

Problemas de las cianobacterias en aguas de recreo y aguas de consumo

CARIDAD DE HOYOS ALONSO (*), LAURA VILLÉN DE LA FUENTE (*), DELIA MARTÍN DEL POZO (*), LAURA CONDE BUENO (*), ANA MARÍA ALONSO GARCÍA (*), MARÍA ELENA GONZÁLEZ RAMOS (*), MARÍA VERDUGO ALTHOFER (*) y JUAN AVILÉS GARCÍA (*)

RESUMEN Se han detectado afloramientos de microcistinas en masas de aguas de todo el mundo. La aparición de estos afloramientos puede provocar problemas en la calidad del agua debido a que ciertas especies de cianobacterias son capaces de producir toxinas –microcistina, anatoxinas, saxitoxina o cilindroespermopsina– que provocan riesgos para la salud pública. Durante los últimos tres años se han muestreado 35 embalses españoles, con el fin de determinar la presencia y concentración de dichas cianotoxinas. Los resultados muestran que en el 70% de las muestras que contenían cianobacterias, las concentraciones de microcistinas eran superiores al límite recomendado por la Organización Mundial de la Salud en agua potable. En los próximos cuatro años el CEH continuará con estos estudios en embalses de abastecimiento.

CYANOBACTERIA AND CIANOTOXINS IN SPANISH RESERVOIRS

ABSTRACT *Cyanobacterial blooms have been reported in waterbodies all over the world. The occurrence of blooms could create water quality problems, as certain species of cyanobacteria are capable of producing toxins –microcystin, anatoxin, saxitoxin or cylindrospermopsin– that have been implicated in cases of human illness. During the last three years, 35 Spanish water reservoirs were sampled in order to assess the occurrence and concentration of cyanotoxins. Results show that in the 70% of the samples with cyanobacteria, the microcystin concentrations were higher than the World Health Organisation recommended limit for drinking water ($1 \mu\text{g/l}$). In the next four years CEH will continue these studies in Spanish drinking water reservoirs.*

Palabras clave: Eutrofia, Cianobacterias, Técnicas analíticas, Microcistinas, Bioensayo.

1. INTRODUCCIÓN

Las Cianobacteria son organismos procariotas fotosintéticos que pueden formar parte del fitoplancton de lagos y embalses y que en algunas ocasiones, si las condiciones de temperatura son favorables y abundan los nutrientes, principalmente el fósforo, pueden dar lugar a proliferaciones (“blooms”) cuando la densidad celular es muy alta.

Se considera que existe un afloramiento cuando las concentraciones celulares son del orden de 20.000 células por ml que corresponde a $10 \mu\text{g l}^{-1}$ de clorofila. Para nuestras aguas estos niveles son bastante bajos y quizás se podría hablar de valores cercanos a los 20-30 $\mu\text{g l}^{-1}$ de clorofila (Quesada, 2005). Estas proliferaciones son apreciables por la coloración verde-azuladas de las aguas.

La eutrofización de los ambientes acuáticos, es decir el enriquecimiento de las aguas superficiales en sustancias nutritivas (N y P) principalmente en aguas lénticas favorece el crecimiento de poblaciones de cianobacterias (Reynolds, 1987). Estos crecimientos masivos ocurren principalmente durante el verano y principios de otoño en los lagos y embalses eutróficos y mesotróficos y a veces se acumulan en la superficie formando espumas (“scum”) (Figura 1).

Muchas cianobacterias al igual que otras algas fitoplanctónicas producen olores o sabores. Aunque los problemas principales es la posible producción de toxinas que disminuyen la calidad del agua y hace que el agua no sea útil para el consumo y baño (Codd et al, 1999; Kuiper-Goodman et al, 1999).

Las toxinas de las cianobacterias presentan estructuras químicas muy variables (Sivonen & Jones, 1999): péptidos cíclicos como las hepatotoxinas (microcistinas, cilindroespermopsina), alcaloides de bajo peso molecular como las neurotoxinas (anatoxinas, saxitoxinas), entre otras. Existen casos registrados y bien documentados de intoxicaciones producidas por cianobacterias. En el caso de las hepatotoxinas los efectos pueden ser serios a elevadas concentraciones, fundamentalmente en el tracto gastrointestinal, y particularmente en el hígado, habiendo sido descritas muertes o afecciones graves, en varios países, causadas por dichos compuestos. En Brasil en 1985 hubo 2000 casos de gastroenteritis por agua potable, con 88 letales y en 1996 se detectó intoxicación por vía sanguínea en 130 pacientes dializados y de ellos, 60 murieron en 10 meses (Kuiper-Goodman et al, 1999). Por otro lado, está bien establecida la relación entre la exposición crónica a estos compuestos a dosis subletales y el desarrollo de cáncer de hígado (Quesada, 2003). Estos problemas para la salud humana han convertido a las cianobacterias en un foco de atención para los gestores de los recursos hídricos.

(*) Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX.



FIGURA 1. "Scum" de cianobacterias Embalse de Las Cogotas. Agosto 2006.

Entre los principales grupos de cianobacterias productoras de toxinas figuran: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* y *Nodularia* (Sivonen & Jones, 1999).

2. PROPUESTAS DE LA OMS, LEGISLACIÓN EUROPEA Y LEGISLACIÓN ESPAÑOLA

Las cianotoxinas más abundantes en las aguas dulces de todo el mundo son las microcistinas. La Organización Mundial de la Salud recomienda $1 \mu\text{g/l-1}$ (MC-LR) como el límite máximo para las aguas que se van a dedicar a consumo humano. La legislación española recoge este valor de $1 \mu\text{g/l-1}$ de microcistinas totales a la salida de la ETAP (RD 140/2003), pero no establece que tipos de microcistinas se han de medir. El resto de las toxinas no están recogidas por la legislación española. En el artículo 7 de este Real Decreto

se entiende que los Organismos de Cuenca y las Administraciones Hidráulicas de las Comunidades Autónomas deberían incluir a las cianobacterias dentro de la vigilancia de las aguas destinadas a la producción de agua de consumo, por producir éstas *contaminantes que entrañan riesgos para la salud pública*. Aunque en la normativa actual sobre la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable no se contempla ningún aspecto relacionado con las cianobacterias.

En cuanto a las aguas de recreo, la OMS propone que se usen las cantidades de cianobacterias como valor guía, ya que no se conocen todas las cianotoxinas, y por tanto medir la concentración de cierta toxina no asegura la falta de toxicidad del medio. Dada la heterogeneidad temporal y espacial en el desarrollo de las cianobacterias, proponen hablar de potencialidad del sistema para albergar grandes poblaciones de cianobacterias. Esta idea se recoge en la Directiva 2006/7/CE sobre aguas de baño que en su artículo 8 señala: *Cuando el perfil de las aguas de baño indique propensión a la proliferación de cianobacterias, se llevará a cabo un control adecuado que permita la identificación oportuna de los riesgos para la salud*. No se señala ningún nivel de cianobacterias o cianotoxinas límite. Además, en este mismo artículo se indica que *Cuando se produzca proliferación de cianobacterias y se haya determinado o presumido la existencia de un riesgo para la salud, se adoptarán inmediatamente medidas de gestión adecuadas con el fin de prevenir la exposición a aquéllas, que incluirán la información al público*. El RD 134/2007 transpone la Directiva Europea a la legislación española y en su Artículo 6. Punto 2, se señala: *Cuando el perfil de las aguas de baño muestre una propensión a las cianobacterias se llevara a cabo un control adecuado que permita su identificación y se comunicará a la autoridad sanitaria que evaluará los riesgos para la salud*.

3. SITUACIÓN DEL PROBLEMA DE LAS CIANOBACTERIAS EN ESPAÑA

En la Tabla 1 podemos ver la abundancia de cianobacterias en los embalses españoles Esta tabla sido realizada con datos de 171 embalses españoles obtenidos de bases de datos de diferentes instituciones (principalmente del CEDEX) que cubren un periodo de 30 años, desde 1973 hasta 2003.

Los resultados muestran que en la mitad de los embalses españoles las cianobacterias son abundantes o dominantes y se observa diferencia en la distribución de estos organismos entre los embalses situados en la parte oeste de la península (zona silicea) y los de la zona este, situados sobre rocas más solubles. En los primeros el porcentaje de embalses con cianobacterias abundantes o dominantes es mucho mayor. Estos resultados son similares a otros publicados y basados en un menor número de embalses (De Hoyos et al, 2004).

	Zona W silicea	Zona E	España
Nº de embalses	75	96	171
% emb sin cianobacterias	4	16,7	11,1
% emb con escasas cianobacterias	22,7	49	37,4
% emb con cianobacterias abundantes	36	19,8	26,9
% emb con cianobacterias dominantes	37,3	14,6	24,6

TABLA 1. Abundancia de Cianobacterias en los embalses españoles.



FIGURA 2. Localización de los embalses estudiados.

La tendencia más habitual sugiere que la dominancia de cianobacterias se centra en la época estival y en ecosistemas eutróficos, aunque en algunas ocasiones pueden ser muy abundantes en ecosistemas con grados tróficos medios.

Los datos sobre cianotoxinas en los embalses españoles son más escasos. Desde el año 2004 al año 2007 se ha llevado a cabo en el CEDEX un estudio para la Subdirección General de Gestión Integral del Dominio Público Hidráulico del Ministerio de Medio Ambiente sobre cianobacterias y cianotoxinas en embalses españoles utilizados para usos recreativos o destinados a producción de aguas de consumo. Se han estudiado un total de 35 embalses (figura 2) algunos de ellos durante varios años, desde mayo hasta octubre analizándose parámetros físico-químicos y biológicos (en el CEDEX y en la Universidad de Salamanca) y cianotoxinas y toxicidad (en la Universidad Autónoma de Madrid).

Los resultados de la primera fase del estudio indican que las toxinas más abundantes en España son las microcistinas. En nuestro estudio, el 70% de las muestras en las que las cianobacterias fueron dominantes, presentaron microcistinas (Equiv MCLR) en concentraciones superiores a $1\mu\text{g/l}$. Si relacionamos estos resultados con los de la tabla 1, más del 15% de los embalses españoles presentarían en algún momento concentraciones de microcistinas totales superiores a $1\mu\text{g/l}$.

Se ha detectado por primera vez en España cilindrospermopsina. Hasta ahora ha sido encontrada en dos embalses: Arcos (Guadalquivir), asociada a *Aphanizomenon ovalisporum* y Vega de Jabalón (Guadiana), asociada a *Cylindrospermopsis raciborskii* (figura 3). La cilindrospermopsina ha sido identificada en Europa como un problema emergente, relacionado aparentemente con la presencia de especies de cianobacterias supuestamente invasivas (Padisák, 1997,

Fastner et al, 2003). España es en donde se han detectado las concentraciones de esta toxina más elevadas en Europa (Quesada et al, 2006).

Dentro de las neurotoxinas, la anatoxina, que ha sido descrita en algunos países europeos (Bumke-Vogt et al, 1999), no es muy frecuente en España, al menos es lo que parecen indicar los primeros datos recogidos en los ecosistemas investigados. Sólo se ha encontrado en concentraciones



FIGURA 3. *Cylindrospermopsis raciborskii*.

bajas en el embalse de Rosarito (Tajo), asociada a *Anabaena flos-aquae* (Carrasco et al, 2007). Otras neurotoxinas importantes, las saxitoxinas no han sido analizadas durante la primera fase de este estudio, pero en los embalses españoles hay especies de cianobacterias potencialmente productoras de esta toxina y se ha encontrado en aguas portuguesas (Peireira et al, 2000) por lo que a partir de este año se analizará esta toxina en los embalses en los que se pueda sospechar su presencia.

Los estudios de toxicidad con *Artemia salina* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*, han ofrecido resultados algunas veces bastante dispares. Este límite de detección es bajo por lo que se va a seguir investigando en estos métodos y se van a empezar a utilizar otros bioensayos basados en cultivos celulares.

Por otro lado, los muestreos repetidos de varios puntos, durante varios años, han permitido estudiar la variabilidad interanual de cianobacterias. El cociente de variación interanual para el biovolumen de cianobacterias es 1,12, es un valor muy alto, mucho mayor que en el caso de la clorofila: 0,37. También es muy variable la composición específica de un año a otro. Este aspecto debería tenerse en cuenta en la elaboración de los perfiles de aguas de baño requeridos en la Directiva 76/160/CEE, en los que hay que señalar la propensión de proliferación de cianobacterias.

4. FUTUROS PROYECTOS DEL CENTRO DE ESTUDIOS HIDROGRÁFICOS

En la primavera del 2008 y dentro de la Encomienda de Gestión (2007-2011) firmada entre el CEDEX y la Dirección General del Agua se va a iniciar el estudio "Identificación molecular de cianobacterias potencialmente productoras de toxinas, análisis de cianotoxicidad y bioensayos de toxicidad mediante nuevos métodos". Este estudio de cuatro años de duración es continuación de los realizados anteriormente y se va a centrar en embalses destinados al agua de consumo.

En este nuevo proyecto se seguirá contando con la colaboración de la Universidad Autónoma de Madrid y de la Universidad de Salamanca en aspectos nuevos o que requieran un trabajo de investigación (revisiones taxonómicas, análisis de nuevas toxinas, bioensayos con cultivos celulares e identificación molecular de cianobacterias productoras de toxinas).

En el Centro de Estudios Hidrográficos y dentro del Área de Medio Ambiente Hídrico, además de continuar con los trabajos que se han venido realizando hasta ahora (muestreos de campo, análisis físico-químicos, determinación y cuantificación de fitoplancton e identificación de las especies potencialmente tóxicas), se han realizado varias inversiones para la puesta a punto metodologías que permitirán el análisis de toxinas y toxicidad (figuras 4, 5, 6 y 7).

5. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

En la mayoría de los casos la identificación de especies cianobacterianas potencialmente tóxicas no es suficiente para determinar si un afloramiento es tóxico o no ya que varias cepas con diferente toxicidad pueden pertenecer a la misma especie. Por ello es necesario caracterizar la toxicidad.

Los bioensayos dan una idea de la toxicidad efectiva de la muestra permitiendo así revelar la existencia de posibles sinergias o antagonismos entre compuestos o la presencia de nuevas sustancias tóxicas que permanecerían ocultas en el caso de las técnicas analíticas. En toxicología se usa el concepto de la dosis letal 50 (DL50) como la dosis necesaria para matar a la mitad de la población en estudio. Esta variable nos va a permitir comparar como de tóxicas son diferentes sustancias, de manera que valores pequeños nos van a indicar mayores toxicidades, dado que es necesario estar expuesto a menores dosis para matar al 50% de la población.

El bioensayo con ratones consiste en una inyección intraperitoneal seguida de una observación durante 24 horas. Es un método que mide la toxicidad total. Este tipo de ensayos



FIGURA 4. Columna de rotación y espectrofotómetro de doble haz (C.E.H).



FIGURA 5. Incubador para *Artemia salina* (C.E.H).



FIGURA 6. Determinaciones de microcistinas mediante ELISA (C.E.H).

se han ido abandonando poco a poco debido, entre otras, a consideraciones prácticas y morales, mientras que el desarrollo de otro tipo de métodos ha ido cobrando fuerza.

Se han utilizado muchas especies de zooplancton en bioensayos para detectar la presencia de microcistinas y otras cianotoxinas. Según Campbell y colaboradores (1994), el bioensayo con *Artemia salina* demuestra una buena correlación entre la concentración de microcistinas y la mortalidad. También ha dado buenos resultados con anatoxina-a (Kiriwanta et al., 1991) y cilindrospermopsina (Metcalf et al., 2002). Otros estudios demuestran además que el bioensayo con *Artemia salina* presenta mayor sensibilidad que otros bioensayos muy usados, como es el de ratón.

Por estos motivos, y además, por su facilidad de llevar a cabo y relativo bajo coste, se ha considerado el bioensayo con *Artemia salina* el método más adecuado para cubrir el objetivo del presente proyecto (figuras 4 y 5).



FIGURA 7. Determinaciones de microcistinas por HPLC/MS/MS (C.E.H).

6. ANÁLISIS DE MICROCISTINAS

Actualmente ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) es el método más extendido para la detección y cuantificación de microcistinas. Está basado en reacciones inmunológicas. Se han desarrollado anticuerpos policlonales, y kits de ELISA para microcistinas que visualizan los efectos mediante una reacción de peroxidada (figura 6).

Los inmunoensayos acoplados a enzimas se basan en la combinación selectiva de anticuerpos y reacciones enzimáticas para producir sistemas analíticos capaces de detectar niveles muy bajos de sustancias químicas. Se utiliza un soporte sólido de microplacas recubiertas de anticuerpos. Dada la capacidad discriminadora de los anticuerpos se logra una elevada selectividad, así como elevada sensibilidad

gracias al poder catalítico de las enzimas asociadas. Toda esta reacción enzimática da lugar a una solución de color inversamente proporcional a la concentración de microcistinas de la muestra. Por lo que un color más oscuro significa una baja concentración de microcistinas y un color claro significa una elevada concentración de microcistinas.

Existen técnicas más específicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta es una técnica analítica utilizada para separar los componentes de una mezcla, en función de los tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y las columnas cromatográficas. Las técnicas analíticas actuales no solo son capaces de cuantificar con exactitud una muestra, sino que pueden proporcionar información detallada sobre las variantes de las toxinas presentes.

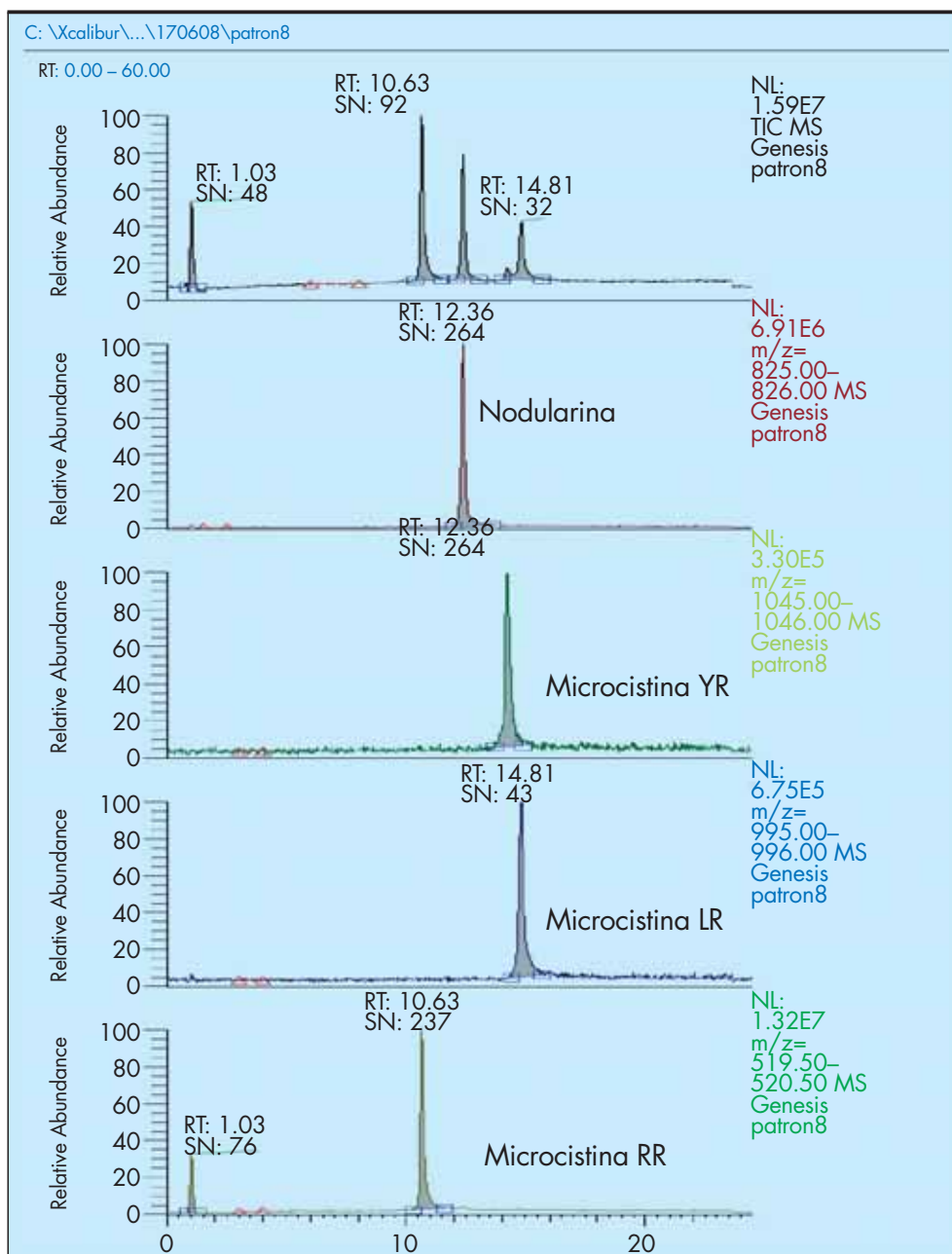


FIGURA 8. Cromatograma e iones extraídos de una mezcla patrón de nodularina, microcistina YR, microcistina RR y microcistina LR.

Uno de los métodos más extensamente utilizados en HPLC para la detección de cianotoxinas, implica la separación de las toxinas en una columna C18 utilizando un gradiente agua y acetonitrilo, ambos con el 0.05% de ácido trifluoroacético (TFA).

Las técnicas de detección acopladas a HPLC más empleadas para la determinación de cianotoxinas en aguas son la detección por fotiodo-array (HPLC-PDA) y la espectrometría de masas (HPLC-MS). La detección por PDA tiene una capacidad limitada a la hora de distinguir entre las diferentes variantes de microcistinas si estas coeluyen, debido a que la mayor parte de las variantes tienen un perfil de absorción similar entre 200 y 300 nm, impidiendo en ciertos casos la correcta identificación.

Se puede alcanzar una identificación más exacta de estas biotoxinas mediante el empleo de la espectrometría de masas (MS), debido a que permite obtener una "huella digital" de las toxinas individuales. La espectrometría de masas permite llevar a cabo determinaciones cualitativas y cuantitativas, y analizar mezclas complejas de compuestos orgánicos muy diversos con rapidez y sensibilidad, suministrando información estructural de los compuestos presentes. Esta técnica se puede utilizar para la detección y la cuantificación de saxitoxina, anatoxina-a, microcistinas, nodularinas y otras biotoxinas presentes en el agua. Además el acoplamiento en tandem de MS/MS permite fragmentar el ión de interés y el análisis de los fragmentos generados, lo que permite una mejor identificación y cuantificación de la toxina analizada. Esto lo convierte en un instrumento de diagnóstico útil para identificar variantes de microcistinas de los que no se poseen patrones e identificarlas de forma inequívoca en muestras ambientales complejas.

Pero en general estos métodos requieren un proceso previo de limpieza y concentración de la muestra, que en algunos casos es tedioso y lento. En la actualidad se están realizando estudios encaminados a realizar procesos de una forma on-line, combinando el uso de dos columnas cromatográficas, la primera destinada a la preconcentración de un volumen determinado de muestra y una segunda columna destinada a la separación analítica. Esto permite utilizar un menor volumen de muestra y una mayor velocidad de análisis y menor manipulación de la muestra con el consiguiente deterioro de la misma.

El laboratorio de Calidad de las Aguas ha adquirido un sistema HPLC-MS/MS formado por un sistema E-Quan para preconcentración on-line, una bomba de ultra-alta presión y un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (TSQ Quantum) (figura 7). Se está realizando la determinación de diversas cianotoxinas (saxitoxina, anatoxina-a, microcistinas, nodularinas) y otras biotoxinas presentes en el agua de embalses. En la figura 8 se muestra un cromatograma de una disolución patrón que contiene tres variantes de microcistinas y nodularina y los correspondientes espectros de los iones extraídos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bumke-Vogt, C., Mailahn, W. & Chorus, I. 1999. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environ. Toxicol.* 14: 117-25.
- Carrasco, D., Moreno, E.; paniagua, T., De Hoyos, C., Wormer, L., Sanchis, D., Cirés, S., Martín del Pozo, D., Codd, G.A. & Quesada, A. 2007. Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in Spanish reservoirs. *J. Phycol.* 43: 1120-1125.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Kaya, K., Ward, C.J., Beattie, K.A. & Metcalf, J.S. (1999). Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol.*, 34: 405-415.
- Campbell, D. L., Lawton, L. A., Beattie, K. A. & Codd, G.A. (1994). Comparative assesment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (Microcystin-LR-Containing) cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 9:71-77.
- De Hoyos, C., Negro, A.I. & Aldasoro, J.J. 2004. Cyanobacteria distribution and abundance in the Spanish water reservoirs during stratification. *Limnetica* 23 (1-2): 119-132.
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, V., Eaglesham, G.K. & Chorus, I. 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42: 313-21.
- Kuiper-Goodman, Falconer, T.I. & Fitzgerald J. (2002). Human health aspects. In *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus, I. & J. Bartram ed.
- Kirivanta, J., Sivonen, K. & Niemela, S. I. 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia Salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6:423-436.
- Metcalf, J.S., Lindsay, J., Beattie, K.A., Birmingham, S., Saker, M.L., Torokne, A.K. & Codd, G.A. (2002) Toxicity of Cylindrospermopsin to the Brine Shrimp *Artemia Salina*: Comparisons With Protein Synthesis Inhibitors and Microcystins. *Toxicon*, 40, pp. 1115-1120.
- Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wotoszynska) Seenaya and Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of ecology. *Arch. Hydrobiol.* 107 (suppl): 563-93.
- Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araújo, F., Lagos, N. & Oshima Y. 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*, 38: 1689-1702.
- Quesada, A. 2003. Cianobacterias y cianotoxinas en España. *Algas* 30: 7-9.
- Quesada, A. 2005. *Toxicidad de cianobacterias. Biología y ecología de las cianotoxinas*. XII Curso sobre Limnología aplicada: Embalses, lagunas y ríos. CEDEX. 149-156.
- Quesada, A., Moreno, E., Carrasco, D., Paniagua, T., Wormer, L. De Hoyos, C and Sukenik, A. 2006. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur. J. Phycol.* 41: 39-45.
- Reynolds, C.S. 1987. Cyanobacterial Water-blooms. *Biol. Rev.*, 50: 437-481.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. . In *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus, I. & J. Bartram ed.