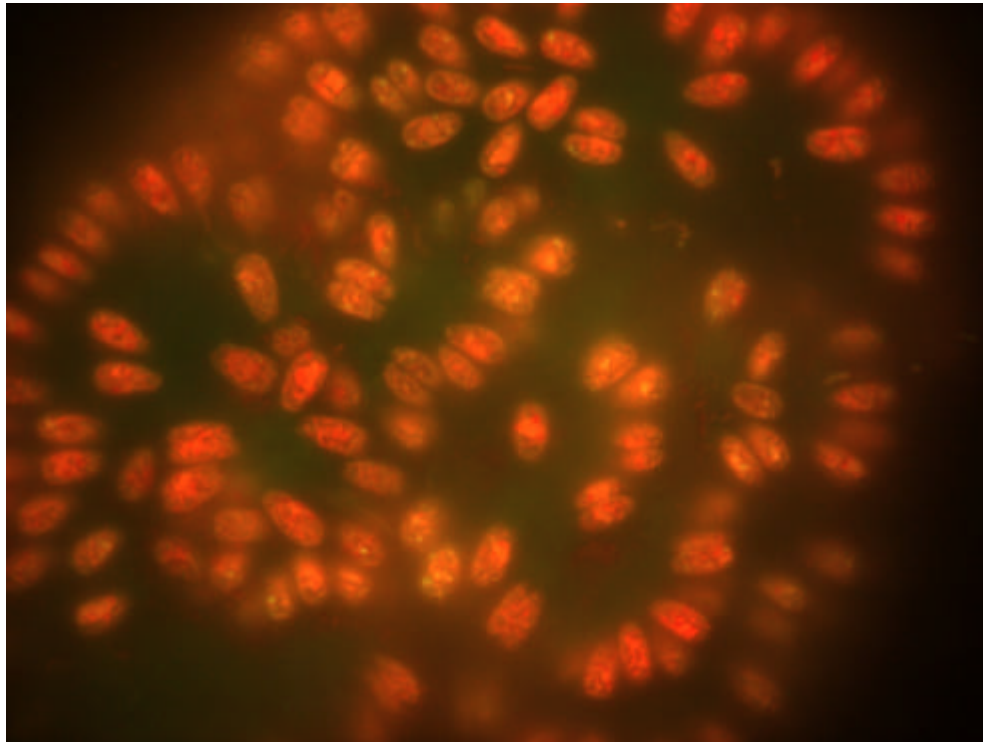
Para comenzar adquirimos, en Octubre 2009 una lectina testada en la Universidad Complutense que ha demostrado unirse solo a colonias de *Microcystis aeruginosa* que no producen toxina, mientras deja sin marcar colonias productoras de toxina

En Junio 2010 se elabora el protocolo de análisis (adquiriéndose para ello una centrifuga adecuada), realizándose algunas pruebas. Debido a la ausencia de cianobacterias en esta época no se pueden comprobar los resultados.

En Agosto 2010, aprovechando los recuentos de cianobacterias superiores al nivel de alerta 1, se realizan ensayos, con los siguientes resultados:

TABLA 6
17-AGOSTO-2010

MUESTRA	RESULTADO	OBSERVACIONES
A: concentrado + lectina	Chroococcus y Gomphosphaera teñidos. <i>Microcystis flosaque</i> y <i>Oscillatoria</i> sin teñir, igual que muestra C.	
B: concentrado + naranja acridina	Se ve mucha fluorescencia de fondo. Hay que lavar más esta muestra.	Control positivo de tinción.
C: concentrado		Se ve fluorescencia natural, para contrastar.



Gomphosphaeria teñida con naranja de acridina

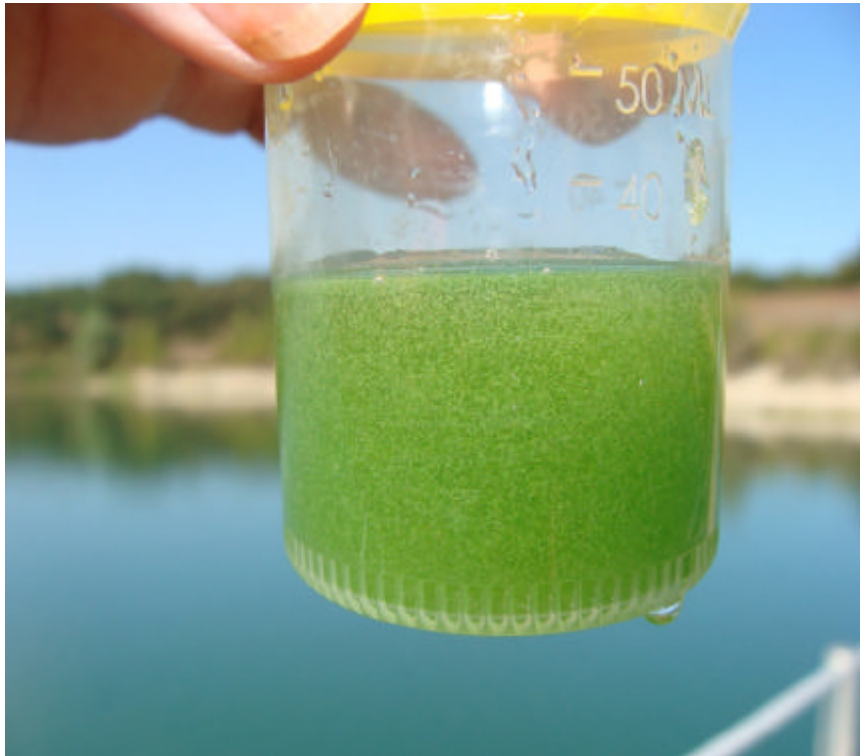
TABLA 7
20-AGOSTO-2010

MUESTRA	RESULTADO	OBSERVACIONES
A: concentrado + lectina	Chroococcus y Gomphospherea teñidos. Microcystis flosaque y Oscillatoria sin teñir, igual que muestra C.	
B: concentrado + naranja acridina	Se sigue viendo fluorescencia de fondo, aunque se ven microalgas bien teñidos.	Control positivo de tinción. Se añade menos reactivo y se hacen más lavados.
C: concentrado		Se ve fluorescencia natural, para contrastar.



En Septiembre 2010, tras hacer un estudio de los resultados, se llevan a cabo algunas modificaciones y se elabora un nuevo protocolo de análisis.

A finales de Septiembre nos alertan de la observación de un bloom de microalgas en una de las orillas del embalse. Ver foto.



En nuestros recuentos ,en el agua que se recibe en la ETAP desde el embalse, no se detectan cianobacterias por encima de 5000 col/l (alerta 1), pero si se observan colonias grandes de *Microcystis aeruginosa*, por lo que se aplica la técnica, con los siguientes resultados:

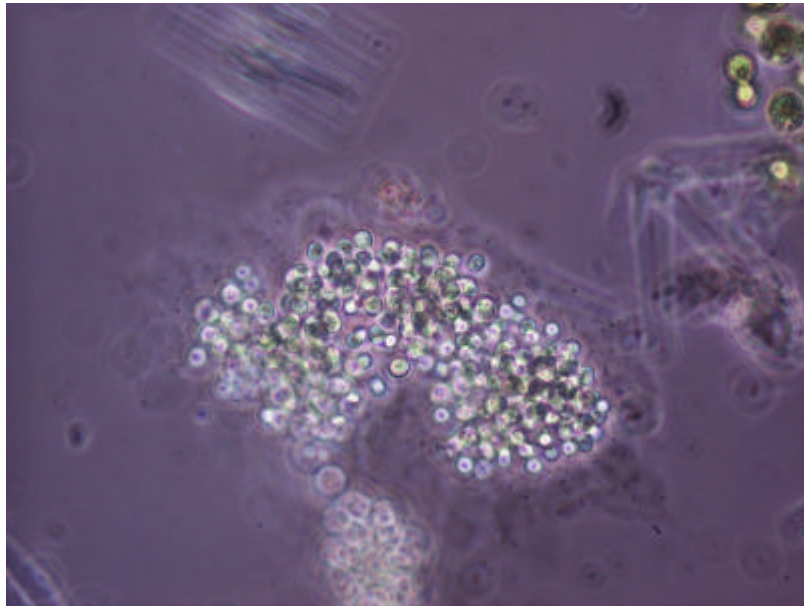


TABLA 8
30-SEPT-2010

MUESTRA	RESULTADO	OBSERVACIONES
A: concentrado	Microcystis aeruginosa, Microcystis flosaque y Gomphosphaerea amarillas. Resto de algas rojizo- naranjas.	Se ve fluorescencia natural, para contrastar
B: concentrado + LECTINA	Se ven algunas colonias de Microcystis aeruginosa teñidas y otras colonias sin teñir.	

TABLA 9
13-Oct-2010

MUESTRA	RESULTADO	OBSERVACIONES
A: concentrado	Microcystis aeruginosa y Gomphosphaerea amarillas. Resto de algas rojizo- naranjas.	Se ve fluorescencia natural, para contrastar
B: concentrado + LECTINA	Se ven algunas colonias de Microcystis aeruginosa teñidas y otras colonias sin teñir.	



Colonia de *Microcystis aeruginosa*

Posteriormente desaparece *Microcystis aeruginosa* de los recuentos, **por lo que no podemos volver a aplicar la técnica.**

3. 3.- Establecimiento de un nuevo sistema de alerta, con actuaciones en cada nivel, utilizando los datos de recuento de microalgas, detección de colonias tóxicas, determinación de microcistina y bioensayo en cultivos celulares

Durante el año se trabaja con los niveles de alerta establecidos en años anteriores, buscando el momento en que se pueden introducir los nuevos test, conforme se van desarrollando.

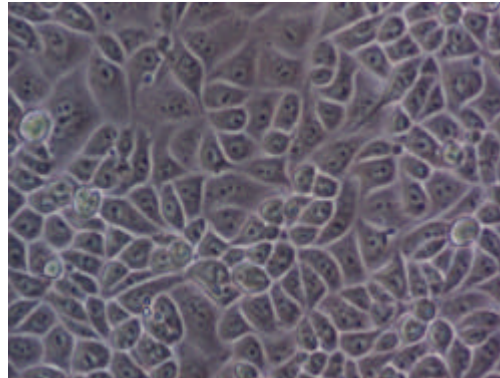
De Enero a Junio de 2010 el recuento de cianobacterias es inferior a 100 col/l.

En Julio el recuento pasa a 1.000 col/l y se detecta 0,6 ppb de microcistina disuelta. Aunque no se supera el primer límite de alerta establecido (más de 5.000 col/l), se pasa a recuento de microalgas quincenal.

En Agosto de 2010 se establece el **nivel de alerta I**, por recuentos de cianobacterias entre 5.000 y 10.000 col/l. Según este nivel de alerta se hacen



recuentos de microalgas y determinación de microcistina quincenal. Con estas muestras se hace la puesta a punto del test de lectinas y se introduce el test de hepatocitos tóxicos, que ya está optimizado.



Cultivo de hepatocitos

- En cuanto al resultado del test de lectinas, al no haber *Microcystis aeruginosa*, que es la diana estudiada de la lectina que estamos utilizando, no se sacan conclusiones.
- En cuanto al test de hepatocitos se observa toxicidad en las muestras en que se han concentrado las cianobacterias y se ha extraído la microcistina intracelular, pero no hay toxicidad en las muestras de agua filtradas. Se puede concluir que en algunas colonias puede haber microcistina intracelular, pero la cantidad total en el agua está muy por debajo del límite de toxicidad.

En Septiembre de 2010 el nivel de cianobacterias disminuye, desactivándose el nivel de alerta, aunque se mantienen los recuentos de microalgas quincenales. A finales de este mes nos alertan de la observación de un bloom de microalgas en una de las orillas del embalse.





Desde finales de Septiembre hasta primeros de Noviembre 2010, aunque por programación y niveles de alerta no estaba programado, realizamos recuento de microalgas y detección de microcistinas.

- El **recuento de cianobacterias** es inferior a 5.000 col/l, pero se encuentran grandes colonias de *Microcystis aeruginosa*.
- Se aplica el **test de lectinas**. **En dicho test se encuentra que parte de las colonias son productoras de toxina.**
- En el **análisis de microcistinas** se encuentran valores de 0,9 ppb en nuestro test, por lo que pasamos al **nivel de alerta V** (valores de cianobacterias bajos pero microcistina >0,5 ppb).
 - Según este nivel de alerta se realiza detección de microcistina en agua pretratada y tratada cada 3-5 días y se ponen en marcha, como prevención, los tratamientos para eliminación de microcistinas (ozonización + carbón activo).
 - Se envían alícuotas de las muestras de Septiembre y Octubre en que se detecta microcistina >0,5 ppb al laboratorio de la Universidad para la detección de microcistinas por otras técnicas. En los resultados que obtienen, la cantidad máxima de microcistina es de 0,31. Hay que tener en cuenta que esta medida esta realizada por HPLC, que solo mide toxinas individuales. La toxicidad real puede ser debida a la conjunción de efectos de varias toxinas, por lo que esta determinación no da idea de la toxicidad de la muestra.
- Se realiza en varias muestras el **test de hepatocitos (bioensayo)**. En dicho test **las muestras no presentan toxicidad**. Esto es consecuente con los resultados de microcistina que encuentran en la Universidad, por debajo de 0,4 ppb, que según las conclusiones de nuestra investigación, sería el límite a partir del cual nos daría positivo el test de hepatocitos.

La diferencia entre nuestros resultados de microcistina y los de la Universidad se debe a que los kit comerciales que existen para microcistina, en general, sobreestiman la concentración real. Sin embargo esto es adecuado para nuestros intereses, pues es mejor tener falsos positivos que falsos negativos.

Nos planteamos que lo más adecuado sería, en caso de detectar microcistina por encima de 0,5 ppb en nuestro kit comercial, realizar el test de hepatocitos



(bioensayo). Los resultados para establecer modificaciones en el tratamiento serían los obtenidos por el test de hepatocitos, que tendría en cuenta el efecto sumatorio de toxicidades.


En Noviembre de 2010 ha disminuido la concentración de microcistina, por lo que se pararon los tratamientos de ozono y carbón activo y se vuelve a la vigilancia mensual de microalgas y microcistinas.

A final de año se realiza un estudio de todos estos resultados, a efectos de definir un nuevo sistema de alerta, objetivo fundamental de este estudio. (Ver el apartado 5.-Conclusiones.)



4. DESARROLLO DEL PROYECTO EN CRONOGRAMA

	en	feb	mar	abril	mayo	junio	julio	agos	sept	oct	nov	dic
Bioensayo celular: Puesta a punto.	X	X										
Bioensayo celular: Pruebas con distintas muestras.						X						
Bioensayo celular: Intercalibración con otros organismos (Universidades, empresas de agua)							X					
Bioensayo celular: Ensayos con muestras de rutina.									X	X	X	
Diferenciación de colonias tóxicas: Puesta a punto						X						
Diferenciación de colonias tóxicas: Pruebas con distintas muestras.								X				
Diferenciación de colonias tóxicas: Intercalibración con otros organismos												
Discusión de resultados y estudio de modificaciones.									X			
Diferenciación de colonias tóxicas: Ensayos con muestras de rutina									X	X		
Propuesta de nuevos niveles de alerta- Utilidad respecto los manejados hasta ahora												X
Estudio de resultados- Conclusiones – Prespectivas de futuro												X

 Propuesto
 X Realizado



5. CONCLUSIONES

5.1. Bioensayo de toxicidad (TEST DE HEPATOCITOS)

5.1.1 La técnica ha sido puesta a punto con éxito y ha demostrado funcionar bien, pues ha demostrado ser una buena medida de toxicidad, proporcionando una medida más real que la detección de microcistina (que sobreestima la concentración real) y podría alertarnos ante presencia de varios tóxicos sinérgicos que no detectamos ahora por ningún otro método.

5.1.2 No se ha logrado encontrar una relación dosis-efecto, como era el objetivo inicial. Esto ha sido causado por la aparición de células resistentes en los distintos pases del cultivo realizados a lo largo del tiempo. Hemos encontrado que nos proporciona solo una medida cualitativa, pero muy fiable para dosis medias y altas (por encima de 0,4 ppb de microcistina LR equivalente), con elevada repetitibilidad y reproducibilidad. A bajas dosis (0,1 ppb) no se logra una adecuada reproducibilidad, en ocasiones los resultados salen bien y otras no se detecta nada.

5.1.3 Observamos la necesidad de hacer una serie de modificaciones en el protocolo:

- ❖ Realizar refundación al menos anual del cultivo con selección de células no resistentes.
- ❖ Introducir más replicas por muestra en el ensayo con el kit de proliferación. para una mejor repetitibilidad
- ❖ Realizar una comparación con otro procedimiento cualitativo (cambiando de medio de cultivo y con observación de daño celular al microscopio), para seleccionar el más adecuado.



5.2. Determinación de colonias productoras de toxinas (TEST DE LECTINAS)

5.2.1. Hemos logrado la puesta a punto con éxito de la técnica de detección y ha demostrado funcionar bien, ya que detectamos colonias productoras de toxina, cuando efectivamente con el kit comercial de microcistina se miden concentraciones de microcistina mayores que las habituales.

5.2.2. Se ha descartado realizar ensayos con otras lectinas, debido al buen funcionamiento de la lectina elegida y al escaso tiempo para desarrollar más técnicas, debido a las características de nuestro embalse. estamos condicionados a la aparición de un recuento suficientemente alto de cianobacterias, que varía en fechas, cantidad y especies presentes de un año a otro, aunque siempre coincide con el final de verano y principios de otoño.

5.2.3. En cuanto a su utilidad como alerta temprana, para introducirla dentro de nuestras alertas habría que cambiar la forma de trabajo.

La muestra sobre las que aplicamos todas las técnicas es el agua procedente del bombeo del embalse de Ullibarri a su llegada a la ETAP. Por tanto es el agua que esta a 13 m por debajo de la lámina del agua, en la cercanía del muro de la presa.

Los crecimientos de microalgas, incluidas cianobacterias, se dan en los primeros metros de la lámina del agua, donde llega la luz (zona fótica). Posteriormente van decantando y llegan a la profundidad donde tenemos la toma.

En caso de bloom de cianobacterias se observaría en las capas superficiales y, más fácilmente, en zonas de orilla donde el viento y/o las corrientes arrastren las floraciones.

Por tanto, para utilizar este test como alerta temprana sería necesario realizar periódicamente una inspección visual de las orillas (la periodicidad se puede establecer según nuestros resultados previos y la época del año). En caso de observarse acúmulos de color verde, se procedería a toma de muestra, recuento, identificación de especies, y en caso de observar *Microcystis aeruginosa*, aplicación del test de lectinas. Si con los resultados del test se ve presencia de colonias productoras de toxina, se aplicarían los niveles de alerta establecidos. En caso de no encontrar colonias productoras, no haría falta



realizar de forma intensiva medidas de microcistina ni bioensayos de toxicidad.

5.3. Niveles de alerta

5.3.1. Los niveles de alerta actualmente establecidos necesitan un ajuste:

- Si se basan solo en recuentos de microalgas no tenemos en cuenta que es probable que los aumentos de cianobacterias se den en superficie y, tras destruirse, lleguen a la profundidad de la toma solo las toxinas y no las cianobacterias. Por tanto hay que establecerlos con medida combinada de recuento de cianobacterias y determinación de microcistina.
- El kit comercial de microcistina que utilizamos (Mycrocystest de ZEU), al sobreestimar la microcistina, nos proporciona una adecuada alerta temprana. En el momento que el análisis de microcistina sea $>0,5\text{ppb}$ se introduciría el bioensayo de toxicidad, que nos proporcionará un dato real de la toxicidad del agua.
- Solo en caso de que el bioensayo de toxicidad fuera positivo se pondrían en funcionamiento los tratamientos adecuados para la eliminación de toxicidad (**Ozono y Carbón activo**), optimizando de esta forma el tratamiento a aplicar solo a los momentos en que así lo requieren.

5.3.2. En caso de tener medios para poder realizar una inspección periódica de las orillas del embalse, se podrían establecer unos niveles de alerta distintos.

- Estableceríamos como vigilancia, además de los recuentos de microalgas y cianobacterias y el seguimiento de microcistina en el agua que llega a la ETAP, la observación periódica de bloom de algas en superficie u orillas
- Si se observan bloom en orillas y en las muestras recogidas se identifican cianobacterias potencialmente tóxicas, se aplicaría el test de lectinas.
- Si con el test de lectinas se comprueba la presencia de colonias productoras de toxina, se realizaría una vigilancia intensiva de concentración de microcistina y detección de tóxicos por bioensayo en hepatocitos.



5.3.3. Nos planteamos para el futuro otros sistemas predictivos que nos proporcionen mayor información de lo que está pasando en el embalse, y que nos permitan actuar con antelación, no cuando el problema ya esta en el agua que recibimos en la ETAP desde el embalse.

Para ello estamos estudiando la posibilidad de instalar sondas de medida de varios parámetros, que influyen en la calidad de agua que vamos a recibir, e incluso la posibilidad de entrar en un proyecto de **BIOSENSORES**, (con transmisión via radio, GSM etc), es decir sondas en las que se incluyen microalgas resistentes y sensibles a determinados compuestos contaminantes, que nos alerten de la presencia de los mismos en el embalse con antelación a la presencia de los mismos en el agua que se bombea a la ETAP.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Laura Muro Molina, Salomé Ortiz de Landaluze, Nuria Cifuentes Ezquerro, y Araceli Vara Bernet. Detección y caracterización de microalgas tóxicas en el embalse de Ullibarri-Gamboa. Tecnología del Agua, num 302, pg 36-42
2. Skulberg, O.M., W.W. Carmichael, G. A. Codd, and R. Skulberg. 1993. Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria), p. 145-164. In I. R. Falconer (ed.), Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press, London, UK.
3. Carmichael, W.W., S. M. F. O. Azevedo, J. S. An, R. J. R. Molica, E. M. Jochimsen, S. Lau, K. L. Rinehart, G. R. Shaw, and G. K. Eaglesham. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environ. Health Perspect. 109(7): 663-668.



4. Jochimsen, E. M., W. W. Carmichael, J. S. An, D. M. Cardo, S. T. Cookson, C. M. D. Holmes, M. B. D. Antunes, D. A. De-Melo, T. M. Lyra, V. S. T. Barreto, S. M. F. O. Azevedo, and W. R. Jarvis. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialyses center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338(13):873-878.
5. Pouria, S., A. de Andrade, J. Barbosa, R. L. Cavalcanti, V. T. Barreto, C. J. Ward, W. Preiser, G. K. Poon, G. H. Neild, and G. A. Codd. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352:21-26.
6. Falconer IR. 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of Cyanobacteria. *Environmental Toxicology and water Quality* 6:177-184
7. Juan Martinez Hernandez, V. Lopez-Rodas, E. Costas. 2009. Microcystins from tap water could be a risk factor for liver and colorectal cancer: a risk identified by global change. *Medical Hypotheses*.
8. Kaebernick, M. and B. A. Neilan. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:1-9.
9. Costas, E., and V. López-Rodas. 1994. Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins. *J. Phycol.* 30:987-990.