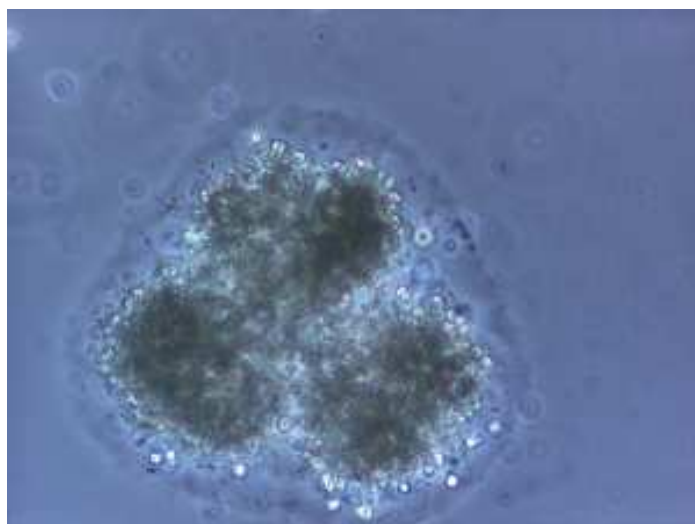




MEMORIA JUSTIFICATIVA DE LAS ACCIONES REALIZADAS DE LAS ACCIONES REALIZADAS

“Mejora del sistema de alerta de microalgas tóxicas y toxicología en el agua superficial para producción de agua de abastecimiento”





INDICE

1. FINALIDAD DEL PROYECTO Y OBJETIVOS PLANTEADOS
2. DESARROLLO DEL PROYECTO
3. CONCLUSIONES
4. PARTICIPANTES



1. FINALIDAD DEL PROYECTO Y OBJETIVOS PLANTEADOS

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.

Durante los últimos años, hemos desarrollado varios proyectos gracias a los cuales tenemos un conocimiento bastante completo de los cambios en la calidad del agua que nos llega desde el embalse y hemos ido estableciendo y mejorando un sistema de alerta basado en recuentos de microalgas, recuentos de cianobacterias, test de microcistinas y bioensayos en ratón. Estos niveles de alerta están enfocados para ajustar y adecuar el tratamiento en la ETAP ante la previsión de un aumento de tóxicos procedentes de las cianobacterias.

En el 2010 realizamos un proyecto de investigación, subvencionado por URA, en el que establecimos y calibramos un nuevo sistema de alerta. En dicho sistema de alerta se introduce un test de toxicidad en hepatocitos, como sustitución al bioensayo en ratón, se prueba la introducción de un test para detección de colonias productoras de toxina y finalmente se cambian el contenido de los niveles de alerta con la evolución observada durante ese año.



Tras la experiencia del proyecto realizado el año pasado y como continuación del mismo, hemos observado en los métodos que pusimos a punto, una serie de aspectos a mejorar. En este nuevo proyecto nos planteamos los siguientes objetivos:

- ✚ Optimizar el bioensayo celular para medición de toxicidad presente en el agua, probando la realización del test con otra línea celular y buscando un procedimiento que evite la utilización de test comerciales de detección de daño celular.
- ✚ Mejorar la sensibilidad del test de detección de colonias tóxicas, incorporando una modificación que mejore la sensibilidad de dicho test.
- ✚ En cuanto al sistema de alerta establecido al final del proyecto, tras observar las conclusiones a las que llegamos en el mismo, además de implantar el sistema de alerta creado y observar su eficacia, nos planteamos el introducir una inspección periódica en las orillas del embalse, incorporando los hallazgos de la inspección a los niveles de alerta.
- ✚ Nos proponemos estudiar la influencia de las condiciones de termoclina, oxiclina y concentración de pigmentos mediante los datos recogidos a través de sonda perfiladora, como sistemas predictivo 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 está en el agua que recibimos en la ETAP desde el embalse.



2. DESARROLLO DEL PROYECTO

El desarrollo de este proyecto y la introducción de los distintos ensayos a perfeccionar ha venido marcado por la evolución de las cianobacterias y cianotoxinas en el embalse a lo largo del año, que nos ha marcado 3 momentos:

- ✚ Desde el principio del proyecto hasta finales de Septiembre, puesto que los niveles de alerta y las observaciones en el embalse están por debajo de los límites de alerta (excepto a principios de Julio), se realiza una puesta en marcha y prueba de los distintos test con muestras externas y alguna muestra natural sin toxicidad.
- ✚ Desde final de Septiembre a principios de Noviembre se observa un bloom en distintas zonas del embalse, con lo cual se prueban los límites de alerta y los distintos test que se han puesto a punto.
- ✚ El último tramo del año, en que bajan los niveles de cianobacterias y cianotoxinas y suben los de diatomeas, se han dedicado a repetir alguna analítica, para ver la reproducibilidad de la misma, y a la recepción y puesta en marcha de la sonda perfiladora, puesto que durante el año se ha realizado estudio de ofertas, selección del equipo y propuesta de compra del mismo y no ha sido hasta final de año que hemos podido disponer del mismo.

Se adjunta una tabla con la evolución del embalse integrando todas las informaciones.



Resumen de actuaciones.

mes	objetivo	evento / resultado
Enero a Junio	Niveles alerta	Valores en Ullibarri ETAP por debajo de alerta 1 (cianofíceas <5.000col/l y microcistina<0,5ppb)
Enero a Abril	Test toxicidad	Se comienza con nueva linea celular, tras haber perdido anterior
Abril a Octubre	Sonda perfiladora	Proceso de selección y compra
Mayo	Test toxicidad	Se pone a punto técnica de congelación y descongelación de lineas celulares
Mayo-Junio	Test toxicidad	Primeras pruebas con test HAM10+ kit proliferación con muestras suministradas y naturales Las muestras naturales analizadas no presentan toxicidad
Mayo-Junio	Test toxicidad	Puesta a punto de test con RPMI en frasco y en microplaca, con muestras suministradas y naturales Las muestras naturales analizadas no presentan toxicidad
Primeros de Julio	Niveles alerta	Alerta 1 por recuento cianofíceas >5000 col/l (principalmente Microcystis flosaque). Microcistina<0,5 ppb
Julio a mediados Agosto	Niveles alerta	Valores en Ullibarri ETAP por debajo de alerta 1 (cianofíceas <5.000col/l y microcistina<0,5ppb)
Julio	Test detección colonias toxicas	Ensayo con muestras suministradas Se desecha el test por no considerarlo util.
Julio-Agosto	Test toxicidad	Realización en paralelo de test HAM10+ kit proliferación y test con RPMI, con muestras suministradas y natu Las muestras naturales analizadas no presentan toxicidad
Julio	Inspección orillas	Establecimiento de puntos de inspección
Agosto-Septiembre	Inspección orillas	No se encuentra nada



Continuación: Resumen de actuaciones.

mes	objetivo	evento / resultado
17 Agosto	Niveles alerta	Alerta 1 por recuento cianofíceas >5000 col/l (por Chroococcus y Gomphosphaerea)
Final agosto y Septiembre	Niveles alerta	Valores en Ullibarri ETAP por debajo de alerta 1 (cianofíceas <5.000col/l y microcistina<0,5ppb)
28 sept a mediados Octubre	Inspección orillas	Se detecta bloom en el embalse. Inspección de orillas intensiva Principalmente Gomphosphaerea, pero también colonias grandes de Myrocistis aeruginosa. También se observa, en menor medida, Microcystis flosaque, Anabaena, Oscillatoria
Octubre	Test toxicidad	Intercalibración de los test, con 7 muestras proporcionad por UCM
Octubre	Test detección colonias toxicas	Ensayo con muestras del bloom detectado En las colonias de Microcystis aeruginosa hay células productoras de toxina y otras no productoras
Octubre-Noviembre	Test toxicidad	Realización en paralelo de test HAM10+ kit proliferación y test con RPMI, con muestras del bloom detectado Algunas de las microalgas presentes en el bloom contienen toxinas, pues los concentrados son positivos al test Las muestras naturales, de agua de entrada a la ETAP, no presentan toxicidad
Octubre	Niveles alerta	Se adelanta analítica por observaciones realizadas en embalse Alerta 4 por valores de microcistina>0,5 ppb (recuentos de cianofíceas < 5000col/l). El resultado en agua de entrada es de 0,4 ppb intracelular y 0,4 ppb disuelta Se dosifica Carbón activo para eliminar parte de toxina y mejorar sedimentación. Resultado en agua de salida es 0,3 ppb de microcistina.
Final Octubre a principios Noviembre	Inspección orillas	Se continúa con inspección de orillas intensiva No se detecta nada
Noviembre y Diciembre	Niveles alerta	Valores en Ullibarri ETAP por debajo de alerta 1 Se detectan valores de diatomeas muy altos.
Noviembre y Diciembre	Sonda perfiladora	Elección de punto de control y primeras medidas Embalse en fase de mezcla



3. CONCLUSIONES

3.1. TEST TOXICIDAD

- Se desestima el uso del test de toxicidad con RPMI en microplaca, por no demostrar resultados correctos en un porcentaje alto de muestras y tener una falta de reproducibilidad grande, dado que necesita la dedicación de una persona, que se haga experta en la visualización diaria de hepatocitos.
- No se ha podido testar suficientemente el test con RPMI en frasco, pues no se ha podido disponer de controles positivos para comprobar si es un buen test rápido en caso de sospecha de toxicidad en agua natural (no para testar concentrados).
- El test de toxicidad con HAM-F10-MTT ha demostrado ser adecuado para el uso previsto. No es necesario hacer observación previa al microscopio, pues dicha observación es una medida subjetiva y necesita una persona experta. El resultado tras el kit de proliferación es el utilizado para clasificar la muestra como tóxica o no tóxica. Sin embargo es necesario en el futuro realizar más ensayos por duplicado para encontrar y corregir las causas de no reproducibilidad observadas.
- Puesto que el test de toxicidad con HAM-F10-MTT, aunque da buenos resultados, no es un test rápido, que era uno de nuestros objetivos iniciales, se piensa en abrir una nueva vía, para rematar este proyecto en un tercer año, utilizando tecnologías más modernas basadas en fluorescencia. Estas técnicas nos permitirían observar el disparo de señales celulares de los hepatocitos, de forma inmediata, ante la presencia de muestras con toxicidad. Este test rápido nos permitiría la repetición varias veces en el mismo día, para asegurar el resultado y no depender de una baja reproducibilidad.
- Es muy conveniente realizar análisis de microcistinas a las muestras que se procesan para el test de toxicidad. Son medidas que se pueden complementar, pues en caso de no haber microcistina, pero o bien hay presencia de otros tóxicos o bien hay efectos sinérgicos de varios tóxicos, el test de toxicidad nos da esa información. En caso de detectar



microcistina y tener un negativo en el test de toxicidad, se debería hacer un estudio más amplio para descartar falsos positivos o falsos negativos.

3.2. TEST DE DETECCIÓN DE COLONIAS TÓXICAS

- Se ha observado que así como en los *Microcystis* del Sur y Centro de España hay un ligamiento entre marcado positivo con lectina y presencia de toxicidad, en los *Microcystis* de Ullibarri no se observa el mismo tipo de fase en el ligamiento. Sería necesario buscar otro tipo de marcado usando específicamente *Microcystis* de Ullibarri.
- Se considera que el test de detección de colonias tóxicas no aporta información importante, pues la presencia o no de colonias productoras se detecta de forma más clara con la realización de los test de toxicidad y microcistinas sobre los concentrados algales.

3.3. INSPECCIÓN DE ORILLAS Y SONDA PERFILADORA

- La inspección de orillas ha resultado clave para detectar un bloom producido, de forma temprana, permitiendo la realización de los distintos test del proyecto y pudiendo hacer una preparación anticipada de los tratamientos a aplicar en la ETAP en caso necesario.
- En cuanto a los puntos de inspección en orillas, para alertar de la intensificación de la vigilancia en el agua de entrada a la ETAP, es suficiente con inspección y toma de muestras en los puntos más cercanos a la captación, es decir, los puntos identificados como "presa" y "playa", con inspección también en el punto identificado como "tubería". Los puntos identificados como "landa" y "garaio" no han dado más información que estos primeros, y dada su situación requieren mayor tiempo de desplazamiento y dedicación a los análisis posteriores.
- Puesto que no se ha podido disponer de la sonda multiparamétrica hasta final de año, no se tienen medidas para ver las circunstancias en que se ha producido y se ha desecho el bloom. Esperamos para el siguiente año, una vez que ya tenemos la sonda puesta en marcha y el punto de muestreo establecido, poder relacionar las medidas obtenidas con dicho equipo con las observaciones tanto en la inspección de orillas como en el agua que entra a la ETAP.



3.4. NIVELES DE ALERTA

- Se comprueba de nuevo que, para los niveles de alerta en el agua de entrada a la ETAP, es necesario interpretar los recuentos de cianobacterias junto con la concentración de microcistinas. Se ha observado que tras el bloom detectado en superficie no aumentan los recuentos de cianobacterias en el agua de entrada a la ETAP (procedente del fondo del embalse), pero si aumenta la concentración de microcistinas, debido a la destrucción de las cianobacterias de superficie y la liberación de la toxina intracelular.
- Se ha comprobado de nuevo que hay desarrollo de microalgas tóxicas en el embalse de Ullibarri. Es conveniente, por tanto, mantener un seguimiento del mismo con niveles de alerta bien establecidos, que permitan tener preparados los tratamientos adecuados, pero introducirlos solo cuando sea necesario. Este año no se detecta toxicidad en el agua de entrada a la ETAP, pero por los resultados en el embalse y los niveles de microcistina, se introduce el tratamiento con carbón activo, que permite mejorar la floculación y quitar tanto colonias productoras como toxina disuelta.
- Con todos los resultados observados se va a realizar una mejora en los niveles de alerta en las que se tengan en cuenta:
 - Agua de entrada a la ETAP: Determinación de microalgas y microcistina. Test de toxicidad cuando los resultados anteriores lo recomienden.
 - Inspección de orillas en el embalse: Observación de floraciones y determinación de microalgas y microcistina en la época crítica (de Julio a Noviembre, intensiva los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre)
 - Medidas con sonda perfiladora en la presa: Para observar circunstancias en que se producen bloom y ajustar programación de vigilancia.



4. PARTICIPANTES

La dirección del proyecto, recogida de resultados y elaboración de informe ha sido realizada por Laura Muro Molina, Jefa de Sección Microbiología del Área de Tratamiento y Control de Calidad de AMVISA.

Todo el personal suscrito al Área ha participado, de mayor o menor manera, en este proyecto: Los distintos test han sido realizadas por Araceli Vara y Nuria Cifuentes; Las inspecciones han sido realizadas por Verónica Afonso, con ayuda de Silvia Martín; La puesta en marcha de la sonda perfiladora y primeras medidas ha sido realizada con la ayuda de Fernando Armentia y Ricardo Niso.

La asesoría técnica y el suministro de muestras de control ha sido realizado por los catedráticos Eduardo Costas y Victoria Lopez-Rodas, pertenecientes a la Universidad Complutense de Madrid y a su EBT ALGASGEN.

Este proyecto no habría sido posible sin el impulso y dirección dentro de AMVISA de Rosario Muñoz de la Peña, Jefa del Área.