

Características ambientales, composición del fitoplancton y variación temporal de microcistina-LR disuelta en el embalse de As Forcadas (Galicia, NW España)

Lago, L.^{1,*}, Barca, S.^{1,2}, Vieira-Lanero, R.^{1,2} y Cobo, F.^{1,2}

¹ Universidade de Santiago de Compostela. Departamento de Zooloxía e Antropoloxía Física, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela.

² Estación de Hidrobioloxía “Encoro do Con”, USC. Castroagudín s/n, 36617 Vilagarcía de Arousa.

* Autor responsable de la correspondencia: lorena.lago@usc.es

Recibido: 02/12/2013

Aceptado: 05/05/2014

ABSTRACT

Environmental characteristics, phytoplankton composition and temporal variation of dissolved microcystin-LR in As Forcadas reservoir (Galicia, NW Spain)

Because of cyanobacteria can produce bioactive compounds and cyanotoxins their blooms are an environmental problem with serious implications for human and animal health. Among that, *Microcystis aeruginosa* is widely known because it may produce hepatotoxins called microcystins.

In this work, we have studied the composition and dynamics of phytoplankton, the trophic state, the correlations of physicochemical parameters with dissolved microcystin-LR (MC-LR) concentrations and the bathymetric temporal variation of MC-LR in relation to the abundance of *M. aeruginosa* and temperature in As Forcadas reservoir (Valdoviño, A Coruña, Spain). Evidences of massive proliferation episodes of *M. aeruginosa* in As Forcadas have been recorded since 2006 (Cobo *et al.*, 2012).

We observed that the process of eutrophication in As Forcadas reservoir got worse in recent years and it is considered now as a reservoir with eutrophic characteristics. The results also indicated that temperature was one of the critical factors for *M. aeruginosa* development during the annual cycle. In addition, we observed that nutrients, especially ammonium, were favouring the development of this species. Finally, the highest concentration of MC-LR was observed at the bottom of the reservoir.

These results show the importance of the knowledge of the annual cycle of the cyanobacteria and the bathymetric temporal variation of *M. aeruginosa* and its toxins.

Key words: *Cyanobacteria*, *Microcystis*, microcystin-LR, eutrophication, life cycle, temperature, ammonium.

RESUMEN

Características ambientales, composición del fitoplancton y variación temporal de microcistina-LR disuelta en el embalse de As Forcadas (Galicia, NW España)

Como consecuencia de que las cianobacterias pueden producir compuestos bioactivos y cianotoxinas sus afloramientos constituyen un serio problema ambiental con graves repercusiones sobre la salud humana y animal. Entre ellas, *Microcystis aeruginosa* es ampliamente conocida por poder producir la hepatotoxina denominada microcistina.

En este trabajo se estudió la composición y dinámica del fitoplancton, el estado trófico, las correlaciones de los parámetros físico-químicos con la concentración de microcistina-LR disuelta (MC-LR) y la variación batimétrica temporal de esta última en relación con la abundancia de la especie *M. aeruginosa* y con la temperatura en el embalse de As Forcadas (Valdoviño, A Coruña, España). Las evidencias de episodios de proliferaciones masivas de *M. aeruginosa* en As Forcadas se han registrado desde el año 2006 (Cobo *et al.*, 2012).

Se observó que el proceso de eutrofización del embalse de As Forcadas se agravó en los últimos años, considerándose actualmente como una masa de agua con características eutróficas. Asimismo, los resultados indican que la temperatura es uno de los factores críticos para el desarrollo de *M. aeruginosa* durante el ciclo anual estudiado. También se observó que los

nutrientes, especialmente el amonio, intervienen favoreciendo el desarrollo de *M. aeruginosa*. Finalmente, las concentraciones más altas de MC-LR se observaron en el fondo del embalse.

Los resultados obtenidos muestran la importancia de conocer el ciclo anual de las cianobacterias, su variación batimétrica temporal y de las toxinas que producen.

Palabras clave: Cyanobacteria, *Microcystis*, microcistina-LR, eutrofización, ciclo vital, temperatura, amonio.

INTRODUCCIÓN

El género cianobacteriano *Microcystis* y concretamente su especie tipo *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing, 1846 es el responsable más común, a nivel mundial, de los afloramientos causantes de problemas toxicológicos (Cobo *et al.*, 2012). Hasta la fecha se han identificado más de noventa variantes químicas de microcistina (Metcalf & Codd, 2012) entre las que se encuentra la microcistina-LR, es una de las más frecuentes en las comunidades planctónicas de los ecosistemas acuáticos continentales (Carrasco, 2007). Esta cianotoxina presenta una elevada toxicidad con una dosis letal media (DL50) de 50 µg/kg (Harada, 1996; Vergara Larrayad *et al.*, 2005).

Reynolds *et al.* (1981) describieron el ciclo anual de la especie meroplanctónica *M. aeruginosa* para embalses templados. En este ciclo se incluyen las fases de hibernación de las células en las capas superiores del sedimento, la recolonización posterior en primavera de la columna de agua y su crecimiento en superficie y el hundimiento o sedimentación de las células durante el otoño. Este ciclo ha sido objeto de varios estudios de campo a partir del año 1980 hasta la actualidad (Reynolds *et al.*, 1981; Visser *et al.*, 1995; Ihle *et al.*, 2005; Verspagen *et al.*, 2005).

La fase de recolonización del ciclo vital de *M. aeruginosa* ha sido relacionada con un incremento de la temperatura del fondo (Ihle *et al.*, 2005) mientras que la fase de sedimentación ha sido relacionada con un descenso de la temperatura otoñal en la columna de agua (Visser *et al.*, 1995; Ihle *et al.*, 2005; Wörmer *et al.*, 2011). El periodo de tiempo en el que tiene lugar la llegada de las células de *Microcystis* a la superficie desde el sedimento se reduce al incrementarse la tasa de crecimiento, pero también influyen en él las condiciones del agua en primavera, principalmente

la temperatura (Wiedner *et al.*, 2007; Cirés *et al.*, 2013a).

La estrategia vital de esta especie cianobacteriana consiste, por tanto, en depositar formas latentes en el sedimento durante largos periodos de tiempo (Latour *et al.*, 2007), incluso años (Reynolds *et al.*, 1981). Sobre la función de esta sedimentación existe un gran debate. Por un lado, la mayor parte de los autores consideran que las células de *M. aeruginosa* depositadas en el sedimento serán el inóculo para el siguiente afloramiento (Brunberg & Blomqvist, 2003; Ihle *et al.*, 2005), mientras que otros, como Verspagen *et al.* (2005) afirman que los sedimentos de las masas de agua actúan más como un sumidero de células que como una fuente de reserva.

La presencia de *M. aeruginosa* es común en los embalses de la Península Ibérica (Vasconcelos *et al.* 1995, 1996; Vasconcelos 2001; De Hoyos *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2006; Cobo *et al.*, 2012; Cirés *et al.*, 2013a, 2013b; Agha Frías, 2013) y bajo ciertas condiciones (temperatura, luz, estratificación del agua, etc.), puede dar lugar a afloramientos excepcionales, sobre todo en los meses de septiembre a octubre, acompañadas frecuentemente de casos de toxicidad (Cobo *et al.*, 2012).

Los aspectos moleculares de la síntesis de microcistinas se han publicado una vez que el grupo de genes *mcy* fue totalmente secuenciado y esclarecida su organización (Tillett *et al.*, 2000). Se considera que el gen *mcyD* es esencial en la síntesis de microcistinas, ya que está involucrado en la síntesis del ácido Adda que es el responsable de la su toxicidad (Tillett *et al.*, 2000) y, por tanto, se considera un marcador de inducción a su síntesis (Kuniyoshi *et al.*, 2013). Asimismo, se ha visto que la variación en la producción de microcistinas es específica, incluso para cada cepa, y está determinada genéticamente (Orr & Jones, 1998).

La producción neta de microcistinas parece estar relacionada con la división celular, mientras que los factores ambientales sólo influirían de forma indirecta, a través de su efecto sobre el crecimiento y la división celular (Orr & Jones, 1998). Aun así, se han realizado varios estudios evaluando su producción en relación con varios factores como la intensidad lumínica (Wiedner *et al.*, 2003; Zilliges *et al.* 2011), el pH (Jähnichen *et al.*, 2001), el hierro (Utkilen & Gjølme, 1995; Martín-Luna *et al.*, 2006) y el metabolismo del nitrógeno (Ginn *et al.*, 2010). Aunque poco se sabe de la respuesta de *Microcystis* a la variación en las concentraciones de fósforo, se ha estudiado el efecto de la disponibilidad de fosfato en la síntesis de microcistina tanto en condiciones de laboratorio (Lee *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000; Vézie *et al.*, 2002; Downing *et al.*, 2005; Kuniyoshi *et al.*, 2013) como de campo (Gobler *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2009). En definitiva, se considera que la producción de toxinas está influida por tres factores principales: la dinámica del fitoplancton, la presencia de cepas productoras/no productoras de cianotoxinas y factores ambientales diversos (Cameán *et al.*, 2005).

La función biológica de las microcistinas no se conoce con exactitud. Algunos autores hablan de funciones protectoras, otros de una posible función como quelante de hierro intracelular y otros las implican en la señalización y en la división celular (véanse referencias en Cobo *et al.*, 2012). En lo que se refiere al ciclo vital de *M. aeruginosa* se ha considerado la posibilidad de que las microcistinas puedan desempeñar un papel tanto en la supervivencia de las colonias durante la recolonización (Tsujiyama *et al.*, 2000) como en el mantenimiento de la colonia durante la fase bentónica (Ihle *et al.*, 2005).

En España se han realizado varios estudios (Wörmer *et al.*, 2011, Cirés *et al.*, 2013a, 2013b) que tienen como objetivos comprender el ciclo de vida de *Microcystis*, los procesos que tienen lugar y los factores que influyen en él; proporcionar una visión de la etapa de hibernación mediante el control de los sedimentos; investigar la tasa de sedimentación de las poblaciones de *Microcystis* y de las microcistinas y vigilar los cambios en las concentraciones de microcistinas intra-

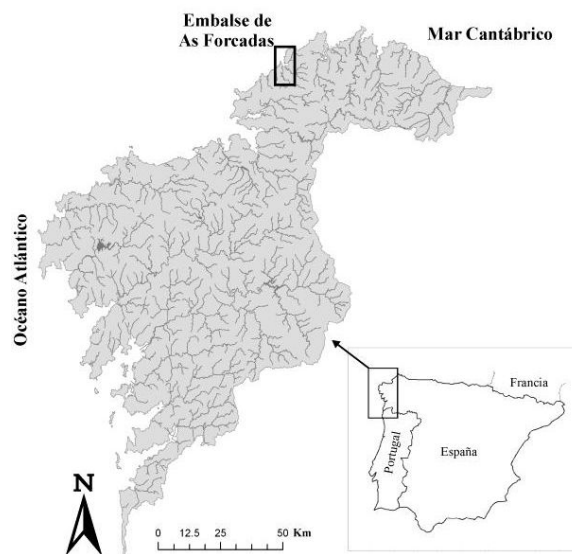


Figura 1. Localización del embalse de As Forcadas. *Location of As Forcadas reservoir.*

celulares. Estos estudios tienen una implicación evidente en las estrategias de gestión, para las que también se debe considerar que las microcistinas se acumulan en las células de las cianobacterias en forma de metabolitos intracelulares, liberándose principalmente durante la lisis celular (Rohrlack & Hyenstrand, 2007). La rotura de la pared celular puede ser natural o estar provocada artificialmente por inadecuados sistemas de depuración del agua. Además, estas toxinas son muy estables y no son destruidas por los tratamientos oxidantes más utilizados en las plantas potabilizadoras (Douma *et al.*, 2010). A esto hay que sumar que las microcistinas se conservan en el interior de las células incluso cuando éstas se encuentran en etapas de reposo y sedimentación. Esto supone un riesgo importante en embalses en los que el agua es captada en profundidad (Wörmer *et al.*, 2011).

El papel de estas células sedimentadas como posible inóculo de los siguientes afloramientos debe tenerse en cuenta también tanto para la detección temprana del afloramiento como para las acciones de mitigación de las proliferaciones mediante la alteración de los sedimentos (Verspagen *et al.*, 2005).

La morfología de la cubeta de la masa de agua afecta al ciclo estacional de *M. aeruginosa*,

pues se considera un factor clave que influye en la hibernación y en la recolonización (Cirés *et al.*, 2013a). Por otro lado, los cambios en la tasa de renovación de lagos y embalses también condicionan el desarrollo de los afloramientos de cianobacterias (Vicente *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se han estudiado la composición y dinámica del fitoplancton en el embalse de As Forcadas, el estado trófico, las correlaciones de los parámetros físico-químicos con la concentración de microcistina-LR disuelta y su variación batimétrica temporal en relación con la abundancia de la especie *M. aeruginosa* y con el parámetro temperatura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización

El estudio se llevó a cabo entre abril del año 2010 y marzo del 2011 en el embalse de abastecimiento de As Forcadas (Fig. 1) de 10.7 hm³ (Augas de Galicia, 2010), situado en el ayuntamiento de

Valdoviño, en la provincia de A Coruña (Galicia, NW España) en las coordenadas UTM (Datum WGS84) siguientes: 29T 573799 4829624. La presa de este embalse es de gravedad con compuertas como tipo de aliviadero. Su longitud de coronación es de 182 m con 21 m de altura sobre los cimientos. Es un embalse monomítico silíceo que recibe el aporte de una cuenca de 60 km² con una temperatura media anual del aire de 13.7 °C (MeteoGalicia, 2012a y 2012b).

Este embalse fue construido en el año 1966 y desde el año 2006 hasta la actualidad se han registrado afloramientos de cianobacterias potencialmente tóxicas como *Anabaena* sp., *Anabaena planctonica* Brunthaler, 1903, *Gomphosphaeria* sp., *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin, 1933 y *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, 1846, siendo esta última especie la dominante en los afloramientos (Cobo *et al.*, 2012).

El embalse de As Forcadas tiene una profundidad media de 6 metros (volumen/superficie). El punto de muestreo seleccionado para este estudio se situó en las coordenadas UTM (Datum WGS84): 29 T 573668 4829344, en la margen izquierda del embalse, aproximadamente a 50 m

Tabla 1. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos (*Cyanobacteria*, *Ochrophyta* *Dinoflagellata*, *Chlorophyta* and *Charophyta*), presencia del género *Microcystis* (+: presente, -: ausente) y géneros del fitoplancton más abundantes durante el ciclo anual (desde abril del año 2010 a marzo del año 2011) con sus biovolúmenes medios (mm³/l) y errores típicos. *Relative abundance of major taxonomic groups* (*Cyanobacteria*, *Ochrophyta* *Dinoflagellata*, *Chlorophyta* and *Charophyta*), *presence of the genus Microcystis* (+: present, -: absent) and the most abundant genus of phytoplankton during the annual cycle (from April 2010 to March 2011) with their mean biovolume (mm³/l) and standard errors.

Abundancia relativa de los grupos taxonómicos (%)								
	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Ochrophyta</i>	<i>Dinoflagellata</i>	<i>Chlorophyta</i>	<i>Chlarophyta</i>	Presencia <i>Microcystis</i>	Género más abundante	Biovolumen medio (mm ³ /l)
abril 2010	0.01	99.84	0.00	0.15	0.00	-	<i>Fragilaria</i>	4.48 ± 4.29
mayo 2010	0.00	94.50	0.69	4.13	0.69	-	<i>Dinobryon</i>	0.93 ± 0.50
junio 2010	0.00	92.39	1.20	6.40	0.02	-	<i>Fragilaria</i>	0.22 ± 0.04
julio 2010	0.22	87.39	5.12	7.20	0.07	-	<i>Fragilaria</i>	0.94 ± 0.89
agosto 2010	0.00	93.29	0.71	5.86	0.14	-	<i>Fragilaria</i>	1.55 ± 1.40
septiembre 2010	92.96	6.38	0.00	0.62	0.04	+	<i>Microcystis</i>	1.38 ± 1.08
octubre 2010	86.35	11.19	0.00	2.46	0.00	+	<i>Microcystis</i>	0.21 ± 0.17
noviembre 2010	4.79	68.26	0.00	26.94	0.00	+	<i>Fragilaria</i>	0.07 ± 0.02
diciembre 2010	5.52	66.67	0.00	27.82	0.00	+	<i>Fragilaria</i>	0.06 ± 0.02
enero 2011	4.72	70.34	0.00	24.94	0.00	+	<i>Fragilaria</i>	0.06 ± 0.03
febrero 2011	0.00	97.39	0.08	2.53	0.00	-	<i>Fragilaria</i>	1.73 ± 0.99
marzo 2011	0.00	97.59	0.14	2.22	0.05	-	<i>Fragilaria</i>	1.52 ± 0.91

de la orilla con una profundidad media durante el periodo de muestreo de 7 m.

Métodos de muestreo

La recogida y traslado de las muestras al laboratorio se realizó según las normas UNE-EN25667-2 y UNE-EN ISO 5667-3. La toma de muestras se llevó a cabo todos los días 27 de cada mes a las 11 de la mañana durante un año de estudio mediante el uso de una botella “Van Dorn” a distintas profundidades: superficie, 2 m, 4 m y fondo, que se corresponde con una muestra superficial, otra coincide con el valor medio de la profundidad del disco de Secchi, otra al doble de dicha profundidad y la última a unos 10 cm del sedimento aproximadamente. El total de muestras fue de 48 en todo el periodo de estudio.

Los materiales de los envases utilizados para la recogida de las muestras fueron seleccionados según la analítica a realizar; de este modo, se utilizó el polietileno de alta densidad (HDPE), el vi-

drio y el vidrio esterilizado, según las especificaciones de las normas y estándares existentes para los diferentes parámetros físico-químicos (UNE-EN25667-2, UNE-EN ISO 5667-3). Los envases se lavaron con agua destilada y con agua de la propia estación de muestreo. En el momento de la toma de cada muestra se determinó la profundidad de Secchi, el pH, la conductividad y la cantidad de sólidos disueltos mediante una sonda multiparamétrica Crison MM40, y también la tasa de saturación de oxígeno y el oxígeno disuelto mediante un oxímetro portátil YSI 550A con electrodo de membrana. Las muestras recogidas, con un volumen de 250 ml, se trasladaron al laboratorio refrigeradas a 4 °C en neveras portátiles.

Cálculo del estado trófico

Para valorar el estado trófico del embalse de As Forcadas se usó el índice del estado trófico de Carlson-TSI (1977), uno de los más utilizados. Este índice puede variar entre 0 (oligotrófico) y

Tabla 2. Estadística descriptiva de los parámetros físico-químicos y biovolumen. “n.d.”: valor inferior al límite de detección de la técnica empleada (Límites de detección: 0.15 mg/l para el amonio, 0.035 mg/l para los nitritos, 0.05 mg/l para el fósforo total y 0.2 µg/l para la microcistina-LR). *Para el cálculo de la estadística descriptiva del pH se tuvo en cuenta que la escala de este parámetro es logarítmica. *Descriptive statistics of physicochemical parameters and biovolume. “n.d.” value lower detection limit of the method (0.15 mg/l for ammonium, 0.035 mg/l for nitrite, 0.05 mg/l for total phosphorus and 0.2 µg/l for microcystin-LR). * For the descriptive statistics it was taken into account that pH had a logarithmic scale.*

	n	Media	Error típico	Mediana	Moda	Desviación estándar	Varianza de la muestra	Rango	Mínimo	Máximo	Nivel de confianza (95.0 %)
Profundidad de Secchi (m)	12	2.07	0.24	1.86	1.28	0.83	0.68	2.68	1.28	3.96	0.52
pH	48	8.51*	8.15	7.56	7.69	8.99	17.98	9.77	6.50	9.77	8.45
Temperatura (C)	48	15.93	0.74	16.05	19.20	5.14	26.4	16.20	8.60	24.80	1.49
Conductividad (µS/cm)	48	90.45	1.61	93.80	92.80	11.13	123.82	46.90	61.90	108.80	3.23
Saturación de oxígeno (%)	48	81.69	2.84	83.95	99.00	19.66	386.61	125.00	18.00	143.00	5.71
Oxígeno disuelto (mg/l)	48	7.95	0.30	8.15	9.00	2.05	4.19	11.20	1.68	12.88	0.59
TDS (mg/l)	48	57.60	1.05	59.70	55.80	7.24	52.46	28.80	39.60	68.40	2.10
Turbidez (NTU)	48	58.16	19.66	10.13	10.55	136.21	18 553.23	556.35	1.65	558.00	39.55
Sólidos en suspensión (mg/l)	48	233.15	122.72	5.00	2.00	850.25	722 922	5546.00	0	5 546.00	246.89
Amonio (mg/l)	48	0.08	0.03	n.d.	n.d.	0.24	0.06	1.07	n.d.	1.07	0.07
Nitritos (mg/l)	48	0.03	0.01	n.d.	n.d.	0.08	0.01	0.39	n.d.	0.39	0.02
Nitratos (mg/l)	48	4.04	0.25	4.20	4.19	1.73	3.00	7.63	1.25	8.88	0.50
Fósforo total (mg/l)	48	0.02	0.01	n.d.	n.d.	0.08	0.01	0.44	n.d.	0.44	0.02
Nitrógeno total (mg/l)	48	0.69	0.02	0.68	0.63	0.17	0.03	0.77	0.38	1.15	0.05
MC-LR (µg/l)	48	0.29	0.07	n.d.	n.d.	0.46	0.22	1.40	n.d.	1.40	0.13
Clorofila “a” (µg/l)	48	58.10	18.80	19.00	12.00	130.26	16 966.69	814.00	6.00	820.00	37.82
Ficocianina (µg/ml)	48	1.70	0.43	1.52	n.d.	2.96	8.77	19.17	n.d.	19.17	0.86
Biovolumen (mm ³ /l)	48	2.28	0.47	1.30	2.63	3.25	10.59	18.43	0.09	18.53	0.94

100 (hipereutrífico). Generalmente se obtiene a partir de una transformación de la transparencia del Disco de Secchi y de otros parámetros, como la concentración de clorofila y el fósforo total. Para su cálculo se han seguido las fórmulas que resultan de una modificación realizada por Aizaki *et al.* (1981) a la propuesta por Carlson (1977).

Análisis químicos

Todos los análisis se realizaron siguiendo la metodología descrita en Standard Methods 10200 H (APHA, 1998) y Gómez *et al.* (2009). El análisis de la turbidez del agua se determinó por el método nefelométrico con un turbidímetro portátil (nefelómetro) Digimed DM-C2. En el caso de los sólidos en suspensión se filtró la muestra mediante una bomba de vacío a través de un filtro de fibra de vidrio de 0.45 μm y este filtro se secó a 105 °C para determinar el residuo retenido en el filtro mediante pesada.

El amonio se determinó espectrofotométricamente a 420 nm utilizando el método de la nesslerización (APHA, 1998) con un límite de cuantificación de 0.15 mg/l. La determinación de nitritos (NO_2) se realizó también mediante colorimetría, en este caso el color se determinó fotométricamente a una longitud de onda de 525 nm (APHA, 1998) con un límite de detección de 0.035 mg/l. La determinación de nitratos (NO_3) se realizó por el método espectrofotométrico ultravioleta selectivo a 275 nm de longitud de onda, después de la adición de ácido clorhídrico 1 M para eliminar las posibles interferencias (APHA, 1998) y en este caso, el nivel de detección es de 0.5 mg/l. El nitrógeno total disuelto se determinó por el método espectrofotométrico mediante un test comercial Spectroquant (Merk) con límite de detección 0.3 mg/l y el fósforo total disuelto se determinó en forma de ortofosfatos (P biodisponible) empleando el método colorimétrico del ácido ascórbico (APHA, 1998) con un límite de cuantificación de 0.05 mg/l.

La detección y determinación de microcistina-LR disuelta se realizó por ELISA utilizando el kit EnviroGard Microcystins QuantiTube. Está calibrado con una microcistina-LR no tóxica y sucedánea a niveles equivalentes a 0.2, 0.8 y 4.0

partes por billón (ppb) de microcistina-LR. Este kit utiliza anticuerpos policlonales, los cuales se unen a las microcistinas si éstas están presentes en las muestras o a un conjugado microcistina-enzima en el caso de que éstas no estén presentes, dando lugar a la aparición de una coloración azulada inversamente proporcional a la concentración de microcistina presente en la muestra. Dicha coloración se detecta en un espectrofotómetro de doble longitud de onda, fijándolo para la lectura a 450 nm-600 nm. El límite de detección del ELISA es de 0.2 $\mu\text{g/l}$.

Los pigmentos analizados fueron la clorofila "a" y la ficocianina que se utilizaron como medida indirecta de la biomasa del fitoplancton. El procedimiento para el análisis de la clorofila incluye la concentración del fitoplancton, la extracción del pigmento con una solución de acetona al 90 % en oscuridad durante 24 horas a 5 °C y la determinación de la densidad óptica del extracto a 630, 645, 665 y 750 nm por medio de un espectrofotómetro (Gómez *et al.*, 2009). Para estimar la concentración de clorofila se utilizó la siguiente ecuación: $Chl\ a\ (\mu\text{g/l}) = [11.6(A_{665} - A_{750}) - 1.31(A_{645} - A_{750}) - 0.14(A_{630} - A_{750})] Ve / (Vf \cdot L)$; donde $Chl\ a$: clorofila a ($\mu\text{g/l}$), A_x : absorbancia a x nm, Ve : volumen del extracto (l), Vf : volumen filtrado (l) y L : longitud de la cubeta (cm) (Gómez *et al.*, 2009). En este caso el límite de detección es de 0.01 ($\mu\text{g/l}$).

El procedimiento para el análisis de la ficocianina incluye la concentración del fitoplancton, la extracción del pigmento con tolueno y la determinación de la densidad óptica del sobrenadante a 620 nm por medio de un espectrofotómetro en una cubeta de 1 cm de anchura (Gómez *et al.*, 2009). Para estimar la concentración de ficocianina se utilizó la siguiente ecuación: $PC = 135A_{620}$; donde PC : concentración de ficocianina ($\mu\text{g/l}$) y A_{620} : absorbancia a 620 nm (Blumwald & Tel-Or, 1982). El límite de detección de este método es de 0.001 ($\mu\text{g/l}$).

Análisis del fitoplancton

Para la realización del estudio del fitoplancton de As Forcadas se aplicó la norma directriz UNE-EN 15204, utilizando para la identificación y re-

Tabla 3. Correlación de Spearman entre diferentes parámetros y la abundancia de *Microcystis aeruginosa* y la concentración de microcistina-LR disuelta (** $p < 0.01$ (bilateral) y * $p < 0.05$ (bilateral)). Spearman's rank correlation coefficient between different parameters and the abundance of *Microcystis aeruginosa* and the concentration of dissolved microcystin-LR. (** $p < 0.01$ (bilateral) and * $p < 0.05$).

	Abundancia <i>M. aeruginosa</i> (cél/ml)	MC-LR ($\mu\text{g/l}$)
pH	0.334*	-0.011
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	-0.371**	0.480**
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	0.078	0.151
Saturación de oxígeno (%)	0.130	-0.202
Oxígeno disuelto (mg/l)	0.374**	-0.376**
TDS (mg/l)	0.109	0.186
Turbidez (NTU)	0.406**	0.097
Sólidos suspensión (mg/l)	0.067	0.146
Amonio (mg/l)	-0.359*	0.547**
Nitritos (mg/l)	-0.459**	0.600**
Nitratos (mg/l)	-0.271	0.034
Fósforo total (mg/l)	0.232	0.128
Nitrógeno total (mg/l)	-0.394**	-0.102
MC-LR ($\mu\text{g/l}$)	-0.409**	—
Clorofila "a" ($\mu\text{g/l}$)	0.181	0.153
Ficocianina ($\mu\text{g/l}$)	0.669**	-0.565**
Abundancia <i>M. aeruginosa</i> (cél/ml)	—	-0.409**
Biovolumen <i>M. aeruginosa</i> (mm^3/l)	—	-0.346*

cuento la cámara de conteo Sedwick-Rafter bajo el microscopio óptico convencional Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara digital Nikon de 12 megapíxeles de resolución con software de biometría (NIS-Elements BR 3.0®). La exactitud de esta cámara de recuento se incrementó contando un número pequeño de campos en varias cámaras, con preferencia a un gran número de campos en una sola cámara (UNE-EN 15204:2007). Durante el análisis cuantitativo del fitoplancton se realizó un inventario de los taxones y un recuento de las células presentes de cada taxón, aquellas que se encontraron dentro de las líneas del campo de recuento, a nivel de género a excepción de las cianobacterias cuya identificación fue a nivel de especie. En la identificación de los taxones se utilizaron claves y guías especializadas (Anagnostidis & Komárek, 1988; Komárek & Anagnostidis, 1999; Krammer & Lange-Bertalot, 2000). Para los criterios de clasificación de los filos se

ha seguido la propuesta en AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2013). Finalmente, para la determinación del biovolumen de los fitoplanctones se utilizó el método de Rott (1981).

Análisis estadístico

Con el fin de observar la relación de los parámetros físico-químicos con la cianotoxina microcistina-LR disuelta y con la abundancia de la especie *M. aeruginosa* se realizó el análisis de la correlación de Spearman ($\alpha = 0.05$). Este análisis se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versión 15.0).

Asimismo, también se realizó un análisis de componentes principales (PCA), con las mismas variables que en la correlación de Spearman, para obtener una representación gráfica de las relaciones entre todos los parámetros analizados durante el estudio. El PCA fue realizado, normalizando los datos previamente, mediante el paquete ade4 del software R versión 3.0.1 (R Development Core Team 2013).

RESULTADOS

Estado trófico

El valor del estado trófico de Carlson-TSI (1977) es 57.39, lo que sitúa al embalse de As Forcadas en el rango más bajo de la eutrofia.

Composición del fitoplancton

En el embalse de As Forcadas se han identificado 31 géneros diferentes pertenecientes a los filos *Cyanobacteria* Stanier ex Cavalier-Smith, 2002, *Ochrophyta* Cavalier-Smith, 1995, *Dinoflagellata* Bütschli, 1885, *Chlorophyta* Pascher, 1914 y *Charophyta* Möhn, 1984. Durante el periodo de estudio el único género cianobacteriano identificado ha sido el género *Microcystis* Kützing ex Lemmermann, 1907 y, de este, la especie *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, 1846.

En la Tabla 1 se presentan la abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos, la

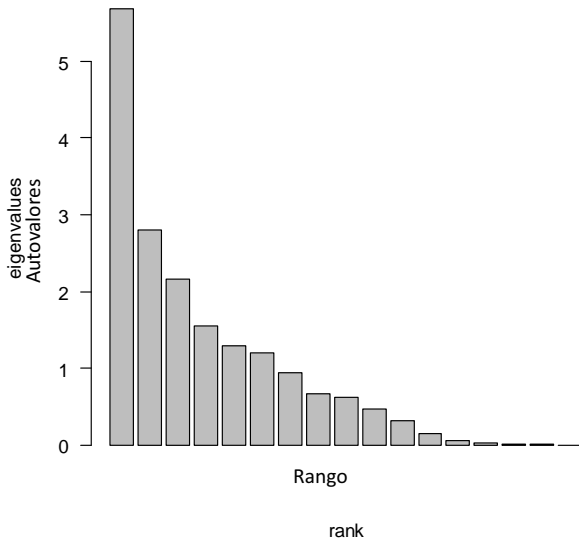


Figura 2. Histograma de valores propios para el análisis de componentes principales. *Histogram of eigenvalues for Principal Component Analysis.*

presencia o ausencia del género *Microcystis* y los géneros más abundantes del fitoplancton con sus biovolúmenes medios durante el ciclo anual estudiado (abril del año 2010 a marzo del año 2011).

La presencia de *M. aeruginosa* se incrementa durante los meses de septiembre y octubre del año 2010, cuando se han calculado un máximo de 147 950 cél./ml en la muestra tomada en superficie en el mes de septiembre y un máximo de 23 467 cél./ml en el mes de octubre, también en superficie.

Parámetros físico-químicos

En la Tabla 2 se presentan los valores medios de los parámetros físico-químicos analizados y del biovolumen total del fitoplancton.

Los valores máximos de concentración de microcistina-LR ($\geq 1 \mu\text{g/l}$) se han observado en superficie en el mes de junio, con $1.20 \mu\text{g/l}$ de MC-LR disuelta y en el fondo durante los meses de abril, mayo y junio del año 2010 con valores de $1.20 \mu\text{g/l}$, $1.30 \mu\text{g/l}$ y $1.40 \mu\text{g/l}$ respectivamente.

Las variables que presentaron una correlación de Spearman significativamente positiva ($\alpha = 0.05$) con la concentración de MC-LR disuelta fueron la temperatura, el amonio y los ni-

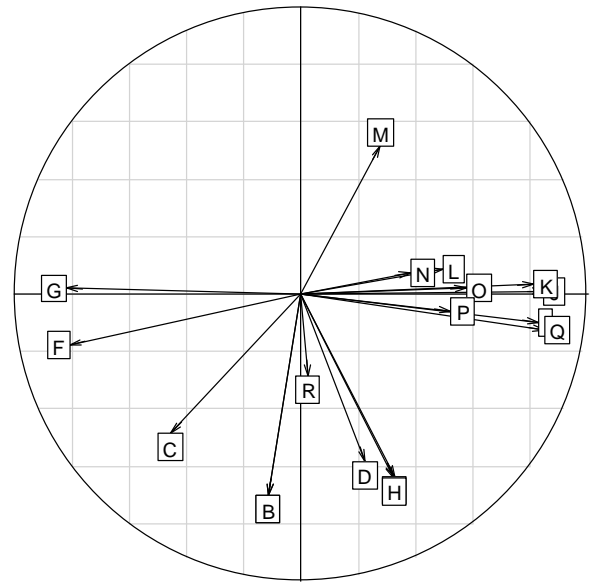


Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA) de correlación en círculo de los parámetros físico-químicos y de la abundancia y biovolumen de *Microcystis aeruginosa*. Los códigos de las variables son: (A) abundancia *M. aeruginosa* (cél./ml), (B) biovolumen *M. aeruginosa* (mm^3/l), (C) pH, (D) temperatura ($^{\circ}\text{C}$), (E) conductividad ($\mu\text{S/cm}$), (F) saturación de oxígeno (%), (G) oxígeno disuelto (mg/l), (H) total sólidos disueltos (mg/l), (I) turbidez, (NTU), (J) sólidos en suspensión (mg/l), (K) amonio (mg/l), (L) nitritos (mg/l), (M) nitratos (mg/l), (N) fósforo total (mg/l), (O) nitrógeno total (mg/l), (P) microcistina-LR disuelta ($\mu\text{g/l}$), (Q) clorofila "a" ($\mu\text{g/l}$) y (R) ficocianina ($\mu\text{g/l}$). *Principal component analysis (PCA) correlation circle of the physiochemical parameters and abundance and biovolume of Microcystis aeruginosa. The codes of the variables are: (A) abundance of M. aeruginosa (cells / ml.), (B) biovolume of M. aeruginosa (mm^3 / l), (C) pH, (D) temperature ($^{\circ}\text{C}$), (E) conductivity (mS/cm), (F) oxygen saturation (%), (G) dissolved oxygen (mg/l), (H) total dissolved solids (mg/l), (I) turbidity (NTU), (J) suspended solids (mg/l), (K) ammonium (mg/l), (L) nitrites (mg/l), (M) nitrates (mg/l), (N) total phosphorus (mg/l), (O) total nitrogen (mg/l), (P) dissolved microcystin-LR ($\mu\text{g/l}$), (Q) chlorophyll "a" ($\mu\text{g/l}$) and (R) phycoyanin ($\mu\text{g/l}$).*

tritos. Por otro lado, las variables que presentaron una correlación negativa significativa con la hepatotoxina fueron la abundancia y el biovolumen de la especie *M. aeruginosa*, el oxígeno disuelto y el pigmento ficocianina. Las variables que presentaron una correlación positiva significativa ($\alpha = 0.05$) con la abundancia de la especie *M. aeruginosa* fueron el pH, el oxígeno disuelto, la turbidez y la ficocianina. Finalmente, las variables que presentaron una correlación negativa significativa ($\alpha = 0.05$) con la abundancia

de *M. aeruginosa* fueron la temperatura, el amonio, los nitritos, el nitrógeno total disuelto y la microcistina-LR disuelta (Tabla 3).

Los dos primeros ejes del PCA representaron el 47.10 % de la varianza total, con los ejes 1 y 2 explicando el 31.54 % y el 15.55 % de la varianza total, respectivamente (Fig. 2).

El primer eje se asoció positivamente con las siguientes variables ordenadas de mayor a menor coeficiente de correlación (r): clorofila "a" ($r = 0.85$), sólidos en suspensión ($r = 0.85$), turbidez ($r = 0.83$), amonio ($r = 0.81$), nitrógeno total ($r = 0.58$), microcistina-LR disuelta ($r = 0.52$), nitritos ($r = 0.50$). Asimismo, el primer eje se asoció negativamente con un coeficiente de correlación alto con el oxígeno disuelto ($r = -0.82$) y con la tasa de saturación de oxígeno ($r = -0.81$), y con un coeficiente menor para el pH ($r = -0.46$) (Fig. 3).

Estudio batimétrico de la hepatotoxina microcistina-LR disuelta

Los resultados obtenidos del estudio batimétrico sugieren una subdivisión del ciclo del afloramiento de *M. aeruginosa* en varias etapas: recolonización, crecimiento en superficie, sedimentación e hibernación (Fig. 4).

En la figura 4 se observa un incremento de la temperatura del fondo en el mes de agosto del año 2010 de 19.20 °C a 22.60 °C; mientras que, en el mes de noviembre del mismo año, la temperatura desciende en toda la columna de agua en relación con el mes anterior desde los 16 °C a los 10 °C, aproximadamente.

Durante los meses de septiembre y octubre del año 2010 se observa que la abundancia de *M. aeruginosa* aumenta a medida que disminuye la profundidad, alcanzando su máximo en septiembre en la muestra tomada en superficie, con un total de 147 950 cél./ml. En el mes de octubre la abundancia más elevada se obtuvo también en la muestra de superficie, con 23 467 cél./ml. Por el contrario, durante los tres meses siguientes del estudio (noviembre y diciembre del año 2010 y enero del año 2011), el número de células aumenta a medida que se incrementa la profundidad pero sin alcanzar nunca valores tan altos.

La presencia de la microcistina-LR disuelta se detectó durante los meses de abril, mayo, junio y julio del año 2010 y en la muestra recolectada a mayor profundidad de septiembre y en superficie en el mes de octubre. Asimismo, los valores más elevados de toxicidad se han detectado en las muestras recogidas en profundidad. El valor más alto se obtuvo de la muestra tomada en el fondo en el mes de junio del año 2010, siendo la concentración en este caso de 1.40 µg/l de microcistina-LR disuelta.

DISCUSIÓN

El embalse de As Forcadas viene sufriendo un proceso de eutrofización que se ha agudizado en los últimos años. Con los datos del año 1988, proporcionados por Álvarez-Cobelas *et al.* (1991), calculamos que el embalse presentaba un TSI de 40 unidades que lo situaba en el rango más bajo de la mesotrofia, mientras que en la actualidad, con nuestros datos, hemos calculado un valor de 57.39, que lo sitúa en el rango más bajo de la eutrofia. La eutrofización, especialmente por fósforo, conduce a cambios significativos en la composición de las especies del fitoplancton, pueden derivar en una clara dominancia de las cianobacterias y, como consecuencia, dar lugar a la aparición de afloramientos con el consiguiente riesgo de toxicidad. Aunque también se han dado casos de afloramientos altamente toxigénicos en aguas de carácter oligotrófico (Roset *et al.*, 2001). Además, la forma y la relación de la mezcla de nutrientes que se encuentra en la masa de agua dulce tiene un mayor impacto en la síntesis de cianotoxinas que simplemente la cantidad total de nutrientes (Kuniyoshi *et al.*, 2013).

Las diatomeas son el grupo más abundante de la comunidad fitoplanctónica durante la mayor parte del estudio. Según Duarte *et al.* (1992) los lagos dominados por este grupo fitoplanctónico tendrían características mesotróficas, mientras que los dominados por cianobacterias presentarían características eutróficas e hipereutróficas. Este tipo de asociaciones se han utilizado tradicionalmente. Sin embargo, si se considera que los organismos que coexisten en la misma comuni-

dad planctónica tienen requerimientos ambientales similares, un enfoque taxonómico no sería el más adecuado para reflejar la similitud ecológica en el fitoplancton (Kurk *et al.*, 2010). Según Reynolds *et al.* (2002) los grupos funcionales reflejan una progresión estacional diferente en un lago templado mesotrófico respecto a un lago eutrófico, en este último la progresión ecológica sería: C (*Asterionella formosa*, *Aulaucoseira ambigua* y *Stephanodiscus rotula*) – G (*Eudorina* y *Volvox*) – M (*Microcystis* y *Sphaerocavum*) – P (*Fragilaria crotonensis*, *Aulaucoseira granulata*, *Closterium aciculare* y *Staurastrum pingue*). Aunque la clasificación de Reynolds *et al.* (2002) es más precisa, sin embargo se ha argumentado su difícil aplicación práctica, ya que los criterios utilizados para la asociación de especies a los grupos funcionales son ambiguos y difíciles de obtener o desconocidos en muchos casos (Kurk *et al.*, 2010).

La especie *M. aeruginosa* ha estado presente en el embalse con valores máximos de abun-

dancia de 147 950 cél./ml y 23 467 cél./ml durante los meses de septiembre y octubre del año 2010 respectivamente. Estos valores de abundancia, con concentraciones mayores que 20 000 células por mililitro, confirman la existencia de un afloramiento para ese taxón (Cobo, 2007).

La abundancia de *M. aeruginosa* ha presentado una correlación positiva significativa ($p = 0.334$) con el pH, que puede ser utilizado como una medida indirecta de la fotosíntesis.

Aunque se cree que la presencia de contenidos relativamente altos de fósforo disuelto, una relación en masa N:P menor que 25, una concentración de oxígeno elevada y la presencia de determinados elementos traza favorecen el crecimiento de *M. aeruginosa*, no es posible predecir sus afloramientos por la presencia de estos factores por separado o en combinación (Kolmakov, 2006).

En nuestros resultados se observa una correlación positiva significativa de la abundancia de *M. aeruginosa* con el oxígeno disuelto ($p = 0.374$),

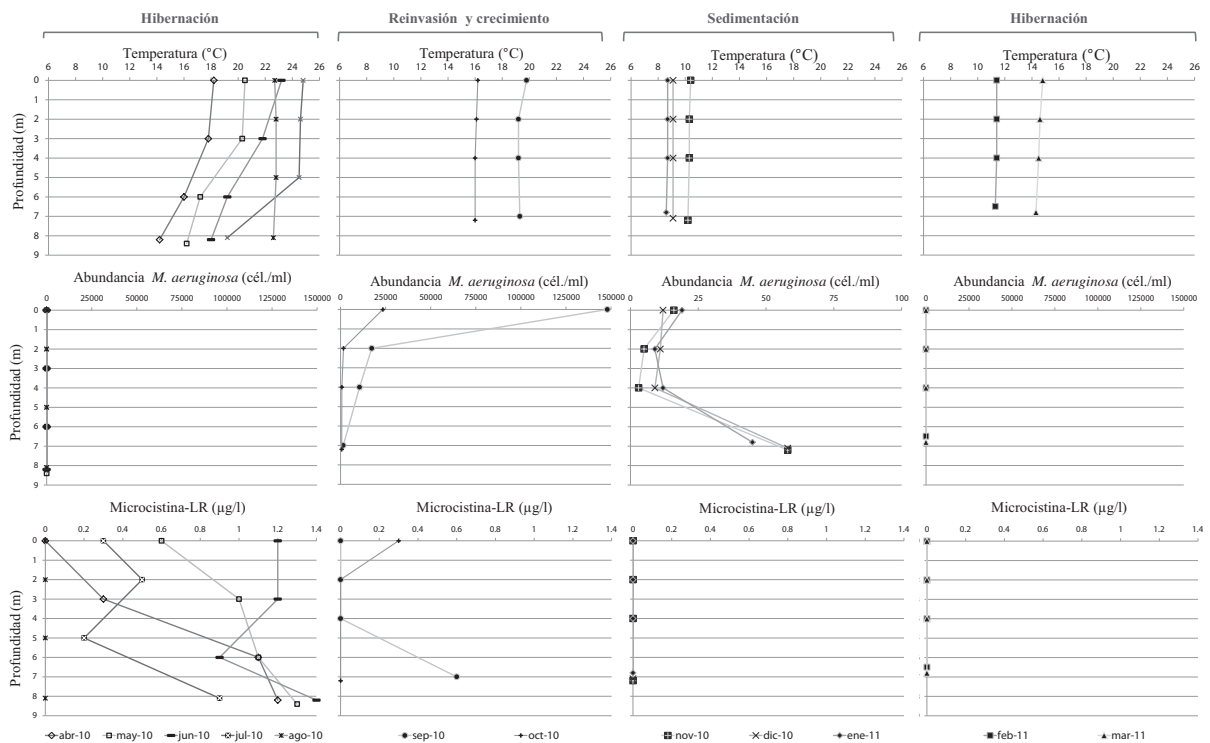


Figura 4. Distribución batimétrica de los parámetros temperatura, abundancia de la especie *Microcystis aeruginosa* y concentración de la hepatotoxina microcistina-LR disuelta. *Bathymetric distribution of temperature, abundance of Microcystis aeruginosa and concentration of the dissolved hepatotoxin microcystin-LR.*

lo que apoyaría lo dicho por Kolmakov (2006). Mientras que también observamos que la correlación pasa a ser negativa ($p = -0.376$) si se relaciona la concentración de oxígeno con la microcistina-LR disuelta, lo que indica que descensos en la concentración de oxígeno y por tanto, la anoxia, pueden estar relacionados con la muerte celular y la consecuente liberación de cianotoxinas al medio.

En aguas dulces, la relación NT:PT tiene un impacto sobre la composición de especies de algas (Smith, 1983). A este respecto, en nuestros resultados no se observa una correlación significativa del fósforo disuelto ni con la abundancia de *M. aeruginosa* ni con la concentración de la toxina MC-LR. La ausencia de correlación entre el fósforo disuelto y la abundancia de *M. aeruginosa* contradice a algunos autores (p. e. Figueiredo *et al.*, 2006; Kolmakov, 2006) que afirman que una baja *ratio* NT:PT favorece el crecimiento de las cianobacterias y, por tanto, valores elevados de fósforo disuelto favorecerían el desarrollo de afloramientos. La ausencia de correlación entre el fósforo disuelto y la MC-LR tampoco coincide con lo demostrado por Oh *et al.* (2000), que las células de *M. aeruginosa* con deficiencia en fósforo presentan un mayor contenido en microcistinas por peso seco, aunque no se ha medido el fósforo intracelular en este estudio. No obstante, nuestros resultados apoyan la opinión de Carrasco (2007), quien afirma que hay evidencias abrumadoras de que la *ratio* NT:PT *per se* no influye sobre la dominancia de cianobacterias, y lo observado por Lee *et al.* (2000) y Downing *et al.* (2005) en sus ensayos, en los que la limitación de fósforo disuelto no ha afectado a la tasa de crecimiento de *M. aeruginosa* y en los que las concentraciones absolutas o la adición de fósforo o nitratos al medio no han afectado a la síntesis de microcistinas. También Gobler *et al.* (2007) concluyen que el nitrógeno y el fósforo no afectan a las tasas de crecimiento de fitoplancton o a los niveles de toxinas en el lago. Finalmente, en el estudio de Kuniyoshi *et al.* (2013) se ha demostrado que en condiciones de deficiencia de fosfatos (N:P de 40:1) el crecimiento de *M. aeruginosa* PCC7806 no se vio afectado, en comparación con el control y con muestras con exceso de fos-

fatos donde la tasa de crecimiento mostraba un ligero incremento. Sin embargo, en lo que se refiere a la concentración de la toxina, Kuniyoshi *et al.* (2013) han observado que en condiciones bajas de fosfato el gen *mcyD* está regulado positivamente y que la microcistina-LR intracelular aumenta; mientras que en condiciones de exceso de fósforo se muestra la misma tasa de microcistinas que en los controles. Esto supondría que la máxima producción de microcistinas puede estar relacionada con el estrés fisiológico (Kurmayer, 2011).

En cuanto a los compuestos nitrogenados, en nuestras observaciones existe una correlación significativa negativa de los nutrientes amonio, nitritos y nitrógeno total disuelto con la abundancia de *M. aeruginosa* de $p = -0.359$, -0.459 y -0.394 respectivamente. Las concentraciones de estos nutrientes son elevadas durante los meses previos a la aparición de *M. aeruginosa* mientras que durante el crecimiento y desarrollo de la cianobacteria disminuyen a causa del metabolismo del nitrógeno de *M. aeruginosa*. Las cianobacterias pueden utilizar distintas formas de nitrógeno, y se considera que es el amoniaco la forma más fácilmente incorporable (Cobo *et al.*, 2012).

El análisis de componentes principales (PCA) indica una asociación importante de los nutrientes al primer eje (Fig. 3), que es el que mejor explica la varianza total del sistema de As Forcadas. En este caso el nutriente que presenta la asociación más fuerte es el amonio ($r = 0.82$), lo que apoya que la especie *M. aeruginosa* puede desarrollarse especialmente en aguas dónde hay amonio (Cobo *et al.*, 2012).

Otros parámetros que presentan correlación significativa con la microcistina-LR disuelta, en este caso negativa, son la abundancia de *M. aeruginosa* ($p = -0.409$) y la ficocianina ($p = -0.346$), que ratifican que lo que se está analizando es la fracción disuelta de la cianotoxina, liberada por las células al morir. El último parámetro que presenta correlación significativa con la concentración de la toxina es la temperatura ($p = 0.48$). También la abundancia de *M. aeruginosa* presenta correlación significativa con la temperatura, lo que ratifica lo que otros estudios han demostrado: que la temperatura es

un factor importante que afecta al crecimiento y a la acumulación de metabolitos, como la microcistina-LR, en cianobacterias (Watanabe & Oishi, 1985; Sivonen, 1990; Rapala *et al.*, 1997).

Nuestros resultados sugieren una subdivisión del ciclo del afloramiento de *M. aeruginosa* en varias etapas: la recolonización, el crecimiento en superficie, la sedimentación y la hibernación (Fig. 4), semejantes a lo descrito por Reynolds *et al.* (1981) e Ihle *et al.* (2005) para embalses de regiones templadas y, por tanto, refuerzan todas las observaciones anteriores. En este ciclo anual se considera que, durante la hibernación en el sedimento, las células de *M. aeruginosa* que sobreviven en el interior de la colonia conservan las condiciones fisiológicas (actividad enzimática, división celular y toxinas intracelulares) y ultraestructurales (vesículas de gas) necesarias para la recolonización o movilización de colonias viables hacia la columna de agua (Latour *et al.* 2007). Una vez que el inóculo de células se encuentra en la columna de agua las colonias crecen, y es en ese momento cuando *M. aeruginosa* puede desarrollar proliferaciones masivas, como ocurre en el mes de septiembre del estudio. Sin embargo, a temperaturas del agua inferiores a 15 °C, las células inician la senescencia y se produce una disminución drástica de la población planctónica (Ihle *et al.*, 2005), iniciando algunas de ellas su sedimentación y la hibernación en las capas superficiales del sedimento (Reynolds *et al.*, 1981; Tsujimura *et al.*, 2000; Verspagen *et al.*, 2004 y 2005; Ihle *et al.*, 2005; Latour *et al.*, 2007; Wörmer *et al.*, 2011; Cirés *et al.*, 2013a y 2013b).

No sólo se intuye esta subdivisión del ciclo anual sino que, al igual que lo descrito por Ihle *et al.* (2005) y Cao *et al.* (2008), se observa que la temperatura es uno de los factores desencadenantes tanto de la recolonización y crecimiento de las células como de su sedimentación. El efecto se observa principalmente en el incremento de la temperatura del fondo en el mes de agosto, lo que genera las condiciones para la etapa de recolonización. Esto ratifica lo observado por Caceres & Reynolds (1984), Brunberg & Blomqvist (2003) y Vespergen *et al.* (2005) según los cuales la temperatura es especialmente importante durante la recolonización en la primavera y es

el aumento de este parámetro, entre otros factores, lo que puede desencadenar la nueva invasión de colonias de *M. aeruginosa*. De nuestros datos también se extrae que el efecto de este parámetro es importante en la sedimentación, que ocurre después de que la temperatura descienda en toda la columna de agua en el mes de noviembre. Este descenso propicia la muerte de algunas células de *M. aeruginosa* que hasta el momento se hallaban en la columna de agua y el inicio de la sedimentación de otras. Asimismo, las altas temperaturas observadas en los meses de julio y agosto pueden contribuir al aumento de la estabilidad de la columna de agua, con lo cual se reduciría la mezcla vertical turbulenta y, con esto, el saldo competitivo estaría a favor del dinamismo de las cianobacterias (Caceres & Reynolds, 1984; Jöhn *et al.*, 2008).

En cuanto a la microcistina-LR disuelta, se detecta una liberación durante los meses de abril, mayo, junio y julio del año 2010, previa movilización de *M. aeruginosa* y también durante el proceso de recolonización, lo que confirma la pérdida de células durante este proceso y podría indicar la intervención de estas toxinas en la supervivencia de las colonias tal y como sugirieron Tsujimura *et al.* (2000). También Ihle *et al.* (2005) especularon con la idea de que la fuerte liberación de microcistina durante la primavera siguiente a la sedimentación estaría relacionada con procesos de muerte programada y actuaría como señal para el siguiente periodo de recolonización. Asimismo, Kardinaal & Visser (2005) afirman que existen picos de toxicidad que coinciden con las primeras etapas del desarrollo del afloramiento de *M. aeruginosa* pero que las causas aún no están determinadas.

Por su parte, Sigee *et al.* (2007) exponen que la senescencia y muerte de la población planctónica precede a la fase principal de sedimentación, lo que se puede relacionar con el descenso del número de células y la detección de microcistina-LR disuelta en superficie en el mes de octubre, coincidiendo el mes siguiente con el inicio de la etapa de sedimentación.

Finalmente, los valores más elevados de toxicidad se han detectado en las muestras recogidas en profundidad, alcanzando en algún caso valores

por encima de 1 µg/l, que es el valor provisional de referencia marcado por la OMS en 1977 como máximo aceptable para el consumo oral diario de microcistina-LR. Estas concentraciones máximas de MC-LR son detectadas durante los meses de abril a julio del año 2010 sin que se observe la presencia de *M. aeruginosa* en la columna de agua. Si se tiene en cuenta que la vida media de las microcistinas en el medio natural es de 10 a 30 días (Sedmak, 2012), nuestros datos podrían indicar que las microcistinas provienen de un reservorio de células que se encuentran en el sedimento. Esta suposición estaría en concordancia con lo demostrado por Latour *et al.* (2007), quienes concluyeron que las microcistinas, de las células localizadas en la superficie y a profundidades de 25 a 35 centímetros del sedimento, se encuentran en concentraciones superiores a los valores planctónicos. Algunos autores (Latour *et al.*, 2007 e Ihle *et al.*, 2005) creen que las microcistinas pueden desempeñar un papel en el mantenimiento de las colonias durante la fase bentónica.

Este tipo de estudios, versados en la comprensión del ciclo vital de las cianobacterias y de los factores que sobre él pueden influir, pueden contribuir a la prevención del afloramiento y a su gestión, diseñando estrategias que retrasen o reduzcan los afloramientos de las especies potencialmente tóxicas, de manera que se reduzcan sus repercusiones sobre la salud humana y animal (p. e. remoción de sedimentos y métodos biológicos como la descomposición aerobia de materia vegetal).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en los laboratorios de la Estación de Hidrobiología "Encoro do Con" de la USC en Vilagarcía de Arousa. Agradecemos a los revisores de este artículo por sus comentarios y sugerencias sobre la primera versión de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

AGHA FRÍAS, R. 2013. Chemotypical Subpopulations in Planktonic Cyanobacteria. Ecology and

Application in Advanced Monitoring Tools. Ph.D. Thesis. Universidad Autónoma de Madrid.

AIZAKI, M., T. IWAKUMA & N. TAKAMURA. 1981. Application of Modified Carlson's Trophic Index to Japanese Lakes and Relationships to Other Parameters Related to Trophic State. *Research Report from the National Institute for Environmental Studies*, 23: 13–31.

ÁLVAREZ COBELAS, M., P. MUÑOZ RUIZ & A. RUBIO OLMO. 1991. *La eutrofización de las aguas continentales españolas*. Henkel Ibérica, S.A.

ANAGNOSTIDIS, K. & J. KOMÁREK. 1988. Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes 3-Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 80 (1-4): 327–472.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1998. *Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater, 20th Edition*. APHA and Water Environment Federation, Washington DC.

AUGAS DE GALICIA. 2010. Anejo I: Designación de masas de agua muy modificadas. En: *Plan Hidrológico-Demarcación Hidrográfica de Galicia-Costa*. Xunta de Galicia. Consellería de Medio Ambiente, Territorio e Infraestructuras (ed.): 53–54.

BLUMWALD, E. & E. TEL-OR. 1982. Osmoregulation and Cell composition in Salt-Adaptation of *Nostoc muscorum*. *Archives of Microbiology*, 132: 168–172.

BRUNBERG, A. K. & P. BLOMQUIST. 2003. Recruitment of *Microcystis* (Cyanophyceae) from Lake Sediments: The Importance of Littoral Inocula. *Journal of Phycology*, 39: 58–63.

CACERES, O. & C. S. REYNOLDS. 1984. Some Effects of Artificially Enhanced Anoxia on the Growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz emend Elenkin, With Special Reference to the Initiation of its Annual Growth Cycle in Lakes. *Archiv für Hydrobiologie*, 99: 379–397.

CAMEÁN FERNÁNDEZ, A. M., I. MORENO NAVARRO, A. JOS GALLEGOS, G. REPETTO KUHN, S. PICHARDO SÁNCHEZ & A. I. PRIETO ORTEGA. 2005. Cianobacterias y cianotoxinas: Necesidad de su control en el agua de consumo humano. *Revista de Salud ambiental*, 5(2): 137–141.

CAO, H. S., Y. TAO, F. X. KONG & Z. YANG. 2008. Relationship Between Temperature and Cyanobacterial Recruitment from Sediments in Laboratory

- and Field Studies. *Journal of Freshwater Ecology*, 23(3): 405–412.
- CARLSON, R. E. 1977. A Trophic State Index for Lakes. *Limnology and Oceanography*, 22(2): 361–369.
- CARRASCO, D. 2007. *Cianobacterias planctónicas y cianotoxinas en embalses españoles*. Ph.D. Thesis. Universidad Autónoma de Madrid.
- CARRASCO, D., E. MORENO, D. SANCHIS, L. WÖRMER, T. PANIAGUA, A. DEL CUETO & A. QUESADA. 2006. Cyanobacterial Abundance and Microcystin Occurrence in Mediterranean Water Reservoirs in Central Spain: Microcystins in the Madrid Area. *European Journal of Phycology*, 41: 281–291.
- CIRÉS, S., L. WÖRMER, R. AGHA & A. QUESADA. 2013a. Overwintering Populations of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Microcystis* as Potential Inocula for Summer Blooms. *Journal of Plankton Research*, 35(6): 1254–1266.
- CIRÉS, S., L. WÖRMER, D. CARRASCO & A. QUESADA. 2013b. Sedimentation Patterns of Toxin-Producing *Microcystis* Morphospecies in Freshwater Reservoirs. *Toxins*, 5: 939–957.
- COBO, F. 2007. Características das floraciones de Cianobacterias tóxicas nas augas continentais. In: *Curso de Verán 2007. Aspectos Biosanitarios da Xestión da Auga Doce*. F. Cobo (ed.): 3–14. Vilagarcía de Arousa.
- COBO, F., L. LAGO, S. BARCA, R. VIEIRALANERO & M. J. SERVIA. 2012. *Cianobacterias y medioambiente. Aspectos ecotoxicológicos de sus floraciones en aguas continentales*. AGAIA (Asociación Galega de Investigadores da Auga).
- DAVIS, T. W., D. L. BERRY, G. L. BOYER & C. J. GOBLER. 2009. The Effects of Temperature and Nutrients on the Growth and Dynamics of Toxic and Non-Toxic Strains of *Microcystis* During Cyanobacteria Blooms. *Harmful Algae*, 8: 715–725.
- DE HOYOS, C., A. NEGRO & J. J. ALDASORO. 2004. Cyanobacteria Distribution and Abundance in the Spanish Water Reservoirs During Thermal Stratification. *Limnética*, 23 (1–2): 119–132.
- DOUMA, M., Y. OUAHID, F. F. DEL CAMPO, M. LOUDIKI, K. H. MOUHRI & B. OUDRA. 2010. Identification and Quantification of Cyanobacterial Toxins (microcystins) in Two Moroccan Drinking-Water Reservoirs (Mansour Eddahbi Almassira). *Environmental Monitoring and Assessment*, 160: 439–450.
- DOWNING, T. G., C.S. SEMBER, M. N. GEHRINGER & W. LEUKES. 2005. Medium N: P Ratios and Specific Growth Rate Comodulate Microcystin and Protein Content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *M. aeruginosa* UV027. *Microbial Ecology*, 49: 468–473.
- DUARTE, C. M., S. AGUSTÍ & D. E. CANFIELD. 1992. Patterns in Phytoplankton Community Structure in Florida Lakes. *Limnology and Oceanography*, 37(1): 155–161.
- FIGUEIREDO, D. R., A. S. S. P. REBOLEIRA, S. C. ANTUNES, N. ABRANTES, U. AZEITEIRO, F. GONÇALVES & M. J. PEREIRA. 2006. The Effect of Environmental Parameters and Cyanobacterial Blooms on Phytoplankton Dynamics of a Portuguese Temperate Lake. *Hydrobiologia*, 568: 145–157.
- GINN, H. P., L. A. PEARSON & B. A. NEILAN. 2010. NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is Autoregulatory and Binds to the Microcystin Promoter. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 4362–4368.
- GOBLER, C. J., T. W. DAVIS, K. J. COYNE & G. L. BOYER. 2007. Interactive Influences of Nutrient Loading, Zooplankton Grazing, and Microcystin Synthetase Gene Expression on Cyanobacterial Bloom Dynamics in a Eutrophic New York Lake. *Harmful Algae*, 6: 119–133.
- GÓMEZ, N., J. C. DONATO, A. GIORGI, H. GUASCH, P. MATEO & S. SABATER. 2009. Capítulo 12. La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. En: *Conceptos y técnicas de ecología fluvial*. A. Elosegí & S. Sabater (eds.): 219–242. Fundación BBVA.
- GUIRY, M. D. & G. M. GUIRY. 2013. AlgaeBase. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; 13 de septiembre de 2013.
- HARADA, K. 1996. Chemistry and Detection of Microcystin. En: *Toxic Microcystis*. M. F. Watanabe, K. Harada, W. W. Carmichael & H. Fujiki (eds.): 103–148. CRC Press, Boca Ratón.
- IHLE, T., S. JÄHNICHEN & J. BENNDORF. 2005. Wax and Wane of *Microcystis* (Cyanophyceae) and Microcystins in Lake Sediments: A Case Study in Quitzdorf Reservoir (Germany). *Journal of Phycology*, 41: 479–488.
- JÄHNICHEN, S., T. PETZOLDT & J. BENNDORF. 2001. Evidence for Control of Microcystin Dynamics in Bautzen Reservoir (Germany) by Cyanobacterial Population Growth Rates and Dissolved

- Inorganic Carbon. *Archiv Für Hydrobiologie*, 150: 177–196.
- JÖHN, K. D., J. HUISMAN, J. SHARPLES, B. SOMMEIJER, P. M. VISSER & J. M. STROOM. 2008. Summer Heatwaves Promote Blooms of Harmful Cyanobacteria. *Global Change Biology*, 14: 495–512.
- KARDINAAL, W. E. A. & P. M. VISSER. 2005. Dynamics of Cyanobacterial Toxins: Sources of Variability in Microcystin Concentrations. En: *Harmful Cyanobacteria*. J. Huisman, H. C. P. Matthijs & P. Visser (eds.): 41–63. Springer: Berlín.
- KOLMAKOV, V. 2006. Methods for Prevention of Mass Development of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz emend. Elenk. in Aquatic Systems. *Microbiology*, 75(2): 115–118.
- KOMÁREK, J. & K. ANAGNOSTIDIS. 1999. Cyanoprocaryota: Chroococcales. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Band 19, 1 Teil. Gustav Fischer. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.
- KRAMMER, K. & H. LANGE-BERTALOT. 2000. Bacillariophyceae: English and French Translation of the Keys. Volume 5. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz & G. M. Lokhorst (eds.), Band 2/5. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- KUNIYOSHI, T. M., E. SEVILLA, M. T. BES, M. F. FILLAT & M. L. PELEATO. 2013. Phosphate Deficiency (N/P 40:1) Induces *mcyD* Transcription and Microcystin Synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Plant Physiology and Biochemistry*, 65: 120–124.
- KURK, C., V. L. M. HUSZAT, E. T. H. M. PEETERS, S. BONILLA, L. COSTA, M. LÜRLING, C. S. REYNOLDS & M. SCHEFFER. 2010. A Morphological Classification Capturing Functional Variation in Phytoplankton. *Freshwater Biology*, 55: 614–627.
- KURMAYER, R. 2011. The Toxin Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain 152 Produces Highest Amounts of Microcystin and Nostophycin under Stress Conditions. *Journal of Phycology*, 47: 200–207.
- LATOURE, D., M. J. SALENCON, J. L. REYSS & H. GIRAUDET. 2007. Sedimentary Imprint of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) Blooms in Grangent Reservoir (Loire, France). *Journal of Phycology*, 43: 417–425.
- LEE, S. J., M. H. JANG, H. S. KIM, B. D. YOON & H. M. OH. 2000. Variation of Microcystin Content of *Microcystis aeruginosa* Relative to Medium N: P ratio and Growth Stage. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 323–329.
- MARTIN-LUNA, B., J. A. HERNANDEZ, M. T. BES, M. F. FILLAT & M. L. PELEATO. 2006. Identification of a Ferric Uptake Regulator from *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *FEMS Microbiology Letters*, 254: 63–70.
- METCALF, J. S. & G. A. CODD. 2012. Chapter 24. Cyanotoxins. En: *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. B. A. Whitton (ed.): 651–675. Springer Science + Business Media B.V.
- METEOGALICIA. 2012a. Anuario Climatológico 2010. Consellería de Medio Ambiente, Territorio e Infraestruturas-Xunta de Galicia.
- METEOGALICIA. 2012b. Anuario Climatológico 2011. Consellería de Medio Ambiente, Territorio e Infraestruturas-Xunta de Galicia.
- OH, H. M., S. J. LEE, M. H. JANG & B. D. YOON. 2000. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 176–179.
- ORR, P. T. & G. J. JONES. 1998. Relationship Between Microcystin Production and Cell Division Rates in Nitrogen-Limited *Microcystis aeruginosa* Cultures. *Limnology and Oceanography*, 43(7): 1604–1614.
- RAPALA, J., K. SIVONEN, C. LYRA & S. I. NIE-MELA. 1997. Variation of Microcystins, Cyanobacterial Hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a Function of Growth Stimuli. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2206–2212.
- REYNOLDS, C. S., G. H. M. JAWORSKI, H. A. CMIECH & G. F. LEEDALE. 1981. On the Annual Cycle of the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa* Kütz emend Elenkin. *Proceedings B Royal Society*, 293(1068): 419–477.
- REYNOLDS, C., V. HUSZAR, C. KURK, L. NASELLI-FLORES & S. MELOS. 2002. Towards a Functional Classification of the Freshwater Phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 24(5): 417–428.
- ROHRLACK, T. & P. HYENSTRAND. 2007. Fate of Intracellular Microcystins in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*, 46: 277–283.
- ROSET, J., S. AGUAYO & M. J. MUÑOZ. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Toxicología*, 18: 65–71.

- ROTT, E. 1981. Some Results from Phytoplankton Counting Intercalibrations. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie-Swiss Journal of Hydrology*, 43: 34–62.
- SEDMAK, B. (2012): *Cyanobacteria and Their toxins. What Are They, Where Can We Find Them, Why Are They Able to Prevail and How do They Behave?* National Institute of Biology, Ljubliana.
- SIGEE, D. C., A. SELWYN, P. GALLOIS & A. P. DEAN. 2007. Patterns of Cell Death in Freshwater Colonial Cyanobacteria During the Late Summer Bloom. *Phycologia*, 46: 284–292.
- SIVONEN, K. 1990. Effects of Light, Temperature, Nitrate Orthophosphate, and Bacteria on Growth and Hepatotoxin Production by *Oscillatoria agardhii* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2658–2666.
- SMITH, V. H. 1983. Low Nitrogen to Phosphorus Ratios Favors Dominance by Blue-Green Algae in Lake Phytoplankton. *Science*, 221: 669–671.
- TILLET, D., E. DITTMANN, M. ERHARD, H. VON DOHREN, T. BORNER & B. A. NEILAN. 2000. Structural Organization of Microcystin Biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: An Integrated Peptide-Polyketide Synthetase System. *Chemistry & Biology*, 7: 753–764.
- TSUJIMURA, S., H. TSUKADA, H. NAKAHARA, T. NAKAJIMA, & M. NISHINO. 2000. Seasonal Variations of *Microcystis* Populations in Sediments of Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia*, 434: 183–192.
- UNE-EN 15204:2007 Calidad del agua. Guía para el recuento de fitoplancton por microscopía invertida (técnica de Utermöhl).
- UNE-EN 25667-2:1995. Calidad del agua. Muestreo. Parte 2: Guía para las técnicas de muestreo. (ISO 5667-2:1991).
- UNE-EN ISO 5667-3:2004. Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y manipulación de las muestras de agua. (ISO 5667-3:2003).
- UTKILEN, H. & N. GJØLME. 1995. Iron-Stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 797–800.
- VASCONCELOS, V. M. 2001. Freshwater Cyanobacteria and Their Toxins in Portugal. En: *Cyanotoxins: Occurrence, Causes and Consequences*. I. Chorus (ed.): 62–67. Nueva York.
- VASCONCELOS, V. M., K. SIVONEN, W. R. EVANS, W. W. CARMICHAEL & M. NAMIKOSHI. 1995. Isolation and Characterization of Microcystins (Heptapeptide Hepatotoxins) from Portuguese Strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz emend Elekin. *Archiv für Hydrobiologie*, 134: 295–305.
- VASCONCELOS, V. M., K. SIVONEN, W. R. EVANS, W. W. CARMICHAEL & M. NAMIKOSHI. 1996. Microcystin (Heptapeptide Hepatotoxins) Diversity in Cyanobacterial Blooms Collected in Portuguese Fresh Waters. *Water Research*, 30: 2377–2384.
- VERGARA LARRRAYAD, Y., A. MOYA JARABA, M. L. PELEATO SÁNCHEZ, E. SEVILLA MIGUEL & N. LÓPEZ GOMOLLÓN. 2005. *Nuevos riesgos para el agua potable: Microcistina. Mejora de la calidad del agua de consumo por eliminación de toxinas*. Consejo económico y social de Aragón.
- VERSPAGEN, J. M. H., E. O. F. M. SNELDER, P. M. VISSER, J. HUISSMAN, L. R. MUR & B. W. IBELINGS. 2004. Recruitment of Benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the Water Column: Internal Buoyancy or Resuspension? *Journal of Phycology*, 40: 260–270.
- VERSPAGEN, J. M. H., E. O. F. M. SNELDER, P. M. VISSER, K. D. JÖHNK, B. W. IBELINGS, L. R. MUR & J. HUISMAN. 2005. Benthic–Pelagic Coupling in the Population Dynamics of the Harmful Cyanobacterium *Microcystis*. *Freshwater Biology*, 50: 854–867.
- VÉZIE, C., J. RAPALA, J. VAITOMAA, J. SEITSONEN & K. SIVONEN. 2002. Effect of Nitrogen and Phosphorus on Growth of Toxic and Non Toxic *Microcystis* Strains and on Intracellular Microcystin Concentrations. *Microbial Ecology*, 43: 443–454.
- VICENTE, E., C. DE HOYOS, P. SÁNCHEZ & J. CAMBRA. 2005. Protocolos de muestreo y análisis para el fitoplancton. En: *Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la directiva marco de agua*. Ministerio de Medioambiente-Confederación Hidrográfica del Ebro (eds.): 41.
- VISSER, P. M., B. W. IBELINGS & L. R. MUUR. 1995. Autumnal Sedimentation of *Microcystis* spp. as a Result of an Increase in Carbohydrate Ballast at Reduced Temperature. *Journal of Plankton Research*, 17: 919–933.
- WATANABE, M. F. & S. OISHI. 1985. Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1342–1344.

- WIEDNER, C., P. M. VISSER, J. FASTNER, J. S. METCALF, G. A. CODD & L. R. MUR. 2003. Effects of Light on the Microcystin Content of *Microcystis* Strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1475–1481.
- WIEDNER, C., J. RUCKER, R. BRUGGEMANN & B. NIXDORF. 2007. Climate Change Affects Timing and Size of Populations of an Invasive Cyanobacterium in Temperate Regions. *Oecologia*, 152: 473–484.
- WÖRMER, L., S. CIRÉS & A. QUESADA. 2011. Importance of Natural Sedimentation in the Fate of Microcystins. *Chemosphere*. 82: 1141–1146.
- ZILLIGES, Y., J.-C. KEHR, S. MEISSNER, K. ISHIDA, S. MIKKAT, M. HAGEMANN, A. KAPLAN, T. BÖRNER & E. DITTMANN. 2011. The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of *Microcystis* under Oxidative Stress Conditions. *PLoS ONE*, 6(3): e17615.