



Canal de
Isabel II

CUADERNOS DE I+D+i

9

Proyecto de investigación
para la definición y evaluación
de la aplicabilidad de un bioensayo
para la determinación de la toxicidad del
agua utilizando embriones de pez cebra



© Canal de Isabel II - 2010

Autores:

J. Iñaki Urrutia Gutiérrez
Joaquín Guinea López
Juan F. Rodríguez Plaza
Paloma Acebo País

Dirección del estudio:

J. Iñaki Urrutia Gutiérrez
Rafael Heredero Rodríguez

Edición coordinada por:

Subdirección de Comunicación y RR.PP.

Expresamos nuestro agradecimiento por su colaboración y especial aportación a Dulce M^a González Ramos y Alma M^a Jiménez Rodríguez de la subdirección de Calidad de las Aguas y a Jaime Flores Cabeza y Silvia Ortega Les, de la subdirección de I+D+i de Canal de Isabel II.

Este proyecto ha sido financiado parcialmente con el Plan de ayudas para el fomento de la innovación tecnológica en el sector de la biotecnología a través de la Consejería de Economía e Innovación Tecnológica de la Comunidad de Madrid y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

(Orden 84/2006 de 12 de enero. Exp. 46/2000).

ISBN: 978-84-936445-8-1

Depósito legal: M-24331-2010



CUADERNOS DE I+D+i

9

Definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones de pez cebra



EXCLUSIÓN DE RESPONSABILIDAD



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

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

PRESENTACIÓN

Los cuadernos de I+D+i de Canal de Isabel II forman parte de la estrategia de gestión del conocimiento de la Empresa y del desarrollo del Plan de investigación, desarrollo e innovación.

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

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

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

Nº Colección	Cuadernos de I+D+i publicados
1	Transferencias de derechos de agua entre demandas urbanas y agrarias. El caso de la Comunidad de Madrid
2	Identificación de rachas y tendencias hidrometeorológicas en el ámbito del sistema de Canal de Isabel II
3	Participación de Canal de Isabel II en el Proyecto Internacional de Eficiencia en la Gestión (IDMF)
4	Microcomponentes y factores explicativos del consumo doméstico de agua en la Comunidad de Madrid
5	El agua virtual y la huella hidrológica en la Comunidad de Madrid
6	Estudio de potenciales de ahorro de agua en usos residenciales de interior
7	Investigación sobre potenciales de eficiencia con el empleo de lavavajillas
8	Precisión de la medida de los consumos individuales de agua en la Comunidad de Madrid

FICHA TÉCNICA

Título del proyecto	Definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>).
Línea de investigación	Agua de consumo y salud.
Unidades del Canal de Isabel II implicadas	Subdirección de Calidad de las Aguas. Subdirección de I+D+i.
Participación externa	ZF Biolabs.
Objeto y justificación del proyecto	La subdirección de Calidad de Aguas de Canal de Isabel II, en cumplimiento del R.D. 140/2003 que regula la calidad del agua de abastecimiento, determina los parámetros físicos, químicos, biológicos y radiactivos del agua que gestiona. Sin embargo, la reglamentación vigente no recoge los aspectos toxicológicos. La detección temprana de fenómenos tóxicos, especialmente cianofíceas y cianotoxinas y su control constituye un objetivo de calidad de abastecedores como Canal de Isabel II. De ahí emana el principal objetivo de este proyecto que es disponer de un ensayo rápido y eficaz, aunando máxima fiabilidad con mínimo coste en tiempo y recursos, para la detección temprana de la toxicidad en el agua.
Contribución al estado del arte	La investigación para la definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>) constituye una nueva línea experimental, con ventaja frente a los ensayos con animales de laboratorio, por su sencillez, transparencia y similitud genética a la especie humana. Se trata de detectar anomalías en las primeras divisiones celulares del embrión del pez cebra, producidas por diversas sustancias tóxicas. En esta fase del desarrollo (blástula, 0.75-3.5 hpf) la sensibilidad de los embriones es máxima. Se han puesto a punto protocolos FTZ (fast toxicity zebra fish) capaces de detectar la presencia de toxicidad en el agua, de forma rápida, y otros específicos de hepatotoxicidad y neurotoxicidad. Se ha abierto una línea de investigación en la creación de un pez cebra transgénico, sensible a la presencia de hepatotoxinas.
Resumen del desarrollo del proyecto e hitos relevantes	La investigación ha estado dificultada debido a la falta de importantes floraciones algales de cianobacterias tóxicas –microcistinas–. Se prepararon muestras de laboratorio “dopando” las naturales con compuestos tóxicos y peligrosos para la salud humana. Se han analizado 223 muestras de embalses y estaciones potabilizadoras de Canal de Isabel II. El ensayo de toxicidad (FTZ), aplicado a las aguas naturales de Canal de Isabel II, no sigue pautas comparables con la analítica físico-química y biológica del laboratorio. El tratamiento estadístico posterior al análisis refleja un potencial toxicológico para un 75 ó 95 por ciento de probabilidad, siendo el 75 por ciento, indicativo de toxicidad, aunque no definitivo; y denotando, el 95 por ciento, una probabilidad significativa de potencial toxicológico.
Resumen de resultados obtenidos	Se ha desarrollado un test rápido FTZ (fast toxicity zebra fish) capaz de disponer, en 1,5 horas, de información sobre la presencia de toxicidad en el agua. También, se ha desarrollado un test de hepatotoxicidad capaz de evaluar el LC5 y LC50 de la hepatotoxina en 6 días tras la fecundación de embriones de pez cebra. Además, se ha desarrollado un test de neurotoxicidad capaz de evaluar el LC5 y LC50 de la hepatotoxina en 20 horas tras la fecundación embrionaria.
Líneas de investigación abiertas para continuación de los trabajos	Las aplicaciones biotecnológicas (pez cebra recombinante) son una nueva herramienta en el control de la calidad de las aguas de abastecimiento, con amplias posibilidades en la detección de los efectos toxicológicos. Tras la selección del gen cuya expresión se activa en presencia de un compuesto nocivo para las hepatocélulas, éste se recombina con una proteína fosforescente verde, de forma que el embrión irradiaría luz verde fluorescente al crecer en presencia de un compuesto hepatotóxico.

RESUMEN EJECUTIVO

El Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, regula la calidad del agua para el abastecimiento. La subdirección de Calidad de Aguas, siguiendo esta legislación, determina parámetros físicos, químicos, biológicos y radioactivos, pero la reglamentación vigente no recoge aspectos toxicológicos.

Al menos durante los años 2006 y 2007, periodo de desarrollo del presente proyecto, no se han observado incidencias en los embalses o en las estaciones de tratamientos de aguas potables (en adelante ETAP), que incumplan la normativa vigente. Además, 2006 fue un año hidrológicamente seco, lo que, en principio, podría favorecer una depreciación en la calidad de las aguas embalsadas.

Al objeto de contrastar la información de resultados analíticos recogida según el Real Decreto 140/2003, con los bioensayos de toxicidad, se afrontó el programa de investigación denominado *Proyecto de investigación para la definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones de pez cebra*, caracterizado –frente a otros ensayos con animales– por su sencillez, transparencia y similitud genética con la especie humana, en colaboración con la Comunidad de Madrid y el laboratorio de investigación en biotecnología ZF-Biolabs.

En el desarrollo del presente proyecto se ha puesto a punto un test rápido de toxicidad en el agua (FTZ) de forma que, en un corto periodo de tiempo (1,5 horas), se pueda disponer de información sobre la posible toxicidad del agua. El método extractivo de las toxinas mediante sonicación ha resultado efectivo a la hora de obtener soluciones acuosas a partir de muestras de embalses con presencia de algas. Dada la posibilidad de que aparecieran componentes químicos disueltos en el agua, ajenos a los liberados mediante el procedimiento de extracción, se ha resuspendido el extracto directamente en el agua filtrada, y testado de forma conjunta ambos elementos.

Se ha desarrollado y puesto a punto un test de hepatotoxicidad basado en los embriones del pez cebra, de forma que en un tiempo de 6 días tras la fecundación, se puede evaluar el LC5 y LC50 de la hepatotoxina.

Además, también se ha desarrollado y puesto a punto un test de neurotoxicidad, de forma que en un tiempo de 20 horas tras la fecundación se pueda evaluar el LC5 y LC50 de la cianotoxina, en los embriones del pez cebra.

Se han analizado un total de 223 muestras, para realizar los contrastes y bioensayos pertinentes. Durante un buen período de tiempo de las pruebas, la falta de situaciones o tipos de agua que pudieran dar positivos en los test empleados, supuso la preparación de muestras diversas, en algunos casos ajenas a las aguas naturales, dopándolas con compuestos tóxicos y peligrosos para la salud humana según la fichas de seguridad de los productos.

A los resultados de las muestras se les ha aplicado un tratamiento estadístico que refleja significativamente el potencial toxicológico, para un 75 ó un 95 por ciento de probabilidad y, cuando se disponía de muestra para hacer repeticiones, se ha estimado la suma de toxicidad, valor más exacto al disponer de un número de casos, superior. Es por esto que se consideran con toxicidad significativa las muestras que presentan un potencial toxicológico positivo al 95 por ciento, o las que presentan toxicidad en la suma. Cuando el valor es positivo al 75 por ciento en el potencial toxicológico, se consideran indicativo, aunque no definitivo.

Tras aplicar el test FTZ, se han obtenido resultados positivos en 38 casos de los cuales 35 corresponden a un potencial toxicológico positivo (12 han dado resultados positivos, al 95 y 75 por ciento y los 23 restantes sólo al 75 por ciento, valor indicativo pero no definitivo). El resto corresponden a muestras con potencial toxicológico negativo, pero con toxicidad en la suma, y que por tanto se consideran tóxicas.

Se han cruzado estos positivos (38) encontrados por ZF-Biolabs mediante el test FTZ, con los análisis regulares que aplica el laboratorio de la subdirección de Calidad de las Aguas, de acuerdo al R.D. 140/2003, con el fin de buscar probables interrelaciones entre los test de toxicidad y las posibles incidencias de calidad en las aguas de los embalses y ETAP. En cuatro ocasiones se han producido coincidencias entre los resultados positivos esperados y el test FTZ (dos casos con mortandad de carpas en Pedrezuela, otro en la ETAP correspondiente al citado embalse con floraciones de algas, así como en Valmayor, también por desarrollos de cianofíceas). En el resto de positivos del FTZ no se encuentra concordancia analítica de la citada toxicidad, y en otras ocasiones, con floraciones de cianofíceas, aunque no se han analizado todas, se han recibido resultados negativos.

De los resultados obtenidos se desprende que los ensayos de toxicidad (FTZ), aplicados a las aguas naturales de Canal de Isabel II, no siguen pautas comparables con la analítica físico-química y biológica del laboratorio. Quizá motivado por la diferente naturaleza del tipo de ensayo, los efectos sinérgicos o incluso los posibles contrastes y efectos colaterales de muchos de los productos que pueden encontrarse en el interior celular de las algas son causados por vertidos o disoluciones que en la naturaleza pudieran darse. La falta de importantes "floraciones algales" de cianobacteria tóxicas, a lo largo de la mayor parte del período estudiado, también ha dificultado sobremanera la consecución de este objetivo, por falta de materia prima, las microcistinas, suficiente para evaluar la toxicidad natural del agua.

En cuanto a las muestras especiales empleadas para contrastar la bondad de los bioensayos, se observa una cantidad de casos en los que no se han producido los efectos esperados en un principio. De 5 muestras dopadas, sólo se ha detectado un positivo (con HAP). Con muestras duplicadas, sin embargo, sí se han dado resultados coincidentes entre las cuatro parejas (un caso positivo, y el resto con toxicidad negativa).

Podemos pensar en varios motivos que justifiquen estas diferencias. El primero de éstos es que en un buen número de ocasiones, la mayoría, se ha trabajado con el contenido "particulado" de la muestra, es decir, con el extracto de la misma, compuesto preferentemente por fitoplancton pero desechando la parte disuelta. El haber dejado pasar el contenido disuelto de la muestra ha podido afectar sin duda los resultados esperados, ya que una buena parte de los compuestos añadidos, que presentaban un carácter tóxico, quedaban disueltos y se desechaban, por lo que el extracto utilizado no afectaba al desarrollo embrionario del pez cebra.

Los test de neurotoxicidad y hepatotoxicidad, no han vislumbrado resultados significativos, dándose muchas muestras de carácter dudoso quizás por la falta de muestras de toxicidad positiva.

En cuanto a la utilización de peces cebra recombinantes para testar la toxicidad, cabe destacar que, de los 5 genes seleccionados para el estudio, el gen de la γ -glutamil transferasa, puede ser un candidato adecuado para la construcción de un pez cebra transgénico que sea capaz de detectar compuestos tóxicos en el agua, aunque no se ha testado, suficientemente, con microcistinas. Este pez transgénico portaría el promotor del gen de la γ -glutamil transferasa fusionado delante del gen que codifica la proteína fluorescente verde. La expresión de este gen es mayor cuando los embriones se incuban en presencia del compuesto tóxico desde las primeras horas de vida, por lo que para la detección de compuestos tóxicos en el agua se emplearían embriones de pez cebra transgénico y no individuos adultos.

Al objeto de contrastar y divulgar en el ambiente científico adecuado, se han realizado diversas presentaciones y ponencias del proyecto y de los resultados obtenidos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN página 18

2. OBJETIVOS página 24

3. MATERIALES Y MÉTODOS página 28

- 3.1. Estaciones de recogida
- 3.2. Parámetros de control
- 3.3. Muestreos realizados

4. ÁREA DE ESTUDIO página 50

- 4.1. Características generales
- 4.2. Características de los embalses de Canal de Isabel II

5. EVOLUCIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y BIOLÓGICA página 58

- 5.1. Caracterización físico-química
- 5.2. Caracterización biológica
- 5.3. Bioensayos con embriones de pez cebra

6. CONTRASTE DE RESULTADOS página 150

- 6.1. Muestras positivas de los bioensayos
- 6.2. Muestras sospecha del laboratorio

7. PROPUESTA PARA LA APLICABILIDAD DE LOS BIOENSAYOS A CANAL DE ISABEL II página 160

- 7.1. Test diario
- 7.2. Test semanal
- 7.3. Propuesta para la construcción de un pez cebra transgénico capaz de detectar toxicidad en el agua

8. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN DETECTADAS Y DIFUSIÓN DE PRIMEROS RESULTADOS página 176

- 8.1. II Reunión española de cianotoxinas 2007
- 8.2. Society of toxicology annual meeting 2008
- 8.3. XXVIII Jornadas de AEAS 2008

9. GLOSARIO DE TÉRMINOS CIENTÍFICOS REFERIDOS EN EL TEXTO página 182

10. ÍNDICE DE FIGURAS página 186

11. ÍNDICE DE TABLAS página 194

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS página 198

1

Introducción

Canal de Isabel II es la empresa pública que gestiona el ciclo integral del agua en la Comunidad de Madrid y responsable, por tanto, del abastecimiento de agua.

La subdirección de Calidad de las Aguas, adscrita a la dirección de Recursos Humanos y Calidad, de acuerdo al Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, ha establecido las estaciones de muestreo, parámetros, frecuencias y métodos analíticos para satisfacer, con creces, las exigencias de la citada normativa vigente, tanto en los ríos y embalses, como en la red de abastecimiento.

Por otro lado, la subdirección de Investigación, Desarrollo e Innovación, en el Plan de I+D+i, puesto en marcha en 2005, recogía el programa denominado "Definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones del pez cebra", que se desarrollaría entre 2006 y 2007, con la financiación de la Consejería de Economía e Innovación Tecnológica de la Comunidad de Madrid, y Canal de Isabel II, así como con la colaboración de la empresa de biotecnología ZF Biolabs, especializada en el pez cebra (*Danio rerio*).

Con esta línea de investigación, se trataría de analizar la posibilidad de que el Canal Isabel II disponga de un ensayo rápido y eficaz para la detección de fenómenos tóxicos generados por compuestos (o mezcla de compuestos) raros y/o complejos, de difícil detección, utilizando las técnicas analíticas y microbiológicas aplicadas actualmente por Canal de Isabel II.

En cualquier masa de agua resulta habitual encontrar crecimientos importantes de algas cianofíceas a lo largo de un ciclo anual. Estas algas son productoras potenciales de cianotoxinas, sustancias que presentan como efectos más relevantes sobre mamíferos, aves o peces, afecciones hepatotóxicas, neurotóxicas, o citotóxicas, que pueden concluir en la muerte de los individuos.

Aunque el objetivo es tratar de desarrollar un bioensayo que detecte el máximo número y tipo de compuestos tóxicos presentes en el agua, se prestó una especial atención a los compuestos tóxicos denominados cianotoxinas que pueden ser originados por las cianobacterias (tabla 1). Las microcistinas, las más frecuentes de estas cianotoxinas, son las causantes de la mayoría de los episodios de toxicidad en aguas de consumo, y son producidas tanto por cianobacterias filamentosas (*Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Oscillatoria*, *Nostoc* y *Aphanizomenon*), como coloniales (*Microcystis*). Cada año se descubren nuevas toxinas producidas por estas cianobacterias.

Estos compuestos son altamente tóxicos para el hombre. Por ejemplo, la dosis letal (LD50) de la *saxitona* ingerida por vía oral es de 5,7 microgramos por kilogramo de peso, lo que representa que es unas 200 veces más tóxico que el cianuro, siendo la dosis letal para una persona adulta tan sólo 0,5 miligramos.

Este especial énfasis en desarrollar un bioensayo rápido para cianotoxinas se justifica por la aparición, en algunos embalses que se utilizan para el suministro de agua potable a Madrid (Santillana, Valmayor, Pinilla, Pedrezuela, el Atazar, etc.), de casos de presencia masiva de poblaciones de cianobacterias y en la actual carencia de bioensayos que permitan anticipar fenómenos tóxicos causados por la presencia de estas toxinas en el agua de consumo de una forma eficaz, rápida y sencilla.

Para conseguirlo, se ha trabajado con el pez cebra. El pez cebra, *Danio rerio* (HAMILTON, 1822), pertenece a la familia *cypiniace*, orden *cypriniformes*, clase *actinopterygii*, phylum *chordata* y reino *animalia*. Es originario del subcontinente indio, distribuido por Pakistán, India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Bután. Habita en corrientes, canales, zanjas y charcas, presentándose en corrientes lentas o aguas estancadas, especialmente en plantaciones de arroz. Es común en arroyuelos al pie de las colinas. Su tamaño adulto ronda los 4 centímetros según la longitud estándar.

Tabla 1. Origen y toxicidad aguda en ratón (μg por kilogramo) y tipo de toxicidad de las principales cianotoxinas presentes en lagos y embalses

Cianotoxina	Origen (género de cianobacteria ¹ dominante de la población natural)	Dosis letal (LD50) en ratón (μg / kg ip)	Tipo de toxicidad
Microcistinas	Mic, Ana, Nos, Plank, Anasis, Hapalo	25-1.000	Hepatotóxica
Nodularinas	Nod	30-50	Hepatotóxica y carcinogénica
Anatoxina-a	Ana, Osc, Aph, Cylmum, Plank	250	Neurotóxica
Anatoxina-a(s)	Ana	40	Neurotóxica
Homoanatoxina-a	Plank	250	Neurotóxica
Saxitoxinas	Aph, Plank, Ana, Cylsis, Lyng	10-30	Neurotóxica
Cylindrospermopsina	Cylsis, Aph, Raph, Umez	200-2.100	Citotóxica y genotóxica

Fuente: Elaboración propia y laboratorios ZF Biolabs

Para el desarrollo de los diversos test de toxicidad, se utilizan embriones de este pez, especie que está cobrando gran importancia en la investigación toxicológica y biomédica. Conviene recordar que los bioensayos que utilizan embrión de pez cebra son considerados *in vitro*, dado que el embrión de pez cebra no está considerado como animal de laboratorio, ni por la legislación española (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, Boletín Oficial del Estado de 21 octubre 2005), ni por la europea (Directiva 86/609/EEC).

Otro de los intereses de este trabajo consistía en analizar la posibilidad de la modificación genética, o transgénesis, como vía de obtención de un organismo capaz de manifestar cambios visibles al ojo humano, ante la presencia de toxinas en el medio en que se desarrollaba.

Esto implica la alteración genómica de un organismo a través de la inserción, modificación o delección de un gen, con el objetivo de modificar características de interés. Nuevas características estables pueden ser incorporadas en el organismo receptor y posiblemente ser transmitidas a las siguientes generaciones. En las últimas dos décadas, esta tecnología se ha aplicado de forma satisfactoria en peces debido a que estos vertebrados inferiores presentan características biológicas y reproductivas que permiten una fácil manipulación de sus procesos fisiológicos y genéticos en los estadios tempranos de la ontogénesis (Zhu and Shu, 2000). Estudios de transferencia génica han sido llevados a cabo en más de 35 especies de teleósteos, la mayoría muy importantes en acuicultura. Sin embargo, estos peces modificados genéticamente también han sido desarrollados como modelos experimentales para investigación biomédica, especialmente en estudios que implican la embriogénesis y la organogénesis (Goldman et al., 2001; Takechi et al., 2003), así como en el estudio de enfermedades humanas (Dooley and Zon, 2000; Ward and Lieschike, 2002), xenotransplante (Leventhal et al., 2004) y producción de proteínas recombinantes para producir agentes terapéuticos importantes (Anderson y Krummen, 2002).

Desde la identificación del pez cebra como organismo modelo apropiado para estudiar la genética (Streisinger et al., 1981) a la generación de líneas mutantes estables (Stuart et al., 1990) ha pasado casi una década. Hoy

¹ Abreviaturas de los géneros de las cianobacterias: Ana, Anabaena; Osc, Oscillatoria; Aph, Aphanizomenon; Cylmum, Cylindrospermum; Plank, Planktothrix; Lyng, Lyngbya; Cylsis, Cylindrospermopsis; Mic, Microcystis; Nos, Nostoc; Anasis, Anabaenopsis; Hapalo, Hapalosiphon; Nod, Nodularia; Raph, Raphidiopsis; Umez, Umezakia.

en día existen multitud de protocolos detallados para producir peces cebra transgénicos por microinyección, la cuál ha llegado a ser la técnica de elección de muchos investigadores (Linney and Udvardia, 2004; Grabher et al., 2004; Lin S. 2000).

Pero el proyecto de investigación va más allá y pretende analizar la posible interrelación existente entre los ensayos de biotoxicidad con el pez cebra, con los análisis físico-químicos y biológicos recogidos en el real Decreto 140/2003, y puestos en funcionamiento por Canal de Isabel II.

El análisis de las condiciones físico-químicas y biológicas en los embalses de El Atazar, Pinilla, Pedrezuela, Santillana y Valmayor, durante los años 2006 y 2007, permite disponer de una importante y completa base de datos que facilite la comprensión del funcionamiento de dichos embalses e interpretar de esta manera los comportamientos estacionales, los efectos de las acciones meteorológicas y otras variables que de una u otra manera pudieran afectar a la calidad de las aguas, sobre todo por favorecer el desarrollo y crecimiento de las poblaciones de cianobacterias, principales productoras de cianotoxinas.

Esta memoria recoge la evolución de los parámetros físico-químicos y biológicos de los embalses objeto de estudio, así como de las estaciones de tratamiento de aguas potables (ETAP) que tratan esta agua según el embalse, durante el período de estudio citado.

Es importante recordar que un embalse está condicionado por su propia cuenca, donde las interacciones constantes con intercambio de materia y energía determinan un equilibrio (inestable dada la regulación para uso antrópico). Las modificaciones y alteraciones que se producen en su cuenca se trasladan de una manera amortiguada en el tiempo y forma, al mismo embalse. La interacción con la cuenca, la atmósfera y el sedimento moldearán las condiciones tróficas del embalse. Su capacidad de metabolizar los cambios externos nos servirá de indicador de su capacidad de equilibrarse con las fuentes y sumideros del sistema.

Esta íntima unión se ve afectada por la climatología y precipitaciones, geología, usos del terreno, vertidos –difusos y puntuales–, erosión, aprovechamientos, etc. (Riera, J. L., y J. A. Morgue, 1990). La respuesta del embalse a su entorno se encuentra mediatizada por su carácter híbrido entre río y lago, con un sistema de flujos horizontales y verticales que le relacionan con la atmósfera y el sedimento, reaccionando con diversos mecanismos al estrés generado por la entrada de materia y energía (Margalef R., 1983).

2

Objetivos

La subdirección de Calidad de Aguas de Canal de Isabel II regula la calidad del agua abastecida, al amparo del Real Decreto 140/2003. Al objeto de contrastar la información de los resultados analíticos obtenidos con los bioensayos de toxicidad se afronta el actual proyecto.

Por un lado, se trata de analizar la evolución, tanto físico-química como biológica, de estos recursos hídricos, con mayor detenimiento en la afección a la calidad de las agua para su uso humano.

Por otro, se desarrollarán test de toxicidad rápida, así como test específicos para hepatotoxicidad y neurotoxicidad, afecciones habituales de las cianotoxinas, que se contrastarán con las muestras de agua natural de los embalses citados. Además, se tratará de interrelacionar las condiciones de los embalses, con los ensayos de toxicidad.

El objetivo de desarrollar nuevos bioensayos se complementa con el estudio específico cuantitativo y cualitativo de las poblaciones de cianofíceas presentes en estos embalses, la cuantificación analítica de las cantidades de la microcistina-LR, y la obtención de datos de toxicidad aguda utilizando bioensayos en fase embrionarias y larvarias de peces, reconocido por la legislación española y europea y considerados como *in vitro*.

En el transcurso del proyecto también se llevará a cabo la realización de un estudio previo en relación con la posible utilización de peces cebra recombinantes para la detección específica de de cianotoxinas hepatotóxicas.

3

Materiales y métodos

Aunque la estrategia de muestreo en los embalses durante un ciclo anual básicamente es la misma, se puede comprender que existe una heterogeneidad espacio-temporal, que justifica estrategias diferenciales a lo largo del tiempo del estudio de los embalses, teniendo en cuenta, además, las diversas exigencias de gestión hidráulica de los mismos.

3.1. Estaciones de recogida

La estación principal de recogida de muestras se sitúa a una distancia de entre 50 a 75 metros de la presa. En condiciones meteorológicas adversas se recogen muestras de agua atando la embarcación a la torre de tomas (si la hubiera).

3.1.1. Periodicidad y profundidades de muestreo

La recogida de agua en el embalse se establece con una periodicidad variable entre quincenal y mensual, intensificando ésta en momentos más críticos para el seguimiento del mismo.

El muestreo de la columna de agua se realiza mediante una bomba peristáltica; también se pueden emplear botellas limnológicas, bombas sumergibles o, incluso, aprovechar los grifos de la torre de tomas, si las condiciones climatológicas desaconsejan la entrada de la embarcación.

La medida de la temperatura a lo largo de toda la columna de agua es la operación previa a la toma de muestras. De acuerdo con el perfil térmico obtenido y la distribución algal aportada por la sonda de fluorescencia, se determinan las profundidades en las que se cogen las muestras para su posterior análisis en el laboratorio.

Durante el período de estratificación térmica se toman muestras en superficie, punto superior, medio e inferior de la termoclina, punto medio de hipolimnion y un metro sobre el fondo, además de dos veces la visión del disco de Secchi.

En el período de mezcla, el número de muestras a tomar se concreta en superficie, profundidad media, y un metro sobre el fondo. En todos los casos, además, se cogen muestras en las profundidades correspondientes a las tomas para abastecimiento.

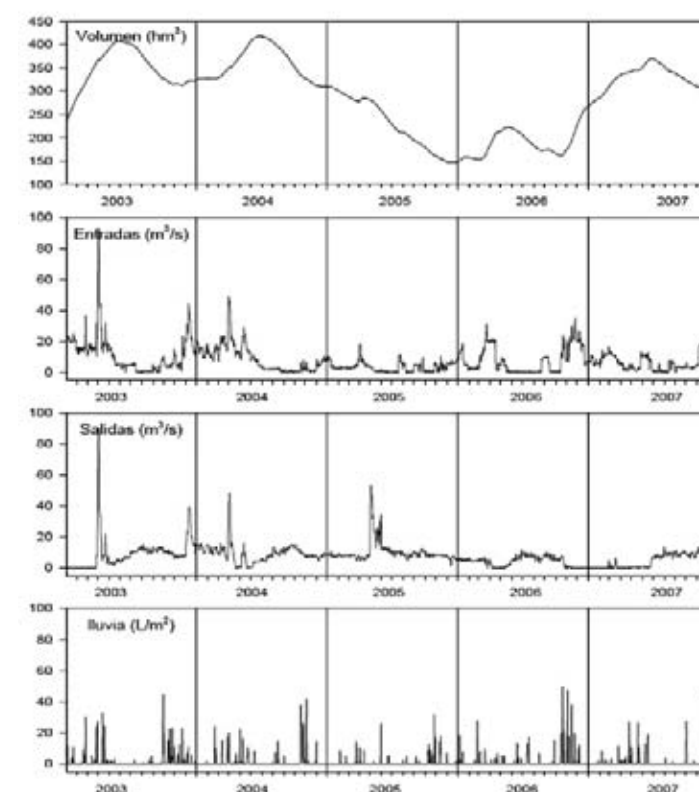
El empleo de una sonda fluorométrica, que realiza perfiles hasta los 50 metros de profundidad, permite ir obteniendo las concentraciones de clorofila de los principales grupos de algas, esto es: clorofíceas, dinoflageladas, cryptofíceas, bacillarofíceas y cianofíceas, así como las denominadas "sustancias amarillas". Es por esto que también resulta una óptima herramienta para analizar las variaciones biológicas en profundidad, *in situ* y de manera instantánea.

3.2. Parámetros de control

3.2.1. In situ

En el embalse se realizan, mediante el empleo de una sonda, las determinaciones de los perfiles verticales de la temperatura. Para la medición de la penetración de la luz incidente se emplea el disco de Secchi.

Figura 1. Evolución hidromorfológica de El Atazar entre el 2003 y 2007



Fuente: Elaboración propia

En el caso de El Atazar, sobre la misma presa del embalse, se sitúa una estación meteorológica de la que se extraen datos relativos a la temperatura ambiente, humedad, velocidad y dirección del viento, presión y precipitación. Unido a la misma boya que señala el punto de muestreo, se ha instalado una cadena de termistores, que permite recoger información continua de la temperatura, en los primeros 15 metros, cada hora. La información queda recogida en una memoria tipo "logger", que se vuelca regularmente a un ordenador para su análisis y tratamiento en el gabinete.

El análisis de esta información conjunta permite interpretar los efectos del paso de frentes, subidas y bajadas de presión sobre la circulación del embalse, y la dinámica de ondas internas.

Medición de la luz

a. Disco de Secchi

Consiste en un plato de color blanco, o salteado con negro, que permite al observador, desde la zona sombría de la embarcación, estimar el punto del perfil vertical donde se deja de ver la luz. El doble de esta distancia señala aproximadamente el punto de compensación de la misma, es decir, allí donde llega el uno por ciento de la luz incidente, sea cualquiera que sea ésta. Tiene su importancia biológica, ya que en este punto los organismos autótrofos compensan la respiración con la fotosíntesis. Por debajo del mismo no podrían sobrevivir las algas.

b. Luxómetro

El luxómetro o radiómetro, es un equipo moderno que nos permite determinar, punto por punto, la intensidad de luz que alcanza esa profundidad. Es, por supuesto, mucho más exacto que el disco de Secchi y nos proporciona valores relativos de penetración de la luz respecto a la que llega a la superficie, así como valores absolutos de la incidencia a diferentes profundidades. Su interés es indudable como herramienta para realizar el seguimiento de diferentes tipos de algas que se desplazan, desde la profundidad, a la búsqueda del tipo de luz más óptimo para su contenido en clorofila o, como herramienta de control de la turbidez.

3.2.2. Análisis en el laboratorio

3.2.2.1. Biológicos

Para la identificación de los individuos constituyentes principales del fitoplancton se realiza su sedimentación, durante 24 horas, en unas cámaras específicas, según el método Utermöhl (Utermöhl, H. 1931, Utermöhl, H. 1958). A continuación, se produce la observación al microscopio invertido de la muestra sedimentada, realizándose el reconocimiento de los grupos dominantes, para lo cual se emplean claves taxonómicas específicas (Bourrelly, P. 1966, Bold, HC; M.J. Wynne. 1985, Desikachary, TV. 1959, Huber-Pestalozzi, G. 1961, Pentecost, A. 1984, Streble, H. y D. Krauter, 1985).

En el laboratorio, además, se realiza la determinación de las clorofilas (a, b, y c) mediante espectrofotometría.

Cuando las concentraciones de cianofíceas resultan significativas, se determina el contenido en microcistina del agua filtrada, mediante un test de inmunoensayo. La puesta a punto de un cromatógrafo líquido acoplado a masa (HPLC/MS) facilitará estimar las diferentes formas de microcistinas, así como su concentración.

En las ETAP se determina –por filtración de membrana– la presencia de coliformes, *Escherichia coli*, *enterococos* y *clostridium*. La determinación de aerobios se lleva a cabo por inclusión.

3.2.2.2. Físico-químicos

En cuanto a los análisis físico-químicos realizados en el laboratorio, las determinaciones analíticas han sido realizadas siguiendo la metodología recogida en los diversos procedimientos de trabajo de la subdirección de Calidad de las Aguas.

Los parámetros analizados son los siguientes: color, turbidez, conductividad, pH, oxígeno disuelto, potencial redox, oxidabilidad al permanganato, nitrógeno inorgánico (amonio, nitritos y nitratos), ortofosfatos, sílice, cloruros, manganeso disuelto y hierro total.

En las ETAP, además, se determina el aluminio a la salida de la planta por plasma, el cloro libre y total por volumetría, y el carbono orgánico total por combustión.

3.2.3. Bioensayos con embriones de pez cebra

3.2.3.1. Proceso de testado rápido de toxicidad

En este estudio se ha prestado una especial atención a las cianotoxinas que son originadas por algunas cianobacterias.

El desarrollo de una tecnología propia de inducción hormonal de la obtención de gametos y de inseminación artificial permitió a ZF Biolabs tener capacidad para acometer el desarrollo de un test de citotoxicidad y teratogenia, de alta sensibilidad y corta duración, 48-72 hpf (horas post-fecundación), el DTZ (Developmental Toxicity test with Zebrafish embryos), basado en *end points* de letalidad y malformaciones morfológicas, funcionales y de crecimiento.

El objetivo, a la hora de desarrollar un test de toxicidad aguda de corta duración, se centró en la detección de anomalías en las primeras divisiones celulares del embrión de pez cebra, producidas por sustancias tóxicas de diversa índole.

Durante las divisiones celulares más tempranas, la sensibilidad de los embriones de pez cebra es máxima, y este es precisamente el momento que hemos querido aprovechar para testar la influencia de la exposición a sustancias tóxicas en el bioensayo de pez cebra.

Los estadios considerados son la división y la blástula, es decir, el tiempo comprendido entre las 0,75 y las 3,5 horas post-fecundación, a 26 grados centígrados. La morfología del embrión en estos estadios permite una correcta interpretación de su desarrollo normal y de sus posibles anomalías, dentro del menor tiempo posible de exposición a sustancias tóxicas, de manera que el test resulte rápido y fiable.

Un aspecto de vital importancia es la reproducibilidad del test, tratando de eliminar al máximo la variabilidad tanto en el proceso de testado como en la obtención de resultados toxicológicos. Este punto capital ha sido un acicate en la búsqueda continua, durante el desarrollo de estos primeros protocolos experimentales, de un método que permitiera la máxima homogenización de las muestras biológicas a utilizar a lo largo de todo el proceso, teniendo en cuenta la alimentación, condiciones de mantenimiento, manejo, selección de embriones, lectura de datos, etc.

Para ello, y en relación directa con el protocolo del test que nos ocupa, se ha optado por un doble proceso de selección de embriones, centrado en primer lugar en la elección de las puestas más aptas para su estudio, y en segundo lugar enfocado a la selección directa de embriones que cumplan unos exigentes requisitos morfológicos que aseguren casi al cien por ciento su correcto desarrollo en condiciones ambientales adecuadas.

Una cuestión, que a lo largo del proyecto se ha revelado como de capital importancia, es el proceso de extracción de cianotoxinas para evaluar su toxicidad en el test con embriones. Se probaron protocolos

de extracción metanólica, pero presentaban graves problemas, originando falsos positivos, por lo que los ensayos se centraron en acoplar al protocolo un procedimiento de extracción que combinara rapidez y eficacia, y que no necesitara de la utilización de compuestos químicos que pudieran interferir en el test. Esto se ha logrado mediante un proceso de sonicación, inspirado en el trabajo de Buryškova et al. (2006).

Ensayos preliminares:

Los primeros ensayos en la materia se encaminaron hacia los siguientes objetivos:

- Observación de divisiones celulares tempranas, tratando de diferenciar el desarrollo normal de posibles anomalías en el mismo
- Exposición de los embriones a sustancias tóxicas desde el mismo momento de la fecundación.
- Interpretación de las observaciones recabadas, poniéndose de manifiesto la sensibilidad de los embriones de pez cebra a la exposición a dichas sustancias.
- Observaciones posteriores a las 3,5 y 24 horas post-fecundación, para visualizar correlaciones en el efecto de las sustancias tóxicas en los embriones a más largo plazo.

Se realizaron dos protocolos de toxicidad antes de concretar el protocolo definitivo.

3.2.3.1.1. Obtención de embriones adecuados

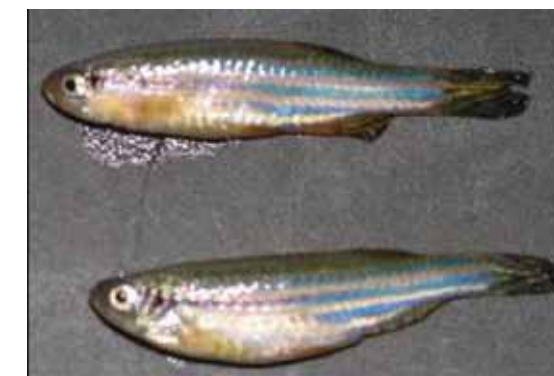
El desarrollo del presente test rápido de toxicidad aguda con embriones de pez cebra requiere, para ser eficaz y útil, de una serie de herramientas que permitan disminuir al máximo la variabilidad entre observadores, aumentando por tanto la reproducibilidad del test. Con este fin se han estudiado diferentes técnicas que homogeneicen el proceso del test y lo hagan más robusto; en ese momento surge la necesidad de estandarizar todo ese proceso en un documento unitario que describa todas las acciones relativas al test, desde aquellas relacionadas con el mantenimiento o la reproducción hasta la selección de embriones y la observación de efectos tóxicos.

El desarrollo del FTZ conlleva, a diario, una alta demanda de embriones de calidad. Según las investigaciones cursadas en ZF Biolabs, los métodos tradicionales de obtención de embriones, mediante reproducción natural, presentan numerosas limitaciones, tales como la dificultad de predicción, disminución del rendimiento a largo plazo, asincronía, mayor suciedad de los embriones, etc.

La inducción hormonal de la producción de gametos, junto con la fecundación *in vitro*, viene a paliar, e incluso a resolver por completo, estas cuestiones planteadas. Así pues, el protocolo de reproducción artificial utilizado en el desarrollo del FTZ reduce la dificultad de predicción en la obtención de embriones, permitiendo aumentar considerablemente la cantidad diaria de los mismos con una altísima viabilidad; igualmente, se mantiene dicha producción a largo plazo, la sincronía y el control sobre el horario de fecundación es total y, al realizarse en condiciones controladas de laboratorio, aumenta notablemente la asepsia de los embriones obtenidos, aumentando su viabilidad y evitando tratamientos de desinfección previos a su utilización en el test. Llevar a cabo nuestro protocolo de reproducción con peces cebra exige dominar la tarea de determinación del sexo en los mismos, ya que machos y hembras han de separarse en acuarios diferentes, de cara a su respectivo tratamiento hormonal (figura 2).

Los huevos de pez cebra, transparentes y no adherentes, son telolecitos, y su división es meroblástica y discoidal.

Figura 2. Diferenciación morfológica de pez cebra. Macho (arriba) y hembra (abajo)



En el momento de la fecundación, el diámetro del huevo es de 0,7 milímetros. Posteriormente, el corion se hincha al hidratarse, alcanzando un diámetro cercano al milímetro. Cinco minutos después de la fecundación aparece diferenciado el polo animal, el citoplasma se acumula en el polo animal, rodeando al núcleo del cigoto.

En la tabla 2 se muestran los estadios de desarrollo del embrión de pez cebra relativos al tiempo de realización del test FTZ. La descripción de dichos estadios está referida a 26 grados centígrados, temperatura constante a la cual se lleva a cabo el test.

Resulta imprescindible determinar la viabilidad de las puestas antes de la elección de los embriones para el test con el fin de seleccionar únicamente aquellos embriones aptos para el desarrollo del mismo.

Tabla 2. Estadios de desarrollo del embrión de pez cebra

Tiempo (hpf)	Estadio	Descripción	Desarrollo del FTZ
0	Fecundación	Huevo recién fecundado	Fecundación <i>in vitro</i>
0,4	Cigoto	1-célula	-
0,75	División	2-células	-
1	División	4-células	-
1,25	División	8-células	Selección de puestas
1,5	División	16-células	Carga y selección de embriones
1,75	División	32-células	-
2	Blástula	Comienzo del estadio de blástula	-
2,5	Blástula	Blástula alta	-
3	Blástula	Blastodisco con 256 blastómeros	Lectura de embriones a las 1,5 horas post-exposición
3,5	Blástula	Blástula aplanada	-

La primera lectura de la calidad de las puestas se realiza a las 1,25 horas post-fecundación. Los embriones se catalogarán como “aptos” (figura 3) o “no aptos” (figura 4). Los embriones aptos son aquellos fecundados con buen aspecto, sin anomalías en el número de células (8) ni en su disposición, y sin taras en el corion (abombamientos, roturas, arrugas).

Su código será el “1”. Los no aptos se codificarán con el “0”. El aspecto de estos embriones puede ser: no fecundado (sin división celular o con dos únicos blastómeros); número anormal de células (inferior a 8); disposición irregular de la división celular (blastómeros sin la alineación correcta, de tamaño anormalmente pequeño o grande); coagulado.

Figura 3. Embriones “aptos” a las 1,5 horas post-fecundación



Figura 4. Embriones “no aptos” a las 1,5 horas post-fecundación: No fecundado (izquierda), coagulado (centro) y con número anormal de células, 4 (derecha)



A las 3 horas post-fecundación, momento en que se realiza la lectura de toxicidad correspondiente al test, los embriones pueden presentar muy diferentes características, diferenciándolos en tres categorías principales:

- Los “embriones normales” son aquellos fecundados con buen aspecto, sin anomalías ni taras, y que se encuentran en su correspondiente estadio de desarrollo de blástula (figura 5).

Figura 5. Embriones normales a las 3 horas post-fecundación



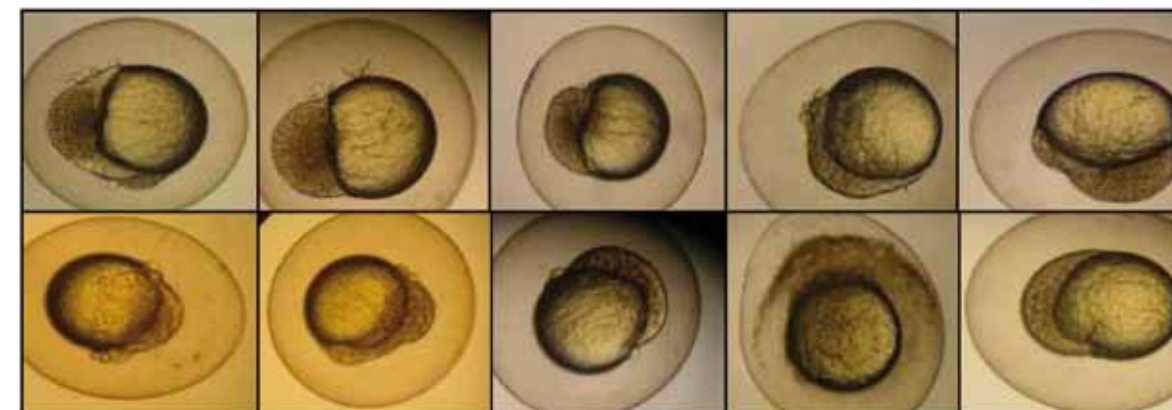
- Los embriones “coagulados” hacen referencia a aquellos que presentan un aspecto lechoso, opaco, con notable degeneración celular y todas sus estructuras normales parcial o totalmente irreconocibles.

- Los “huevos anómalos” presentan algún tipo de anomalía o tara, entendiéndose por tales:

- Claro retraso en el desarrollo.
- Forma anormal del polo germinal, presentando hendiduras, formas excesivamente delgadas o anchas.
- Células con desarrollo anormal en cualquier parte del embrión, formando filamentos, agrupaciones, o bien sobresaliendo en solitario (no se consideran en este caso células que sobresalen sólo muy ligeramente de la masa celular).
- Embrión con aspecto negruzco.
- Embrión que presenta una yema con anomalías en su forma.
- Corion con superficie arrugada o que presente formas muy distintas a la normal, redonda (elíptica u ovalada, por ejemplo).
- Embriones en los que no se distingan las divisiones celulares en el polo germinal.

A efectos de calcular la toxicidad se considerarán tanto los anómalos como los coagulados, en el mismo grupo de afectados por la acción del medio a testar, excluyéndose únicamente los perfectamente normales (figura 6).

Figura 6. Embriones anómalos a las 3 horas post-fecundación



3.2.3.1.2. Protocolo definitivo del test rápido de toxicidad (FTZ)

A la hora de elaborar el protocolo definitivo del test rápido de toxicidad –en adelante FTZ– la principal preocupación en este caso se centró en el desarrollo y optimización de un procedimiento experimental para la extracción de las cianotoxinas, con objeto de probar el test directamente con muestras provenientes de embalses madrileños.

El presente protocolo surge ante la problemática que presenta el necesario tratamiento de las muestras procedentes de embalses y estaciones de tratamiento de agua potable de cara a su estudio mediante el test de toxicidad rápida con embriones de pez cebra, FTZ. Dichas muestras requieren un proceso de extracción

que consiga romper las células y permita disolver las sustancias tóxicas en un medio acuoso inocuo “per se” para los propios embriones, de manera que no pueda dar lugar a falsos positivos. Igualmente, todo el proceso de extracción debe ser muy rápido (desarrollado en pocas horas), de manera que resulte factible su acoplamiento al FTZ.

Experiencias anteriores con extracciones metanólicas de filtrados potencialmente cianotóxicos nos han revelado la enorme dificultad que conlleva la completa eliminación de residuos metanólicos que afectan a la supervivencia y al correcto desarrollo del embrión. De la misma forma, dicho proceso conlleva un alto coste en tiempo. Con el fin de optimizar ambos aspectos, se ha desarrollado un sencillo protocolo de extracción con la sonicación de la muestra como proceso fundamental basado en la ruptura del material celular para permitir la disolución de las sustancias tóxicas en el medio acuoso en el que se lleva a cabo el test (Buryskova et al., 2006). La ausencia de disolventes en todo el proceso asegura evitar falsos positivos por toxicidad del disolvente utilizado. Este método comporta también la ventaja de resultar relativamente rápido, pudiéndose desarrollar en pocas horas y acoplarlo al test FTZ.

3.2.3.2. Protocolo del test de neurotoxicidad

Como complemento al desarrollo del test de toxicidad aguda temprana, se planteó elaborar una batería de tests que sirvieran para detectar el potencial neurotóxico, hepatotóxico y cardiotóxico de muestras de agua. Concentrándose en la neurotoxicidad, el objetivo pasaba por desarrollar un protocolo que la detectara en el menor tiempo posible, compaginando *endpoints* morfológicos con alguno funcional que le diera mayor consistencia al test.

Dado que el primer criterio cuantificable es el movimiento espontáneo, en un principio se enfocó el trabajo a su detección a partir de las 20-21 horas post-fecundación, cuando éste comienza. La necesidad de realizar esta detección en el menor tiempo posible dado el alto número de embriones a observar, condujo a llevar un seguimiento horario de la frecuencia con que se producía el movimiento espontáneo en los embriones, encontrando que éste era máximo alrededor de las 28 horas post-fecundación. Debido a estos resultados, se estableció un protocolo que contemplara la lectura de los embriones en dicha franja horaria, uniendo al criterio funcional del movimiento espontáneo, otros criterios morfológicos para el estudio de la influencia de sustancias tóxicas en el desarrollo del sistema nervioso.

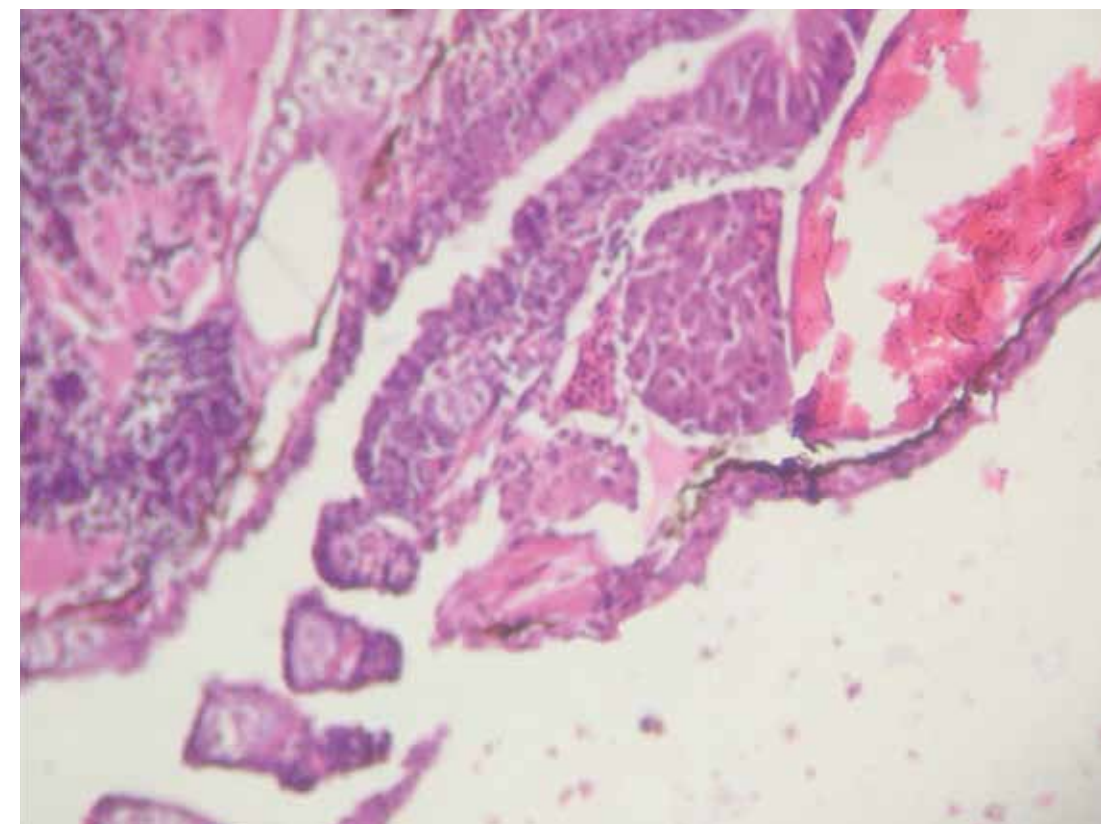
3.2.3.3. Protocolo del test de hepatotoxicidad

Respecto al bioensayo para detectar compuestos con actividad hepatotóxica, nuestras experiencias se han centrado en la determinación de los *endpoints* necesarios para el desarrollo del citado test. La observación de diferentes muestras de embriones tratados con ácido acetilsalicílico, uretano, ácido valproico e isoniazida a diferentes concentraciones, nos muestran la imposibilidad de determinar *in vivo* la anatomía hepática antes de las 120 y preferiblemente 144 horas post-fecundación, (6 días post-fecundación o dpf).

El estudio al microscopio óptico de muestras teñidas (figura 7), si bien abre un campo interesante de estudios histológicos que pueden proporcionar abundante información, presentan el grave inconveniente de la alta cantidad de tiempo y medios a utilizar en comparación con una observación *in vivo* de larvas.

La observación del potencial hepatotóxico de las muestras se ha llevado a cabo mediante el desarrollo de *endpoints* morfológicos a estudiar a los 6 días post-fecundación, mediante observación al microscopio óptico, previa anestesia, de larvas expuestas a diferentes concentraciones de cafeína (compuesto sospechoso de presentar hepatotoxicidad, según Scorecard, <http://www.scorecard.org/health-effects/...>).

Figura 7. Corte histológico de hígado de embrión de pez cebra a los 5 días post-fecundación



3.2.3.4. Microinyección de compuestos tóxicos

La exposición ambiental de embriones de pez cebra a un determinado compuesto implica sumergir los embriones en dicho compuesto. De esta manera, el corion puede representar una barrera física para determinadas sustancias (Jones and Fuman 1975; Wiegand et al., 1999). Para evitar este problema, se ha utilizado la microinyección de embriones de pez cebra (*Danio rerio*) y medaka (*Oryzias latipes*) para estudiar los efectos tóxicos de diferentes compuestos, o de una mezcla de compuestos, sobre su desarrollo (Mizell y Romig, 1997) empleando un sistema de decorionación y un sistema de microinyección en el espacio perivitelino observaron que los embriones resultaron ser excelentes modelos para testar la toxicidad de contaminantes acuáticos. Otros investigadores también han utilizado la microinyección de compuestos tóxicos con otras especies de peces (trucha y *fudulus* para estudiar, mediante esta aproximación, la carcinogénesis química ó analizar el efecto de diversos contaminantes (Black et al., 1985; Metcallfe and Sonstegard, 1984; Grizzle et al., 1988).

Recientemente, (Jacquet et al., 2004; y Wang et al., 2005) han utilizado la microinyección de embriones de medaka y pez cebra para el estudio de la toxicidad de la microcistina-LR concluyendo la idoneidad de esta técnica para embriones de estas especies, al poderse analizar los efectos que el compuesto produce en el desarrollo del embrión.

El equipamiento básico usado en la microinyección de embriones de pez cebra, varía debido a la gran flexibilidad en la elección de equipamiento y métodos que producen resultados satisfactorios (Kay 1991), pero los requerimientos básicos son los mismos. Se necesita un estirador de agujas apropiado y un sistema que varíe la presión dentro de la aguja para liberar la solución de inyección. Además, se necesita un manipulador y un molde donde depositar los embriones en una posición correcta durante la inyección (Gilmour et al., 2002).

La secuencia básica a realizar consiste en llenar una aguja de microinyección con la solución del compuesto a inyectar y anclarla al aparato de aire a presión, el cual empuja la solución de inyección para salir de la aguja. Una pequeña cantidad de solución es entonces liberada en el citoplasma del embrión antes de retirar la aguja. Los embriones inyectados son incubados para su posterior desarrollo.

3.2.3.4.1 Embriones y placa de microinyección

Junto con la calidad del ácido nucleico, el porcentaje de supervivencia de los embriones post-inyección está influenciado por la calidad de los huevos de pez cebra obtenidos. De esta manera, la microinyección puede realizarse en los primeros estadios de desarrollo ya que es posible controlar temporalmente la hora de fecundación de cada puesta.

Debido a la limitación de tiempo que suponen las dos primeras divisiones del embrión (el estadio de una a 4 células) todo el proceso de microinyección debe estar coordinado. Este factor también es limitante a la hora de seleccionar la calidad de las puestas, ya que no se dispone de tiempo para establecer calidad. Únicamente la observación a simple vista de aquellos huevos no fecundados o sobremaduros es indicativo para no seleccionar dicha puesta.

Algunos investigadores prefieren eliminar el corion de los embriones antes de microinyectar, ya que éste hace que los embriones floten y además, el corion sirve de barrera lo que dificulta la inyección. Sin embargo, existe como contrapartida un mayor riesgo de contaminación, en parte debido a la susceptibilidad del embrión decorionado y, en parte, porque los embriones decorionados no se pueden desinfectar. Aunque es más laborioso inyectar huevos con corion, con la práctica puede llegar a resultar simple y además resulta ser la elección de la mayoría de los laboratorios (Gilmour et al., 2002).

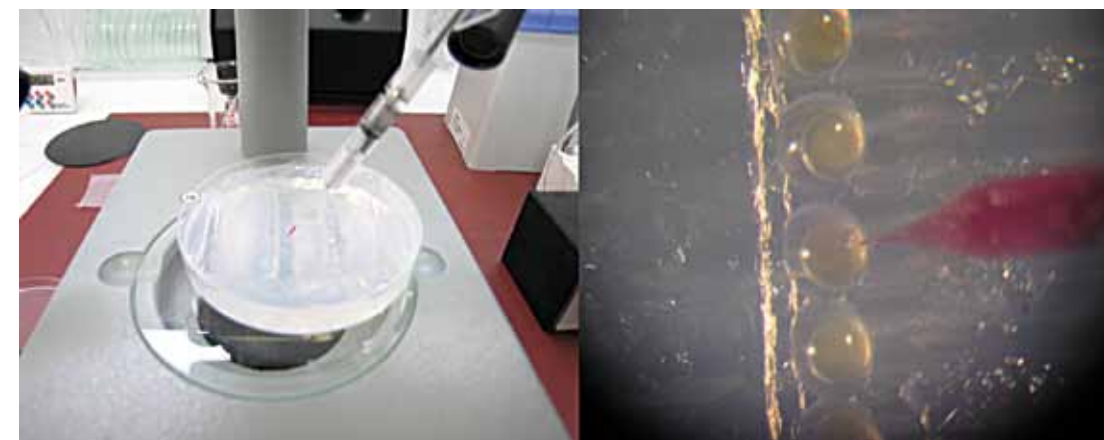
Puesto que los embriones de pez cebra flotan y se mueven fácilmente cuando se les toca, la técnica de microinyección requiere incorporar en su sistema una placa molde donde se depositen los embriones que se van a microinyectar que facilite su colocación y evite su desplazamiento durante el proceso.

Después de hacer una amplia revisión bibliográfica (www.zfin.org; Gilmour et al., 2002; Xu, 1999; Kay, 1991; Guille, 1999; Hermanson et al., 2004), recolectamos los distintos métodos, más o menos caseros, que describen como hacer una placa molde de microinyección. Básicamente, todos los métodos coinciden en realizar uno, o una serie de surcos en el agar (1,2-1,5 por ciento en agua destilada, o agua de embriones), de forma que soporten a los embriones.

El protocolo a seguir es el siguiente. Se prepara una solución de agar al 1,5 por ciento en agua destilada y se lleva a ebullición en el microondas. Una vez disuelto, se deja atemperar y posteriormente se vierte sobre una placa Petri estéril, en una cantidad máxima de 20 mililitros. Encima se pone el molde que hemos realizado en ZF Biolabs para producir los surcos y se deja enfriar para que solidifique. Se sella con parafilm y se conserva a 4 grados centígrados hasta su utilización. Antes de ser utilizada se atempera e hidrata con agua de embriones. Después de la microinyección, la placa molde puede ser reutilizada si se lava con etanol al 70 por ciento y después con agua destilada.

Una imagen de la placa molde de microinyección con los embriones dispuestos en los surcos se muestra en la figura 8 (izquierda) y la observación, a través de la lupa, de los embriones dispuestos en los surcos que se muestra en la figura 8 (derecha).

Figura 8. Embriones en la placa molde de microinyección



3.2.3.4.2 Aguja de microinyección

Las agujas de microinyección deben ser lo suficientemente gruesas como para penetrar fácilmente el corion del embrión sin romperse, pero no tanto como para dañar al embrión. Los capilares de microinyección empleados para hacer agujas (G-100 1 x 90 milímetros, Narishige) son estirados en un estirador de agujas o puler (PC-10, Narishige group) que mediante un flameado produce agujas con forma cónica en el extremo debido a que rápidamente se estrechan en la punta. En el puler (ver figura 9), los parámetros que se controlan para realizar las agujas son las temperaturas y los pesos con los que se produce el estiramiento del capilar. Con estas variables se genera una aguja con una longitud y diámetro determinados y a veces, una ligera curvatura.

Figura 9. Puler



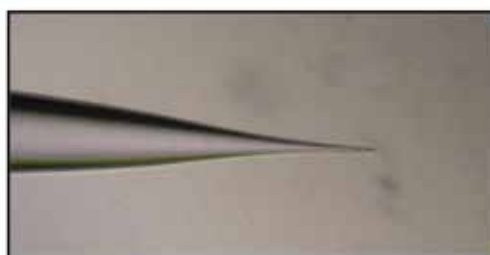
Las agujas que son estiradas mucho, y son muy largas y finas en la punta, dañan el embrión al contactar con el corion y son más susceptibles de bloquearse. El extremo de las puntas muy largas puede ser cortado con ayuda de un forceps de relojero para abrir el extremo de la aguja entre 0,05-0,15 milímetros de diámetro e incluso puede formarse una apertura elipsoidal rompiendo el extremo con el forceps, formando un ángulo de 20-30 grados. Un ejemplo de aguja se muestra en la figura 10. Una vez obtenida la aguja apropiada, se procede a su carga por el extremo que no ha sido estirado con la ayuda de unas puntas microloader (Eppendorf). Se depositan 3-4 μ l de la solución de inyección en el fondo de la aguja, sin producir burbujas.

3.2.3.4.3 Calibración de las agujas de microinyección

El volumen que se inyecta en el embrión depende del diámetro del extremo de la aguja y de la presión con la cual se realice el pulso en el pedal del inyector. Por eso, todos los datos de presión deben ir anotados en las placas donde se depositen los embriones. Cada aguja debe ser calibrada individualmente, (Kay, 1991). Un detalle muy importante a tener en cuenta para la reproducibilidad entre experimentos es usar la misma aguja para inyectar el mismo grupo de embriones.

Para comprobar si una aguja produce daño al embrión, a veces basta con observar que al penetrar en el corion el embrión se revienta, se absorbe el vitelo, etc., pero para comprobar si un defecto o malformación en el desarrollo es debido a la aguja o a la cantidad de rojo fenol y/o compuesto, sólo puede comprobarse mediante el seguimiento del desarrollo del embrión y sus correspondientes cambios de medio a las 24, 48 y 72 horas post-fecundación.

Figura 10. Aguja de microinyección



3.2.3.4.4 Aparato de microinyección

Un sistema de microinyección (Hyatt and Ekker, 1999) empleado en el estudio (figura 11) consiste en un estereomicroscopio, un micromanipulador, una base magnética, una aguja, un tubo de teflón que conduce el aire comprimido y conecta el inyector con el soporte de la aguja, el soporte de la aguja, capilares de microinyección, una placa de microinyección y una fuente de luz fría. El micromanipulador está sujeto a la base magnética mediante un electroimán. La aguja conteniendo la solución de inyección se introduce y se sujeta en el soporte de la aguja, que a su vez es anclado en el micromanipulador. De esta manera, el volumen de aire comprimido que sale de la botella es regulado por el inyector y mediante un pedal se acciona la salida del aire a través de la aguja.

Figura 11. Equipo de microinyección



3.2.3.4.5 Procedimiento de microinyección

El procedimiento de microinyección conlleva varios pasos:

1. Depositar los embriones en la placa de agar cuya forma está hecha con el molde que facilita su colocación. La placa debe estar atemperada e hidratada antes de ser utilizada para depositar los embriones. La colocación de los embriones se realiza con una pipeta Pasteur de plástico de 3 mililitros, con cuidado de no dañar los embriones ni el agar.
2. Cargar la aguja de microinyección con ayuda de la pipeta y las puntas microloader, sin producir burbujas.
3. Colocar la aguja delicadamente en el inyector de forma que la base de la aguja quede completamente pegada en el adaptador para que no se escape el aire.
4. Ajustar la presión de cada pulso y medir el volumen de cada micro-gota en el microscopio, anotando el diámetro y viendo la relación de volumen que expulsa en la tabla previamente hecha en nuestro laboratorio.
5. Una vez anotados todos los datos, se procede a inyectar, ajustando el ángulo de la aguja (unos 45 grados) y enfocando los embriones. Con la ayuda del manipulador se procede a microinyectar los embriones, pulsando el pedal una vez penetrado el corion, atravesado el espacio perivitelino e introducida la yema del embrión e incluso si está orientado el embrión, en la célula del mismo (figura 12).
6. Tras microinyectar todos los embriones de una placa, se añade agua de embriones a la placa de microinyección para depositarlos en una placa Petri de vidrio.
7. A partir de esa placa, se depositan individualmente en los pocillos de una placa de 96 pocillos mediante una micropipeta.
8. Las placas rotuladas se incuban a 26 grados centígrados hasta su posterior lectura.

3.2.3.4.6 Protocolo experimental

Mediante la microinyección de rojo fenol al 0,05 por ciento, para probar diferentes agujas, comprobar si producen herida, o no, y analizar la supervivencia de la microinyección y de la inyección de rojo fenol.

Una vez puesta a punto la técnica de la microinyección, se procedió a la selección de los 6 compuestos tóxicos a microinyectar. Los compuestos seleccionados han sido:

isoniazida, metil-mercurio, uretano, 5'-fluorouracilo, hidroxurea, talidomida.

3.2.3.5. Peces cebra recombinantes

3.2.3.5.1 Introducción

El número de estudios que se han realizado, desde la aparición del primer pez cebra transgénico en 1988 y su uso en varios campos de la investigación, ha aumentado de forma exponencial en los últimos años (figura13).

La producción de peces cebra transgénicos es mucho más sencilla que la de construir ratones transgénicos lo que contribuye al éxito inmejorable que este modelo está teniendo en todos los campos de la ciencia de la vida.

Las áreas de aplicación de los peces cebra transgénicos son múltiples. Además de los usos en investigación del desarrollo y en genética, este organismo ha llegado a ser un organismo modelo importante en drug discovery y screening toxicológico.

Desde la identificación del pez cebra como organismo modelo apropiado para estudios genéticos (Streisinger et al., 1982) y la generación de líneas mutantes estables (Stuart, 1990) ha pasado casi una década. Hoy en día existen multitud de protocolos detallados para producir peces transgénicos por microinyección, la cual ha conseguido ser la técnica de elección para la mayoría de los laboratorios.

Líneas transgénicas también se han establecido en medaka y se han usado para estudios de

Figura 12. Embrión microinyectado con rojo fenol

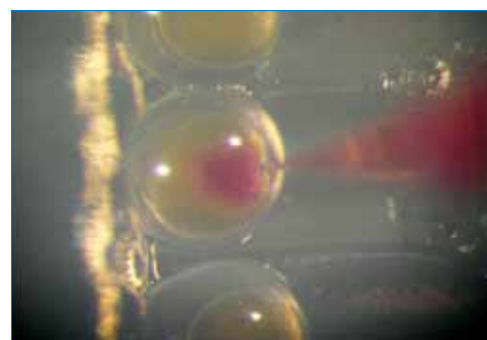
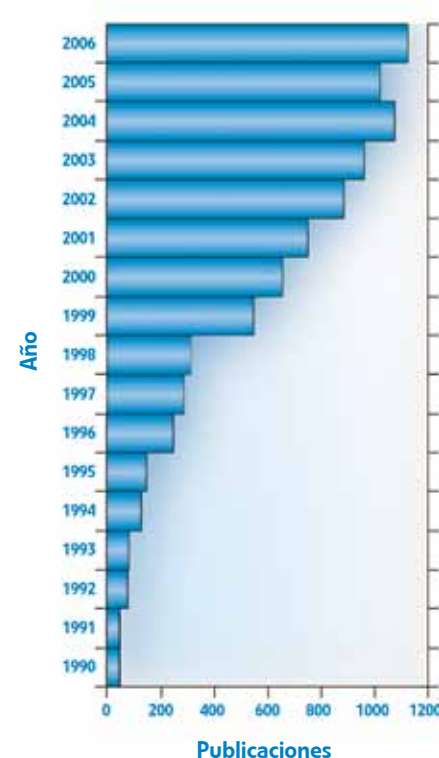


Figura 13. Estudios realizados y referidos al pez cebra

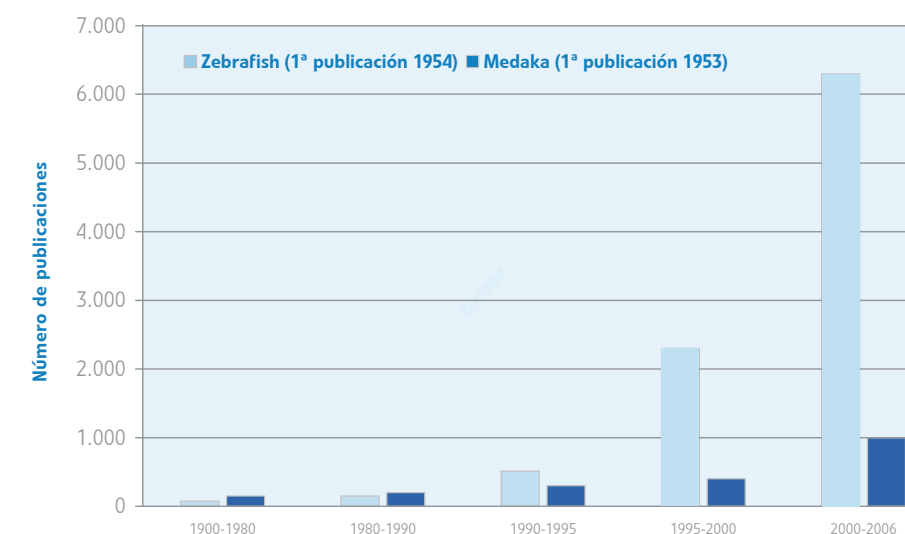


Fuente: Graham J. Lieschke & Peter D. Currie (Nature, mayo 2007) <http://www.wehi.edu.au/facweb/indexresearch.php?id=57>

toxicidad. Sin embargo, como en la actualidad los estudios realizados sobre la biología del desarrollo y la genética, los recursos biológicos moleculares son mayores en pez cebra, pensamos que esto le hace ser un modelo más atractivo y que la viabilidad del proyecto es más elevada en este caso (figura 14).

En cuanto a la visión general sobre el uso del pez cebra para detectar contaminación acuática, Carvan en el año 2000 (Carvan M.J. 3rd et al., 2000), además de otras publicaciones más actuales, muestran la utilidad del uso del pez cebra transgénico en estudios ecotoxicológicos.

Figura 14. Aproximación a los estudios realizados sobre el pez cebra y sobre medaka



Fuente: elaboración propia

3.2.3.5.2 Genes reporter en pez cebra

Los primeros estudios realizados con pez cebra utilizaron varios genes reporter estándar como cloranfenicol, β -galactosidasa, acetiltransferasa (CAT), neomicina fosfotransferasa (NPT), higromicina fosfotransferasa (HPT) y luciferasa. Con el desarrollo de la proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa *Aequorea victoria*, la detección del gen reporter *in vivo* se ha facilitado enormemente. Esta proteína ha sido ampliamente utilizada, al no requerir un sustrato específico para su actividad y ser estable y no tóxica para los organismos. La GFP puede detectarse a través del desarrollo embrionario y larval *in vivo*, y requiere únicamente un microscopio de fluorescencia estándar. Desde entonces se han desarrollado otros genes reporter fluorescentes por mutación de la GFP y ya se han utilizado en el pez cebra. Algunos de estos genes reporter son: Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP, Linney et al., 1999); Yellow Fluorescent Protein (YFP, Gong et al., 2003); Red Fluorescent Protein (DsRed) and Blue Fluorescent Protein (BFP), (Finley et al., 2001).

Estas variantes de GFP tienen diferentes longitudes de onda de excitación y emisión y, por tanto, pueden ser utilizadas en el mismo ensayo (Finley et al., 2001). Por otro lado, ya se han generado peces cebra transgénicos que expresan la proteína fluorescente de varios colores de forma ubicua. Aunque la detección de las proteínas fluorescentes es sencilla, no debemos obviar la autofluorescencia de la yema del embrión de pez cebra. La menor autofluorescencia se observa con longitudes de onda de la YFP (Linney and Udvardi, 2004).

3.2.3.5.3 Peces cebra transgénicos en ensayos ecotoxicológicos

Carvan, (Carvan et al., 2000) han sido los primeros en dar una visión conceptual sobre la utilización de los peces cebra transgénicos para detectar contaminación acuática y, actualmente, varias publicaciones recientes muestran el uso de estos transgénicos en estudios ecotoxicológicos. Genes reporter fácilmente detectables, como la luciferasa o proteínas fluorescentes en combinación con promotores sensibles a contaminantes, han sido establemente integrados en el genoma del pez cebra y su progenie expuesta a diferentes sustancias químicas. Con estos medios se han podido determinar diversos efectos sub-agudos como la respuesta de tipo heat-shock por toxicidad a cadmio (Blechinger et al., 2002), toxicidad mediada por receptores de hidrocarburos, (Mattingly et al., 2001) o estrogenicidad (Bogers et al., 2006). La detección de genes reporter, no invasivos, puede ser monitorizada usando los mismos animales. Esto permite la correlación de los efectos moleculares y de grupo para organismos individuales, proporcionando así la relevancia biológica de la respuesta celular inmediata. Otra aproximación que utiliza un sistema de expresión transitoria en pez cebra se ha realizado para detectar la toxicidad del cobre, utilizando un promotor de una proteína heat-shock (Seok et al., 2006). El éxito de los sistemas transitorios depende, en gran medida, de los niveles de expresión y la especificidad de la expresión, la cuál puede ser difícil de alcanzar dependiendo del promotor utilizado.

Las ventajas de la utilización de un pez cebra transgénico como biosensor de la toxicidad del agua son múltiples. Por un lado, se sabe que los contaminantes pueden llegar a bioconcentrarse en los tejidos del pez de 50 a 1.000 veces con respecto del agua, por lo que la detección de cantidades tóxicas mínimas es factible y además, la fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de compuesto tóxico presente en la muestra. Por otro lado, cabe destacar la rapidez del ensayo ya que en pocas horas sería posible detectar en un organismo vivo la toxicidad producida por un compuesto.

Otra ventaja interesante, es que la técnica evita el sacrificio de los peces puesto que, en principio, se trataría de utilizar embriones. Aquellos embriones que crezcan en presencia de un agua no tóxica, podrán ser mantenidos hasta alcanzar el estado adulto y ser utilizados como "parentales". En el caso de que se quisieran utilizar los peces cebra transgénicos adultos para ensayar la toxicidad, la actividad de la GFP (sólo activa si se excita), permitiría repetir el ensayo con el mismo pez o incluso con otra muestra distinta.

Adicionalmente, el hecho de utilizar un organismo vivo entero, permitiría estudiar la toxicidad órgano-específica (hepatotoxicidad, neurotoxicidad, etc.) de una determinada muestra, en el caso de que fuese necesario. Además, sería posible realizar estudios comparativos entre los datos obtenidos de los bioensayos y los obtenidos por los métodos de análisis que utiliza Canal de Isabel II.

Por último, debemos destacar que se abre la posibilidad de conseguir una patente para Canal de Isabel II y con ello, la oportunidad de generar ingresos a través de licencias a otras empresas de abastecimiento de agua.

3.2.3.5.4 Proceso experimental

Diversos estudios han mostrado la relación existente entre alteraciones en la expresión de distintas enzimas hepáticas y la exposición a cianotoxinas hepatotóxicas. Tras un estudio exhaustivo de la bibliografía publicada, se dispone de una lista de enzimas hepáticas que han demostrado su potencial como marcadores genotóxicos a la exposición de cianotoxinas hepatotóxicas: γ -glutamyl transferasa; aspartato aminotransferasa; alanina aminotransferasa; L-lactato deshidrogenasa y glutatión-S-transferasa.

Una vez seleccionados los enzimas hepáticos a estudiar, se ha procedido a la búsqueda de las secuencias homólogas en el pez cebra, utilizando bases de datos de PubMed, GenBank, Vega y Ensembl.

Los compuestos seleccionados para llevar a cabo este análisis genético han sido: microcistina-LR; isoniazida, metil-mercurio, uretano, valproico y warfarin.

Los pasos necesarios para estudiar la posibilidad de construir un pez cebra recombinante capaz de detectar compuestos tóxicos en el agua, se detallan en la figura 15.

Se exponen larvas de pez cebra de 72 horas post-fecundación a los distintos compuestos hepatotóxicos, a las concentraciones que determinan su LC50 y su LC5. Se utilizan aproximadamente 24 larvas por compuesto y por concentración, así como para un control sin compuesto. A las 20 horas de incubación, se procede a su lectura con objeto de observar posibles anomalías y, una vez analizadas, se procede a la extracción de su mRNA (ácido ribonucleico mensajero). Para obtener datos fiables este ensayo se realizará por triplicado. Para aislar el mRNA de los embriones tratados, se utiliza el kit de extracción de RNA (ácido ribonucleico) total, trizol reagent de invitrogen. Tras algunas mejoras adicionales, se ha conseguido aislar RNA total partiendo únicamente de 25 embriones.

A continuación se realiza la síntesis de cDNA (ácido desoxirribonucleico complementario). Partiendo de 500 nanogramos de RNA total de cada una de las muestras, se lleva a cabo la síntesis de cDNA con el kit thermoScript RT-PCR system de invitrogen. Una vez seleccionados los potenciales candidatos y mediante el empleo de las bases de datos públicas y el uso de herramientas bioinformáticas en red como la alojada en http://pathogene.swmed.edu/rt_primer, se diseñan oligonucleótidos altamente específicos que actúan como sondas que permiten, no sólo amplificar satisfactoriamente los fragmentos de los genes deseados, sino cuantificar de una manera real, mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa, la cantidad de producto génico producido tras la exposición al hepatotóxico. Asimismo, queda implícita la realización de los pertinentes controles para cada uno de los experimentos.

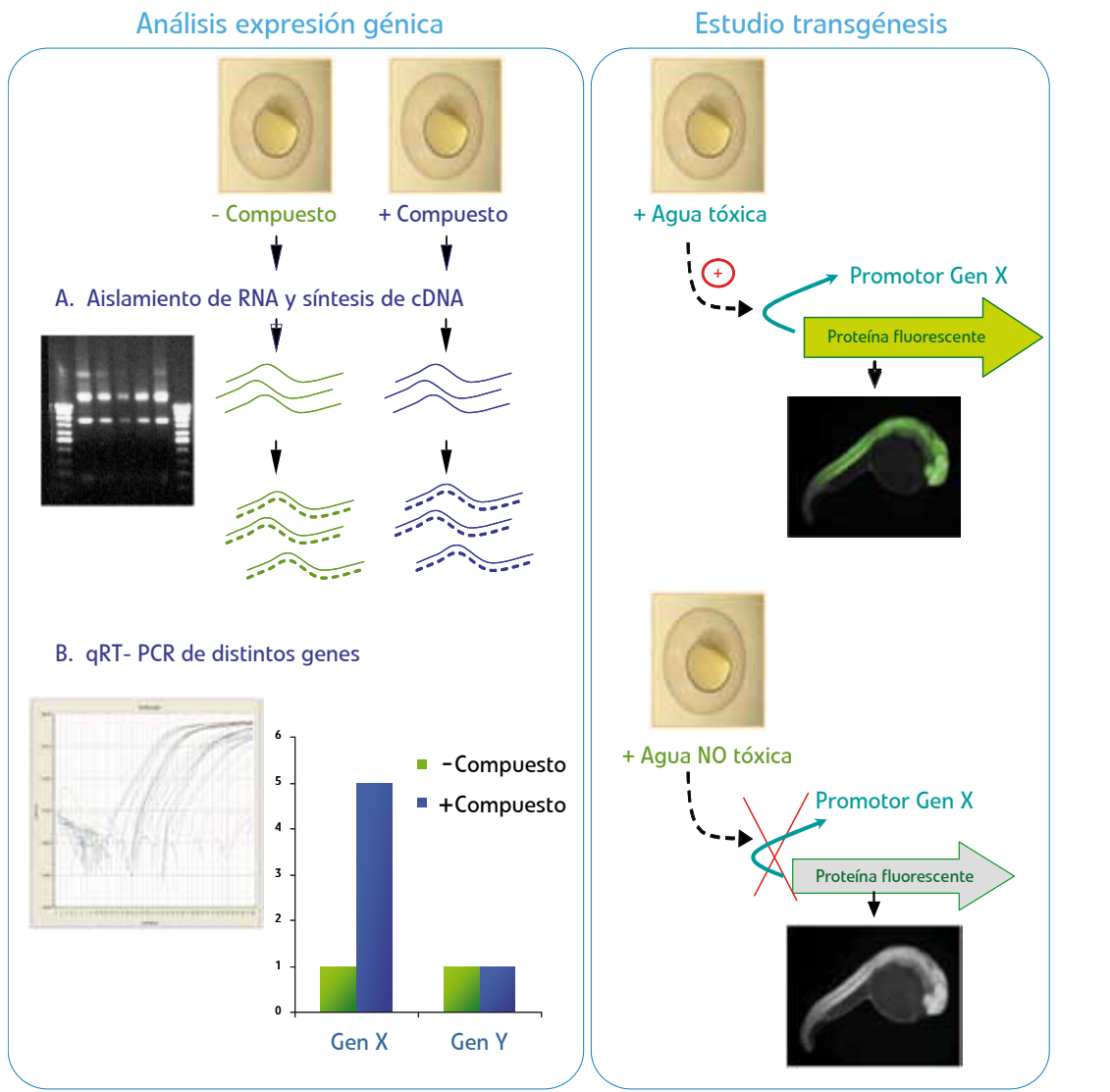
Estos oligos deben amplificar un fragmento de unas 150-200 pares de bases y cumplir una serie de características en cuanto a su porcentaje G+C, temperatura de hibridación, etc.

Antes de realizar la PCR cuantitativa se ha ensayado cada pareja de oligos para comprobar que el producto que se obtiene es único y específico.

Para la cuantificación de la expresión génica de las distintas muestras a analizar, se realiza una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) utilizando el marcador fluorescente sybr green de applied biosystems. Con este sistema el producto amplificado se detecta con fluorocromos que van acoplados a sondas oligonucleótidas que hibridan específicamente con la secuencia diana. La señal fluorescente en el transcurso de la PCR a tiempo real, hace posible la detección y la cuantificación del producto sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción. El procesamiento se realiza de forma automática con un sistema de detección de secuencia ABIPRISM 7700 de Applied Biosystem.

Adicionalmente, se incluye un control interno para detectar posibles inhibiciones de la reacción de amplificación y para monitorizar las pérdidas de ADN (Ácido desoxirribonucleico) durante la fase de preparación de la muestra.

Figura 15. Pasos a seguir para el desarrollo de un bioensayo en pez cebra capaz de detectar microcistinas



3.3. Muestreos realizados

3.3.1. En los embalses

De manera regular, cada 2 semanas o con carácter mensual, se recogieron muestras de agua a diferentes profundidades en cada embalse, durante 2006 y 2007.

3.3.2. En las estaciones de tratamiento de agua potable

Las estaciones de tratamiento (ETAP) de Colmenar, Pinilla, Santillana y Valmayor, que reciben y potabilizan las aguas de los embalses objeto del estudio, se han muestreado todas las semanas durante 2006 y 2007 salvo que –por causas ajenas a la subdirección de Calidad de las Aguas– estuvieran paradas en su proceso productivo.

En total, supone la siguiente estadística (tabla 3).

Tabla 3. Muestras analizadas en 2006 y 2007 por la subdirección de Calidad de Aguas

	Embalses		ETAP				Subdirección Calidad Aguas Totales
	2006	2007	Entrada		Salida		
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	
Santillana	188	188	82	70	334	185	Subdirección Calidad Aguas Totales
Valmayor	236	167	91	108	344	267	
Pinilla	187	119	95	49	313	61	
Pedrezuela	116	48					
El Atazar	197	164	97	95	354	273	
Total	924	686	365	322	1.345	786	

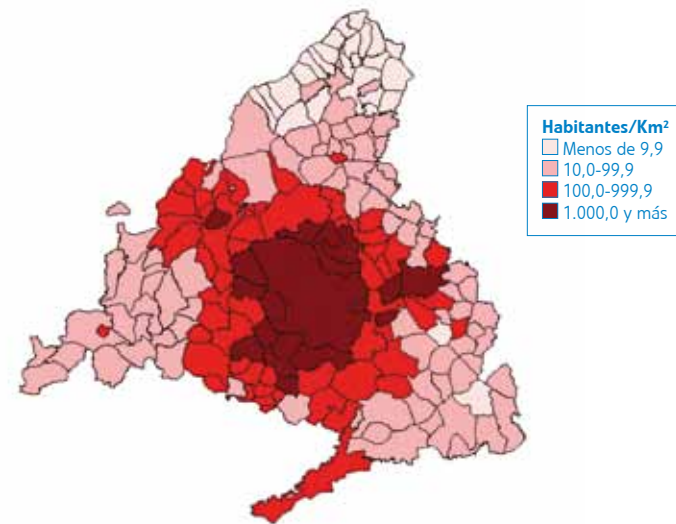
4

Área de estudio

4.1. Características generales

La Comunidad de Madrid tiene censados 5.804.829 habitantes (INE 2004), distribuidos en un área de 7.995 kilómetros cuadrados, por lo que tiene una densidad de población de 726 habitantes por kilómetro cuadrado, lo que supone una elevada densidad de población sobre una superficie que ocupa el 1,58 por ciento del territorio nacional (figura 16).

Figura 16. Distribución de la población en la Comunidad de Madrid



4.2. Características de los embalses de Canal de Isabel II

Los embalses gestionados por Canal de Isabel II se encuentran distribuidos por la Comunidad de Madrid, (con excepción de El Vado, situado en Guadalajara), concentrados principalmente en el cuadrante norte y noroeste de esta Comunidad (figura 17).

Las aportaciones históricas reflejan una elevada variabilidad, con valores que van desde los 213 hectómetros cúbicos en 1991-1992, a 1.707 hectómetros cúbicos del año 1940-1941, y variaciones mensuales entre 0,41 y 536 hectómetros cúbicos. La demanda media anual supera los 550 hectómetros cúbicos.

En la actualidad, se almacena un total de 946 hectómetros cúbicos en los citados 14 embalses, (tabla 4).

En cuanto a los embalses objeto de este estudio, sus principales características morfológicas se pueden observar en la tabla 5.

Figura 17. Red de embalses de Canal de Isabel II



Tabla 4. Embalses en explotación por Canal de Isabel II

Denominación	Río	Entrada en servicio	Capacidad embalse (hm³)
El Villar	Lozoya	1879	22,40
Puentes Viejas	Lozoya	1939	53,0
Riosequillo	Lozoya	1958	50,00
El Vado	Jarama	1960	55,70
Pinilla	Lozoya	1967	38,10
Pedrezuela	Guadalix	1968	40,90
Navalmedio	Navalmedio	1969	0,70
La Jarosa	La Jarosa	1969	7,20
Navacerrada	Samburiel	1969	11,00
Manzanares el Real	Manzanares	1912-1971	91,20
El Atazar	Lozoya	1972	425,30
Valmayor	Aulencia	1976	124,40
Los Morales	Los Morales	1988	2,30
La Aceña	Cofio	1991	23,70
TOTAL			945,90

Tabla 5. Características morfométricas de los embalses de estudio

Embalse	Pinilla	El Atazar	Pedrezuela	Santillana	Valmayor
Cuenca	Lozoya	Lozoya	Guadalix	Manzanares	Guadarrama
Superficie de cuenca (km ²)	259,00	243,50	218,00	244,40	101,40
Capacidad máxima embalse (hm ³)	38,05	425,27	40,89	91,24	124,36
Volumen muerto de abastecimiento (hm ³)	0,02	0,10	0,52	2,91	8.318,00
Anchura (m)	1.358,40	1.945,69	1.664,31	6.051,47	7.993,66
Perímetro (m)	12.201,57	43.903,03	22.231,15	23.313,72	23.718,34
Longitud (m)	5.392,05	11.673,57	5.618,20	4.136,05	3.552,58
Cota del lecho del río (m)	1.060,00	745,40	781,00	856,50	778,57
Cota mínima de aprovechamiento (m)	1.064,10	759,00	786,00	863,50	782,50
Cota de máximo embalse (m)	1.088,80	870,00	828,00	894,00	831,00

4.2.1. Pinilla

El embalse de Pinilla (figura 18) tiene una superficie de cuenca muy elevada, de 259 kilómetros cuadrados, pero su profundidad es muy pequeña. La cota máxima es de sólo 1.088,8 metros, cuando la cota mínima de aprovechamiento es de 1.064,1 metros. La cota sobre el lecho del río es de 1.060 metros, por lo que apenas tiene volumen muerto de almacenaje, 0,02 hectómetros cúbicos. Su capacidad de almacenamiento es muy baja, tan sólo 38,05 hectómetros cuadrados.

En toda la zona hay un elevado número de cabezas de ganado ovino y bovino, especialmente de vacas. El embalse recibe los vertidos de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) de Pinilla. Es el embalse cabecera del sistema del Lozoya, por lo que su aporte es principalmente el río Lozoya. Cuenta también con una amplia serie de arroyos, entre los cuales los más importantes son:

Al norte: Villar (Gallina), Carrretero y Navareco (Palomar, Fuensanta).

Al sur: Cantera, Pedrosillo, Umbría, Río de la Angostura (Aguilón) y Santa Ana.

Al oeste: Paular, Artiñuela, Gallinero y Entretérminos.

Al noroeste: Zarzosa, Sauca y Zarza.

Figura 18. Embalse de Pinilla



4.2.2. El Atazar

El Atazar (figura 19), con una capacidad de vaso de 425,27 hectómetros cúbicos, una profundidad máxima sobre el lecho del río de 124,6 metros y una superficie, a su cota máxima, de 10,7 kilómetros cuadrados, constituye una parte fundamental del sistema de abastecimiento de agua de Canal de Isabel, hasta el punto de suponer el 46 por ciento de la capacidad de suministro total de la Comunidad de Madrid.

Figura 19. Embalse de El Atazar



La cuenca propia del embalse es de 243,5 kilómetros cuadrados, pero si consideramos la cuenca vertiente a todo el sistema, ésta asciende a 918 kilómetros cuadrados. La situación litológica, suelo y vegetación es variada, con abundancia de suelos moderadamente erosionables. Al norte, cerca del embalse de El Villar, se reconoce una formación de rocas metafóricas más alteradas y modificables que las formaciones graníticas del oeste de la región.

Al embalse de El Atazar alcanzan varios arroyos de diversa importancia que en conjunto recogen la mayor parte de las escorrentías de la cuenca vertiente. También aporta, de manera regulada, el embalse de El Villar, que —a modo de receptor final— recoge los aportes que han ido pasando de embalse a embalse en la cadena del río Lozoya. Este aporte es el más relevante, en cuanto a la cantidad y calidad, que llega al embalse. Desde la cabecera del embalse hacia la presa, se disponen los siguientes tributarios:

Por la margen izquierda: Dehesa, Cervera y Río Puebla.

Por la margen derecha: Alameda, Almiguelles, Recombo, Dehesilla y Jóbalo.

4.2.3. Pedrezuela

El embalse de Pedrezuela (figura 20) se encuentra ubicado en la cuenca del río Guadalix.

En esta cuenca predominan los matorrales acidófilos —cantuesares y tomillares— intercalándose encinares claros y adehesados. En la cota alta aparecen masas de coníferas aisladas. Si nos acercamos al embalse, nos encontramos con pastizales limpios o combinados con encinas dispersas. En la margen derecha se observa el dominio del encinar, con estructura variable, que refleja el paso de un terreno adehesado a pastizal. El encinar gana complejidad y grado de cobertura tanto de porte arbóreo, como arbustivo.

Las precipitaciones medias en la zona de la presa registran valores de 670 milímetros.

Desde el punto de vista litológico, los terrenos drenados están constituidos por gneis en la margen derecha y granitos en la izquierda en la zona de Navalafuente, donde predominan los materiales metamórficos.

En general, se trata de suelos de permeabilidad baja, con pendientes entre el 7 y el 15 por ciento.

Presenta tres tributarios relevantes por el norte, desde el oeste al este, tenemos el Albalá, Gargüera y Guadalix, este último ya ubicado en el propio pueblo del mismo nombre.

Destacar que el arroyo Albalá recibe con cierta frecuencia vertidos de una cantera, lo que afecta al embalse, "blanqueando" parte del mismo en el radio de influencia del aporte. Los otros dos tributarios se caracterizan por los efluentes que reciben, en el caso del Gargüera, los de la estación depuradora de aguas residuales de Bustarviejo, Navalafuente y la urbanización El Chaparral; hasta hace unos años también recibía los aportes del ganado establecido en su cuenca.

Guadalix aporta cantidades importantes de cargas ganaderas en vías de retirada del mismo, así como los efluentes de las estación depuradora de aguas residuales de Miraflores (en cabecera) y Guadalix justo al tributar al embalse.

Figura 20. Embalse de Pedrezuela



4.2.4. Santillana

El embalse de Santillana (figura 21) se encuentra incluido en la cuenca del río Manzanares. Presenta una distribución vegetal repartida en coníferas en cotas altas y, en la parte central de la cuenca, encinares y dehesas. Las precipitaciones medias anuales se acercan a unos 780 milímetros.

Figura 21. Embalse de Santillana



Los terrenos drenados son de naturaleza granítica, con pendientes entre el 7 y el 15 por ciento, con alguna excepción al noroeste por presencia de depósitos aluviales y coluviales.

Presenta pequeños tributarios que recogen las aguas de Manzanares El Real de las estaciones depuradoras de aguas residuales de Santillana y de Navarrosillos. El arroyo Samburiel integra vertidos dispersos de Cerceda. El río Manzanares recoge los vertidos de Navarrosillos y los procedentes de Colmenar Viejo.

4.2.5. Valmayor

El embalse de Valmayor (figura 21) se ubica en la cuenca del río Guadarrama. Esta amplia cuenca abarca los terrenos que vierten a los embalses de Navalmedio y La Jarosa en un entorno netamente forestal, predominando las coníferas. La cuenca de Valmayor, sin grandes desniveles altitudinales, presenta una vegetación uniforme dominando el encinar denso, acompañado de enebros y carrascas en sotobosque. En la zona del río Aulencia se observan extensas formaciones de encinar con vocación ganadera.

En cuanto a las precipitaciones, el valor medio anual se acerca a los 1.000 milímetros.

El tributario más relevante es el río Aulencia, que recoge los vertidos de El Escorial y de la estación depuradora de aguas residuales del citado pueblo. También se trasvasa agua del embalse de Las Nieves (recoge los aportes de Collado Villalba) y del embalse de San Juan.

Figura 22. Embalse de Valmayor



5

Evolución físico-química y biológica

En este apartado, vamos a presentar las características más relevantes de los diversos aspectos físicos, químicos y biológicos analizados en los embalses objeto de estudio.

El concepto "eutrofia" significa literalmente "bien alimentado", (del griego eu: bien, y trofe: alimentado) y se refiere al enriquecimiento de sales minerales en un medio acuático, que se ve de esta manera fertilizado y como consecuencia, se produce un crecimiento inusual de organismos fotosintetizadores (algas).

Así pues, la entrada en exceso (es decir, el sistema no es capaz de metabolizarlo de manera "normal") de sales de fósforo y nitrógeno conlleva un desequilibrio en el crecimiento de los organismos que constituyen la base de la cadena trófica. También se van a ver afectados una serie de parámetros, que desarrollaremos más adelante pero que podemos adelantar, como la anoxia en fondo, saturación de oxígeno en superficie, baja diversidad algal, alta concentración de estos organismos, etc.

Un embalse funciona como un quemostato, un sistema de cultivo de algas en el que se introducen los nutrientes para éstas por un lado saliendo, por otro, parte de la producción. Los estudios realizados en España señalan que es el fósforo el principal responsable de la eutrofización de las aguas.

Conceptos modernos de eutrofización definen ésta como la situación de forzar el sistema desde fuera con introducción de nutrientes, de forma tal que se produce el desequilibrio, introduciendo desviaciones en las características del sistema y de la composición biótica, activándose los mecanismos de estabilización y de la sucesión (figura 23).

Por otro lado, si se aportan sales de fósforo en exceso, dejando éste de ser el limitante del desarrollo de las algas, pasando este condicionante al nitrógeno, tendremos importantes desarrollos de algas azules o cianofíceas caracterizadas, en buena parte, por su potencialidad para producir cianotoxinas. Las más relevantes y conocidas, las microcistinas, están limitadas en el abastecimiento, con un valor paramétrico de $1 \mu\text{g/l}$ (microgramo por litro), según el Real Decreto 140/2003, cuyo análisis de toxicidad es el fundamento último de este proyecto.

A continuación, se expondrá la evolución de los principales parámetros físico-químicos de los embalses estudiados a través de una serie de figuras relativas a los años 2006 y 2007, en donde se representa cada parámetro a lo largo de la profundidad y el tiempo. En cada figura se establece una escala de colores y unas isóneas, para representar la variación del parámetro.

También aparece una línea más gruesa, que corresponde a la termoclina y, en caso necesario, el fondo del embalse en color negro. La escala de colores está adaptada a los valores de cada embalse y representada a la derecha de la figura, por lo que para comparar uno con otro es necesario comprobar el valor que adquiere cada color en cada embalse.

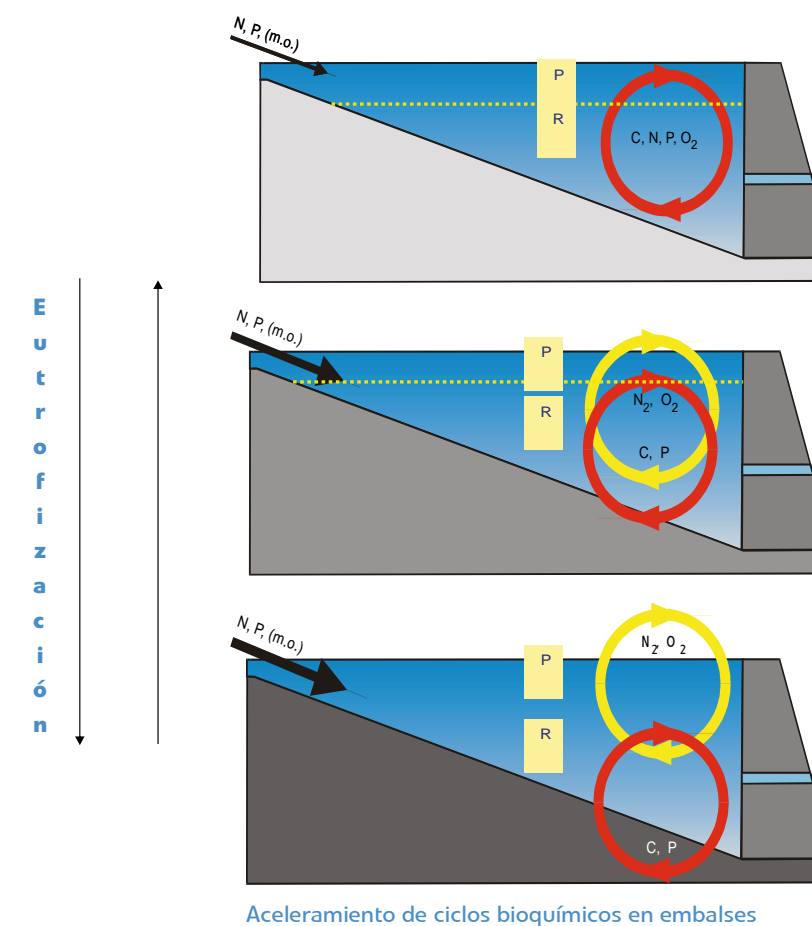
En algunos parámetros como el hierro total, manganeso, amonio y ortofosfato, las figuras del año 2006 están representadas en microgramos por litro y en 2007 en miligramos por litro.

5.1. Caracterización físico-química

5.1.1. Temperatura

La temperatura es una variable fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, puesto que influye tanto en la distribución como en la variación de los parámetros, siendo por lo tanto clave en lo referente a la calidad de las aguas.

Figura 23. Esquema del aceleramiento de ciclos bioquímicos

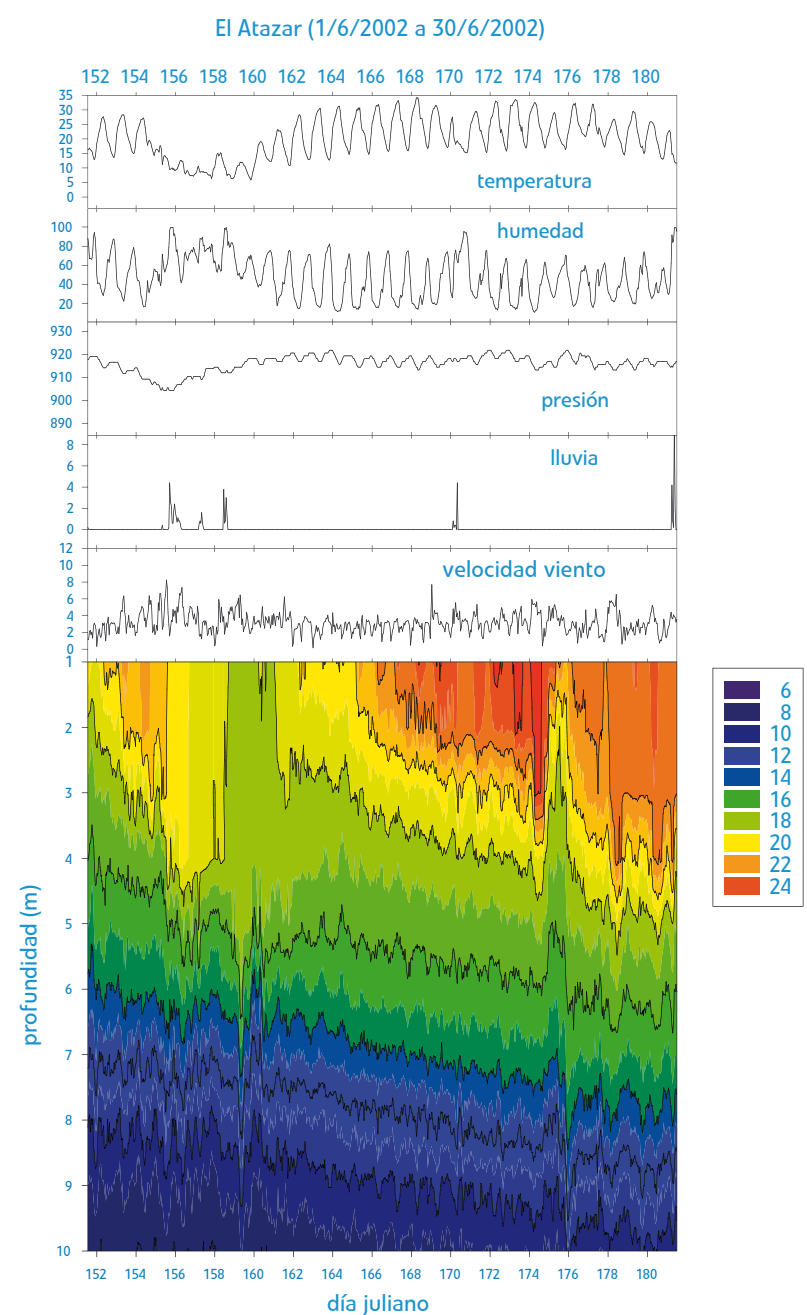


Aceleramiento de ciclos bioquímicos en embalses

Los embalses del estudio presentan un comportamiento monomítico, así que durante el periodo anual tienen un periodo de estratificación térmica y otro periodo de mezcla. A pesar de este parecido, la estratificación varía en los diferentes embalses, puesto que influyen varios factores como la morfometría, el volumen de agua embalsado y la altitud. También se encuentran diferencias anuales en cada embalse, aunque generalmente comienza la estratificación en primavera y desciende paulatinamente en profundidad hasta invierno, cuando la bajada de temperaturas y el viento generan el movimiento de las masas de agua y la mezcla.

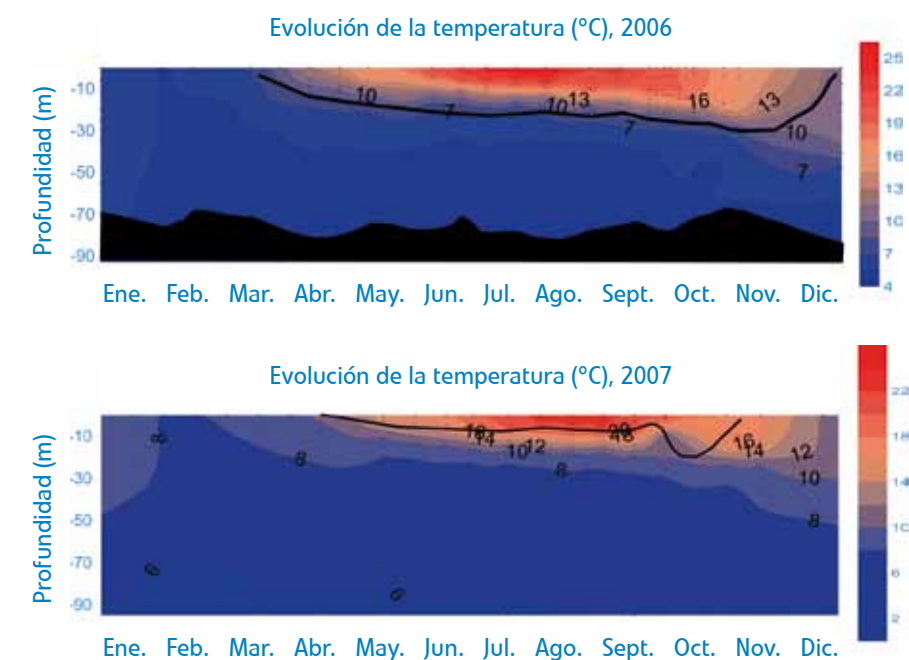
El empleo de la cadena de termistores permite analizar, con más detenimiento en la parte de la zona fótica, las influencias de los diversos frentes, calentamientos y enfriamientos de la columna de agua. La evolución de estos parámetros se encuentra recogida en la figura 24.

Figura 24. Dinámica de El Atazar, desde el año 2002 hasta 2007

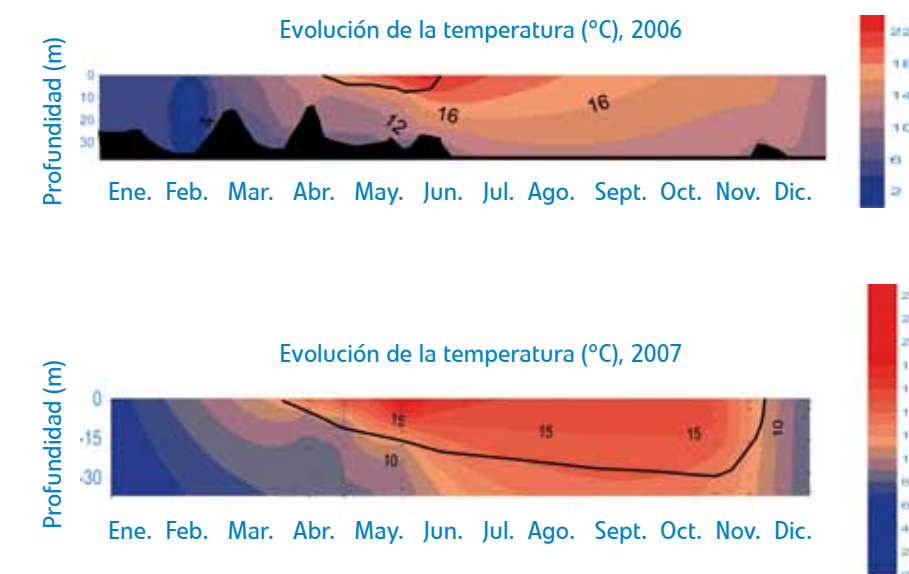


En las siguientes figuras (25 a 34) podemos observar la evolución térmica de los embalses objeto de este estudio durante 2006 y 2007.

Figuras 25 y 26. Evolución térmica en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



Figuras 27 y 28. Evolución térmica en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



Figuras 29 y 30. Evolución térmica en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



Figuras 31 y 32. Evolución térmica en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



Figuras 33 y 34. Evolución térmica en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



La temperatura muestra una evolución esperada, con mínimos en invierno, durante el periodo de mezcla. Estos suelen alcanzar cero grados, con excepción de El Atazar y Santillana en 2006, donde son un poco más altos.

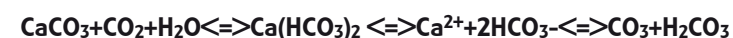
5.1.2. Oxígeno disuelto

Esta variable es una importante indicadora del alcance de los fenómenos de oxidorreducción junto al pH y el potencial de oxidación, lo que hace tan interesante su estudio. También hay que indicar que la evolución del oxígeno disuelto guarda una fuerte relación con la temperatura, puesto que al aumentar la misma, disminuye la solubilidad de los gases en el agua, escapando por tanto el oxígeno disuelto a la atmósfera.

La distribución del oxígeno disuelto, los valores del pH y del potencial de oxidación resultan de gran utilidad para determinar el alcance de los fenómenos de oxido-reducción en los embalses. En general, podemos evaluar el metabolismo de las aguas por las relaciones de síntesis de oxígeno disuelto y su utilización.

Altas concentraciones de oxígeno disuelto aparecen habitualmente también en los meses de primavera, al encontrarnos en el embalse suficientes sales nutritivas para mantener el desarrollo algal y producirse un incremento de las horas de luz, lo que favorece la formación del bloom algal en los niveles fóticos del embalse.

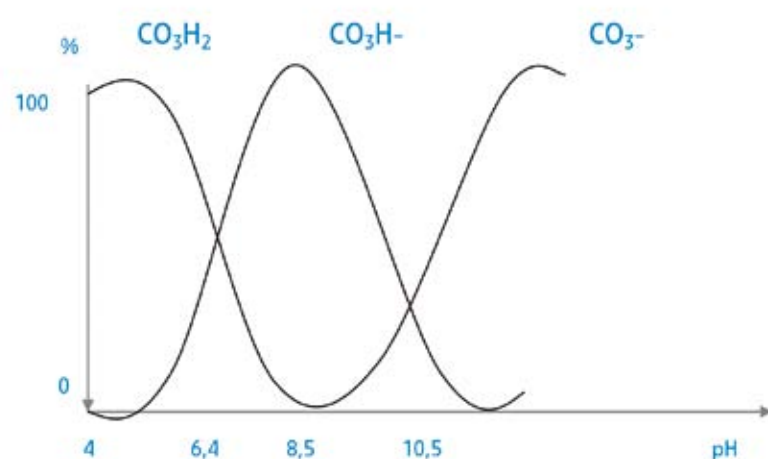
Así pues, nos encontramos con una sobresaturación de oxígeno y un incremento de la materia orgánica en forma de biomasa algal, a la vez de un incremento en los valores del pH, toda vez que al disminuir el contenido en CO₂ de las aguas, el equilibrio que éste mantiene con el bicarbonato y el carbonato se desplaza, produciendo un incremento del pH y una disminución del bicarbonato.



El equilibrio entre el bicarbonato y el carbonato se puede observar en la figura 35, en función del pH. Así pues, altos valores de CO_2 se producen en condiciones de baja fotosíntesis (predomina la respiración). La reacción tiende hacia la derecha, hacia el bicarbonato, cuya proporción es superior en pH bajos. Así podemos intuir que cuando las algas se encuentran en un estado de fotosíntesis activa, el CO_2 es bajo, y por tanto el pH es alto (predomina el ión carbonato).

Esta sobresaturación superficial del oxígeno disuelto resulta ser un claro síntoma de eutrofia en nuestros embalses, en combinación con la "bomba de oxígeno" (Margalef, R., 1983).

Figuras 35. Equilibrio carbónico-carbonato



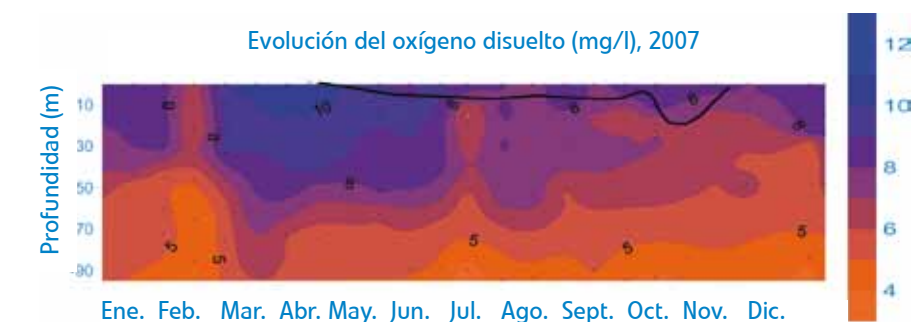
A lo largo del período estival, el incremento de la temperatura de las aguas produce la disminución de la solubilidad del oxígeno disuelto y el agotamiento del contenido en sales nutritivas disminuye el desarrollo algal y por lo tanto la producción de oxígeno disuelto.

Las reservas de oxígeno disuelto en el hipolimnion suelen ser escasas, cuando su volumen es pequeño, para la demanda generada, produciéndose situaciones de anoxia cuando esto ocurre y fenómenos de reducción de la materia acumulada. Esta pérdida de oxígeno disuelto en el hipolimnion se produce como resultado del gasto realizado durante la oxidación de la materia orgánica y sobre todo en la interfase agua-sedimento, en el cual la actividad heterótrofa bacteriana es mucho más intensa.

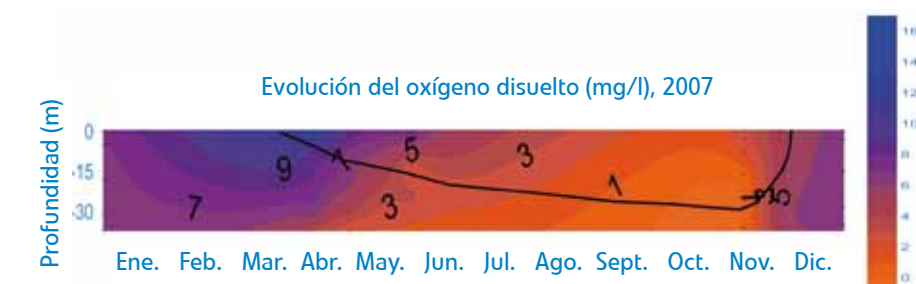
En nuestro caso, son escasos los embalses estudiados donde no se observan fenómenos de anoxia (valores de oxígeno inferiores a 1 miligramo por litro, Nürnberg, G.K., 1987), uno de estos es El Atazar, debido a la capacidad de almacén de oxígeno disuelto del hipolimnion, además de la baja productividad algal, que no aporta demanda de oxígeno en el hipolimnion por sedimentación.

En las figuras 36 a 45 se puede observar la evolución del oxígeno disuelto en los embalses durante 2006 y 2007.

Figuras 36 y 37. Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



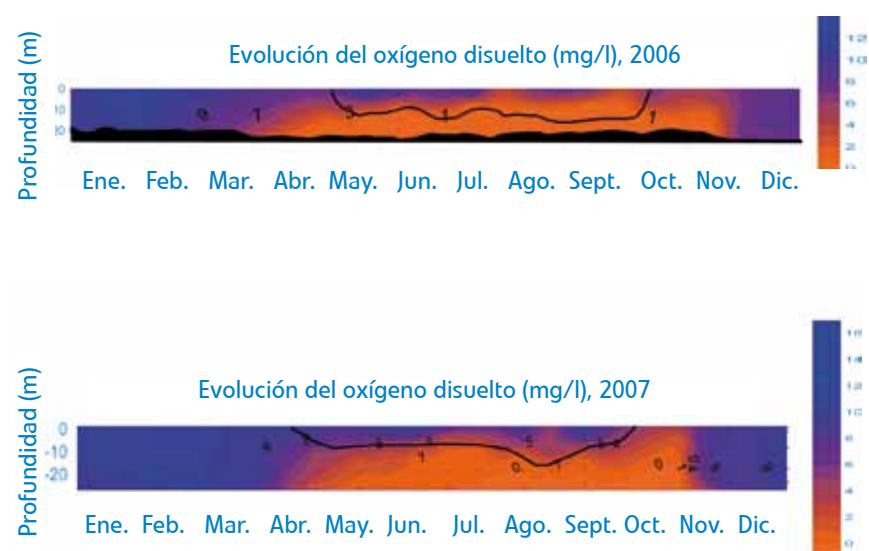
Figuras 38 y 39. Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



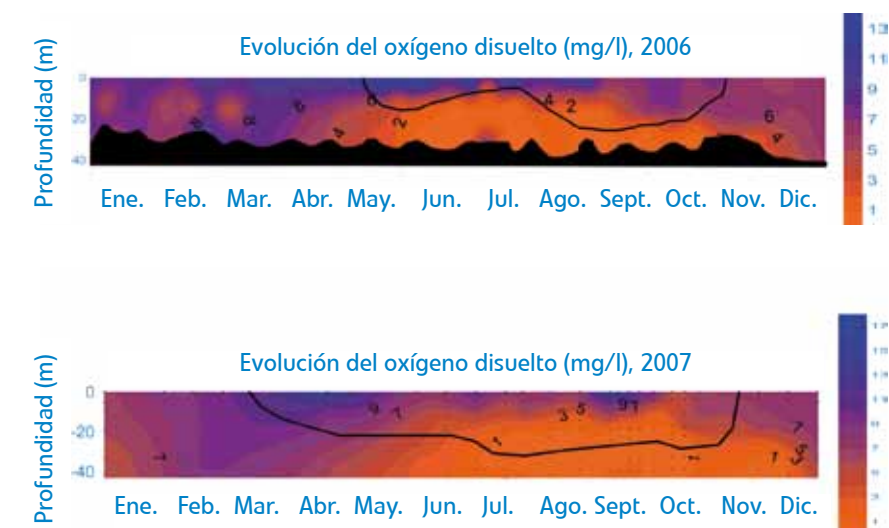
Figuras 40 y 41. Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



Figuras 42 y 43. Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



Figuras 44 y 45. Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



Los embalses con valores de oxígeno más altos son Pedrezuela en 2006, con un máximo en enero y otro en abril que se repite al año siguiente, y Valmayor en 2007 con un máximo en septiembre. Todos ellos son la consecuencia de un bloom de desarrollo algal. Los mínimos se dan en el fondo, en periodo de estratificación, donde las condiciones de anoxia son determinantes.

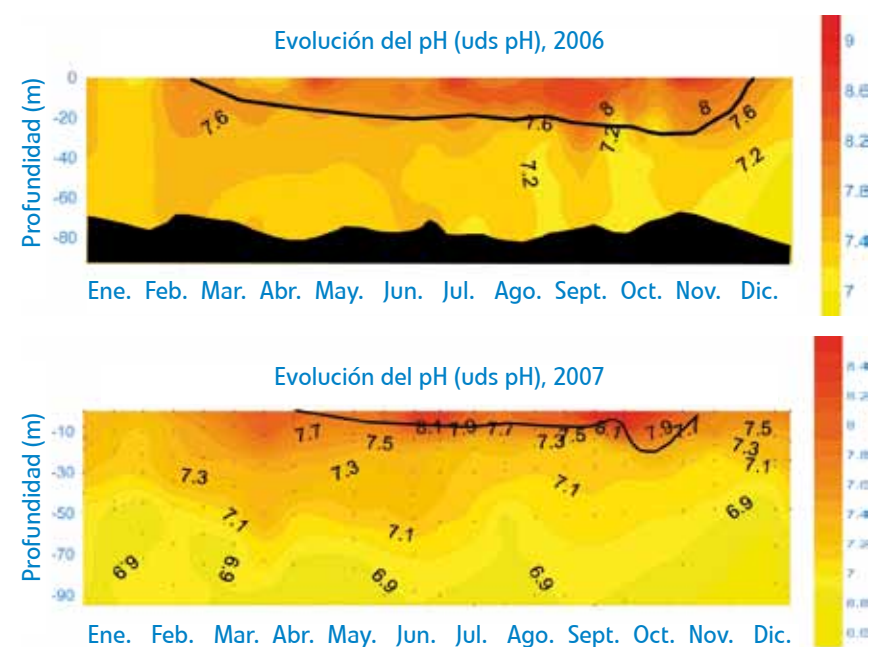
Es en los embalses de Santillana y Pedrezuela, de ambos años, donde el periodo de anoxia es más largo.

En general, los valores más altos se obtienen en épocas de circulación, donde la concentración de hierro y manganeso es menor. Además, en estos periodos invernales el crecimiento algal es más pequeño debido a la menor presencia de nutrientes, luz y temperatura. Por los mismos motivos, los valores más bajos se obtienen al final del periodo de estratificación. El Atazar es el único embalse que no suele presentar anoxia.

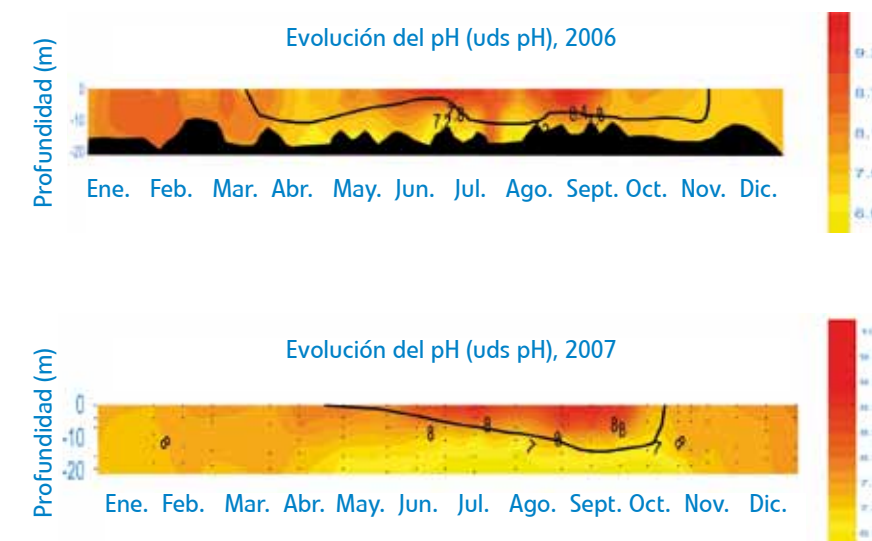
5.1.3. pH

La variación del pH depende principalmente de la del oxígeno disuelto. Esta relación consiste principalmente en que al aumentar el oxígeno disuelto, lo hacen igualmente los valores de pH y disminuye el contenido en CO_2 de las aguas. Esto genera que el equilibrio que existe entre CO_2 con el bicarbonato y el carbonato se desplace, produciendo un incremento del pH y una disminución del bicarbonato (figuras 46 a figura 55).

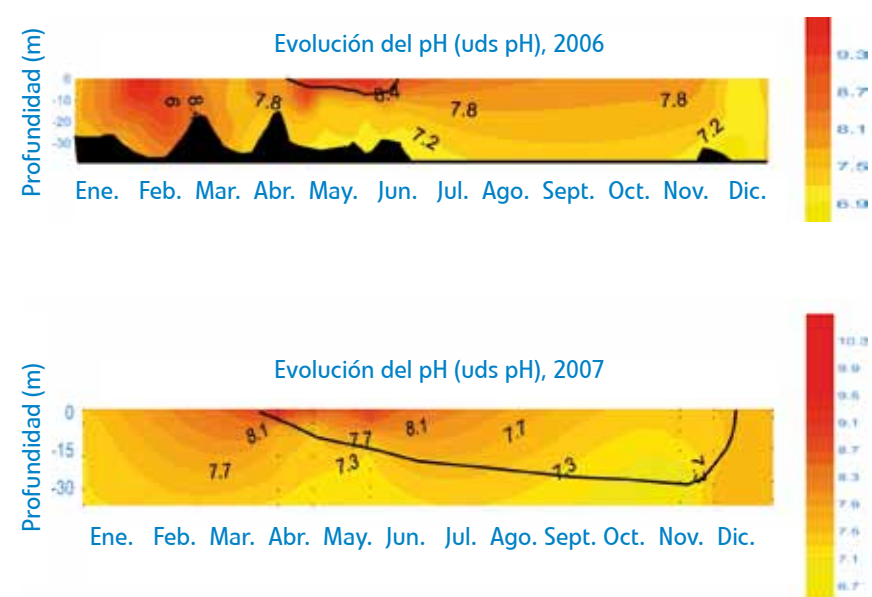
Figuras 46 y 47. Evolución de los valores de pH en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



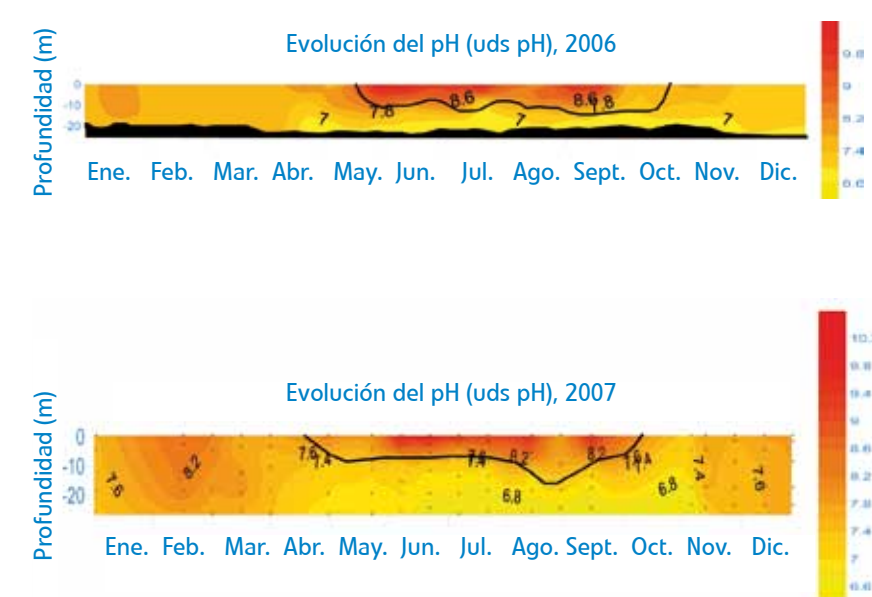
Figuras 50 y 51. Evolución de los valores de pH en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



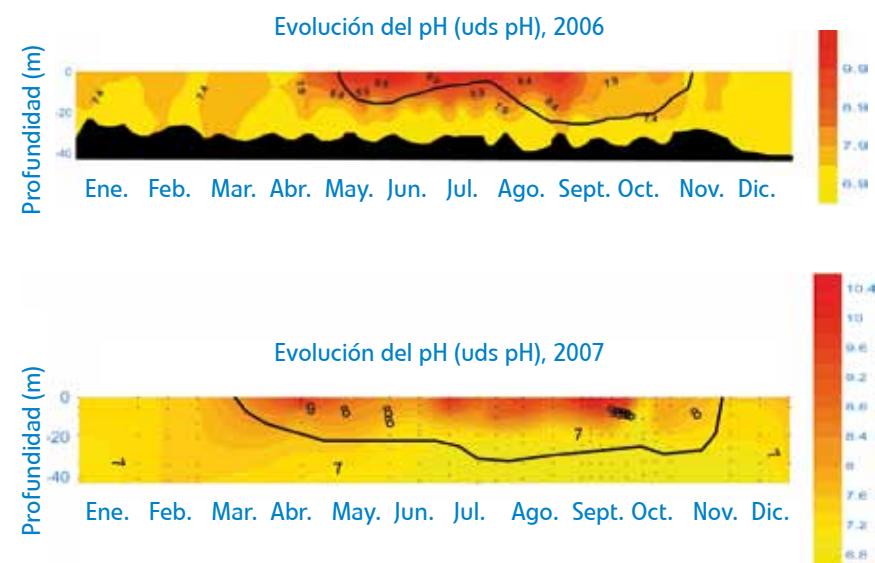
Figuras 48 y 49. Evolución de los valores de pH en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



Figuras 52 y 53. Evolución de los valores de pH en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



Figuras 54 y 55. Evolución de los valores de pH en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



El Atazar muestra en ambos años valores de pH menores que el resto de embalses, dado el menor desarrollo algal de sus aguas. En Pedrezuela los máximos, cercanos a las 10 unidades, se localizan sólo durante el final de la primavera, con el bloom de algas. En el resto de los embalses aparecen más distribuidos a lo largo del periodo de estratificación. En general, durante el año 2006 se registraron valores más altos de pH.

5.1.4. Potencial redox

El potencial redox está íntimamente relacionado con otros dos parámetros: el oxígeno disuelto y el pH. La variación consiste en que al disminuir el oxígeno disuelto y, por lo tanto, aumentar el pH del agua, se producirá una disminución del potencial redox en la época estival (figuras 56 a 65).

Figuras 56 y 57. Evolución del potencial redox en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



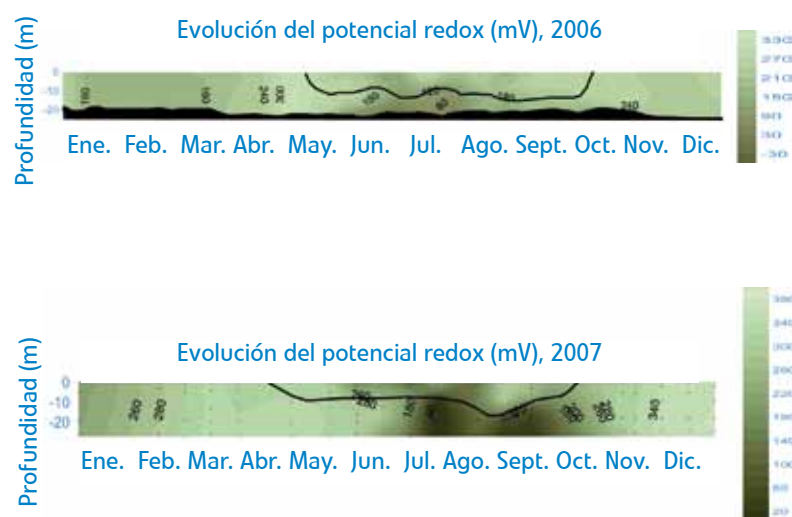
Figuras 58 y 59. Evolución del potencial redox en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



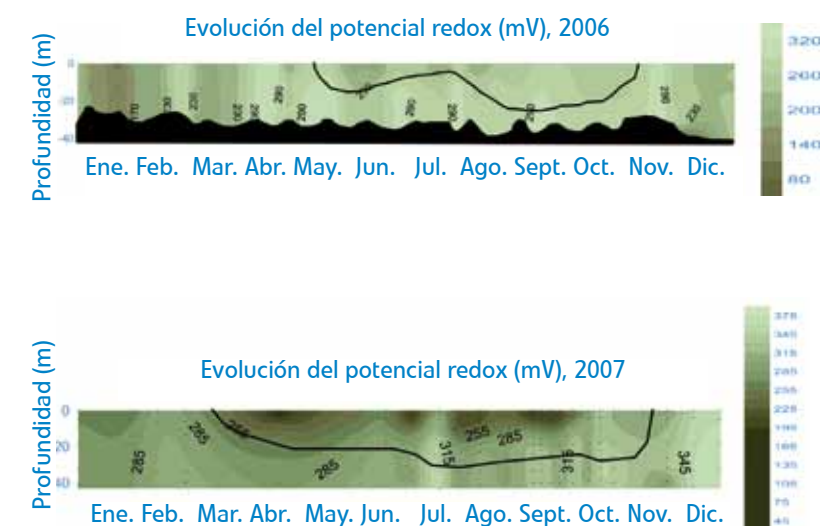
Figuras 60 y 61. Evolución del potencial redox en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



Figuras 62 y 63. Evolución del potencial redox en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



Figuras 64 y 65. Evolución del potencial redox en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



Los mínimos más destacables se dan en el fondo en periodo de estratificación, en Santillana y Pinilla, llegando a valores negativos en el caso del primero, entre -30 y -43 mV (milivoltios). Los valores negativos se producen porque el agotamiento de oxígeno es más acentuado y se generan procesos anaeróbicos, lo que altera el potencial redox. El resto de los embalses presentan menos variación en este parámetro.

5.1.5. Conductividad

La conductividad de una disolución es una expresión numérica de la capacidad para conducir una corriente eléctrica, dependiendo de la concentración total de iones y de la naturaleza de éstos. La medida de la conductividad permite evaluar rápida, pero muy aproximadamente la mineralización global del agua.

La conductividad depende de la temperatura; a mayor temperatura, mayor concentración de sales.

De manera general, las proporciones entre los iones que participan en la conductividad en las aguas continentales son constantes, manteniéndose un equilibrio con los materiales de la cuenca de drenaje (Wetzel, R.G. 1981) y las modificaciones en éstas se deben a factores antrópicos. Se considera que tres son los factores principales en el funcionamiento de los procesos químicos de las aguas; la precipitación atmosférica, la mineralización del sustrato rocoso, y los procesos de evaporación y cristalización (Gibbs, R.J., 1970 y 1992).

Sin embargo, se pueden dar variaciones locales, e incluso temporales, según tengamos años húmedos o secos (J. Armengol; J. Catalan; N. Gabellone; D. Jaume; E. Martí; J.A. Morgui; J. Nolla; J. Peñuelas; M. real; J.L. Riera; S. Sabater; F. Sabater; J. Toja, 1990 y J. Armengol; J.L. Riera; J.A. Morgue, 1991), diluyendo o

concentrando el contenido salino de las aguas. La abundancia en la cuenca, la solubilidad del agua y la actividad biogeoquímica también pueden considerarse que afectan directamente las relaciones iónicas (Palau, A. 1988).

Cuando se produce la fotosíntesis en la zona fótica, al modificarse el equilibrio carbónico carbonato se origina la precipitación del carbonato cálcico junto al fósforo presente, formando hidroxiapatito. Este proceso supone una descalcificación del epilimnion. En el hipolimnion, al disminuir el potencial redox por los procesos de reducción que ocurren, se resolubiliza parte del carbonato, aumentando la conductividad, mientras que otra parte permanece secuestrada, insolubilizada, en el sedimento.

Así, en los embalses donde se produce un importante desarrollo algal al inicio del ciclo, se observa una paulatina disminución de la conductividad desde la superficie hacia el fondo durante el período estival. El inicio de la estratificación produce una disminución paulatina de la conductividad en los niveles superiores de la columna de agua, para -al finalizar ésta- aumentar de nuevo en la zona hipolimnética debido en parte, a la liberación de calcio y alcalinidad (sobre todo en las cercanías del sedimento, ya que se produce bicarbonato amónico por la acción bacteriana) en estos niveles profundos y de bajo potencial redox, (Wetzel, R.G. 1981). Las variaciones de alcalinidad afectan sobremanera a las alteraciones del pH, amortiguadas por el sistema tampón que ejercen estas sales (figuras 66 a 75).

La conductividad en el Atazar es mucho menor que en otros embalses, con valores máximos en el fondo, debido a un aumento de sustancias disueltas como el hierro o los nutrientes y algunos picos sobre la termoclina, debido a la mayor proliferación de algas. En Pinilla, Santillana y Valmayor, el hierro es también el responsable de los máximos en el fondo al final de periodo de estratificación. Algún máximo relativo en superficie, debido a un aumento de la población algal, se dan en Santillana en marzo de 2006 y en septiembre de 2007 en El Atazar.

La disponibilidad de altos contenidos en carbonatos en las aguas, provenientes de la condición geológica del terreno sobre el que discurre, permite la acción tamponante de éste sobre el fósforo, reduciendo el riesgo de eutrofización frente a condiciones de aportes similares en las cuencas de naturaleza silícica como son las nuestras.

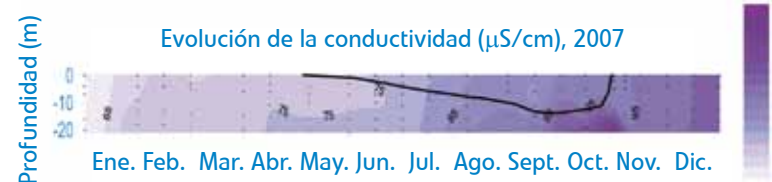
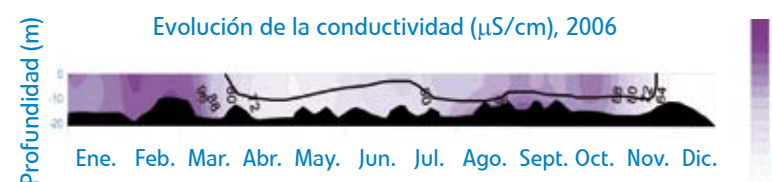
Figuras 66 y 67. Evolución de la conductividad del embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



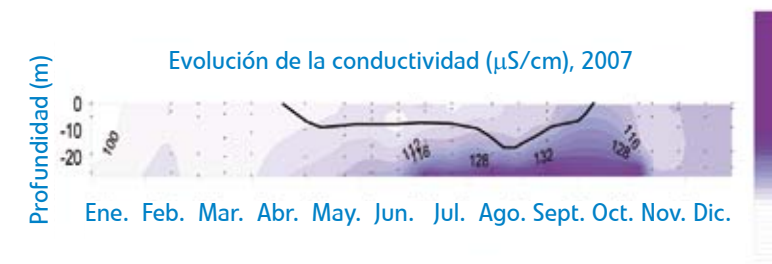
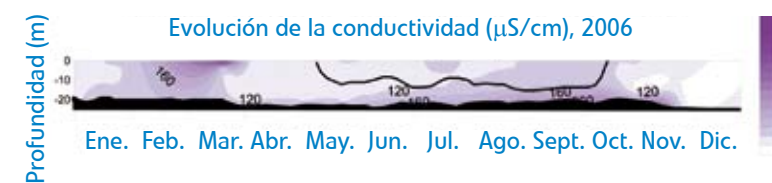
Figuras 68 y 69. Evolución de la conductividad del embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



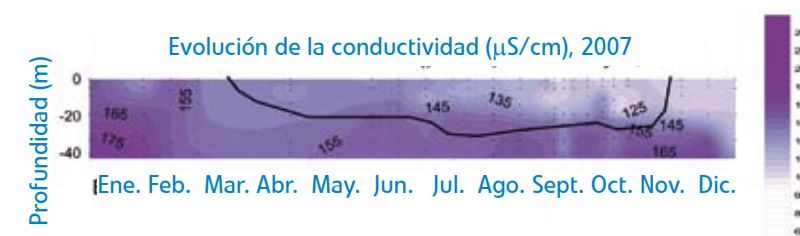
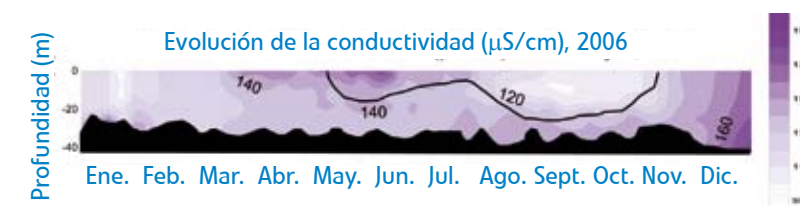
Figuras 70 y 71. Evolución de la conductividad del embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



Figuras 72 y 73. Evolución de la conductividad del embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



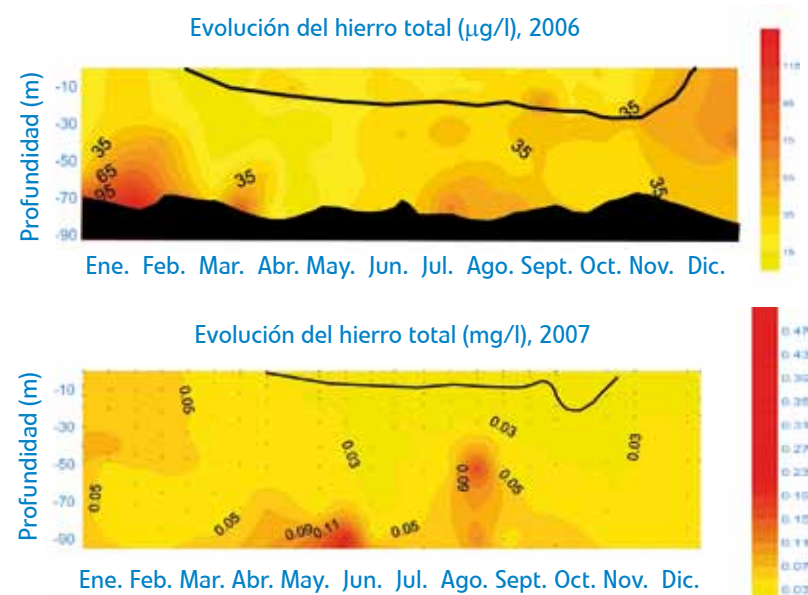
Figuras 74 y 75. Evolución de la conductividad del embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



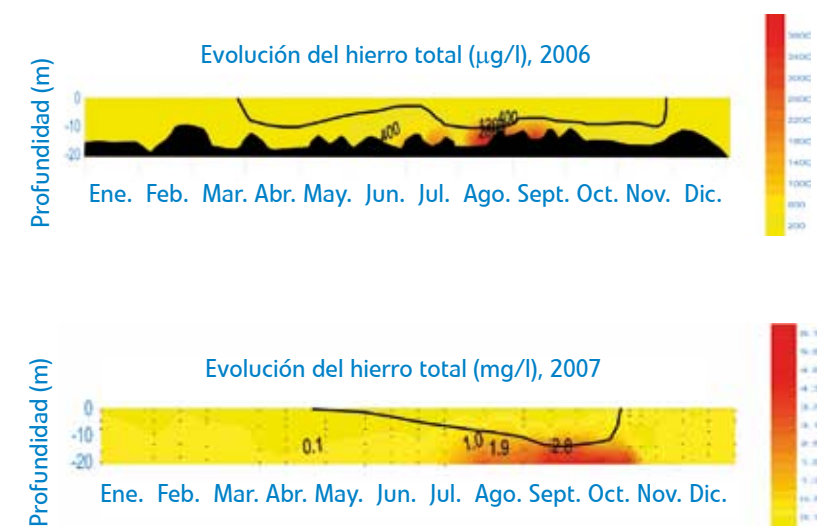
5.1.6 Hierro total

El hierro de origen tanto alóctono como autóctono, procede básicamente de la diagénesis y lixiviación mineral, así como de zonas con elevado contenido en materia orgánica con sustancias húmicas, taninos y ligninas (figuras 76 a 85). Hay que recordar que, como anteriormente se expuso, las concentraciones de hierro total y manganeso están expresadas en miligramos por litro en el 2007 y en microgramos por litro para 2006.

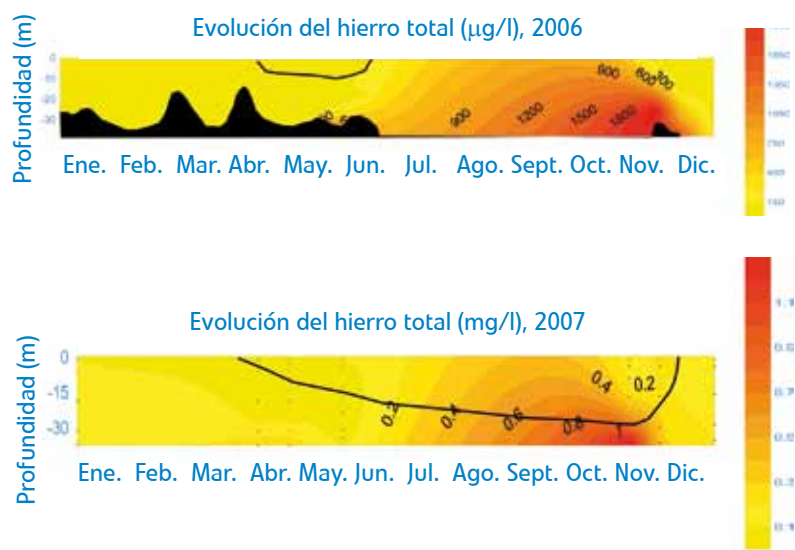
Figuras 76 y 77. Evolución del hierro total del embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



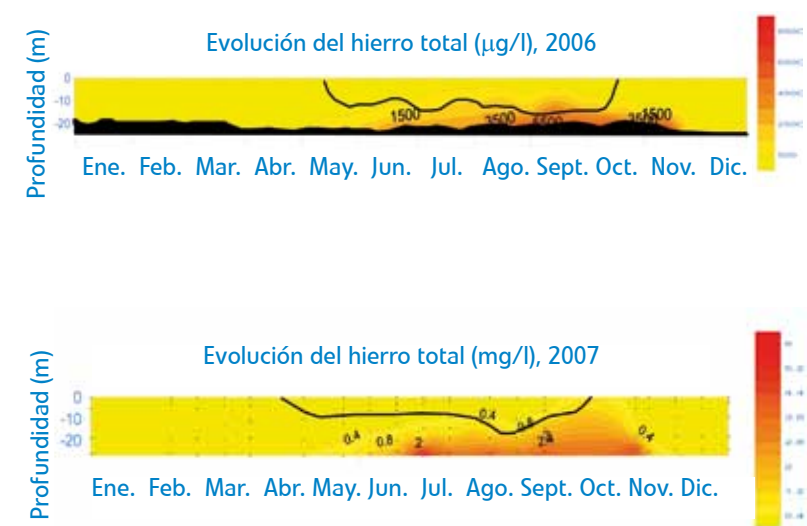
Figuras 80 y 81. Evolución del hierro total del embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



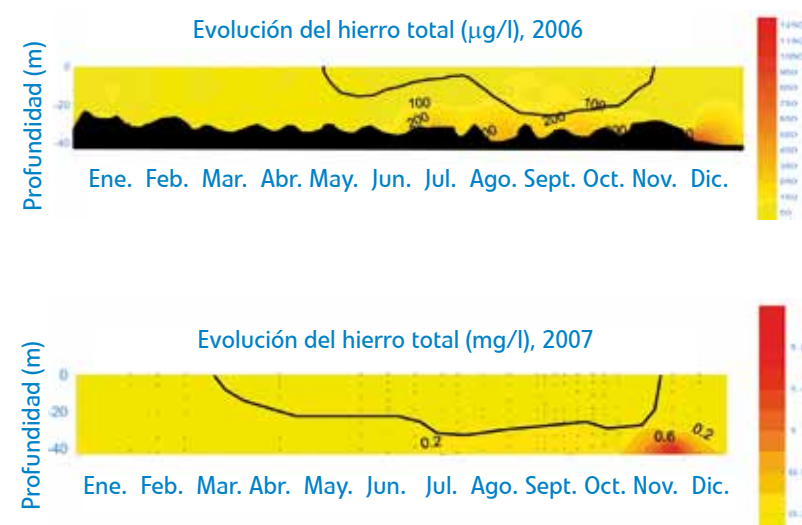
Figuras 78 y 79. Evolución del hierro total del embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



Figuras 82 y 83. Evolución del hierro total del embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



Figuras 84 y 85. Evolución del hierro total del embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



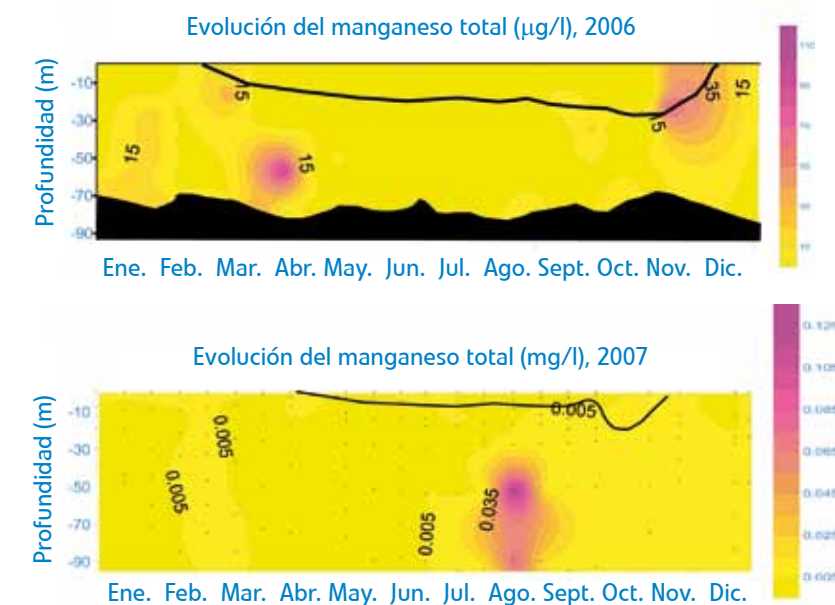
Los máximos de hierro se localizan en el fondo de todos los embalses con excepción de El Atazar y se agudizan al final de la época de estratificación. Son especialmente intensos en Santillana. El Atazar presenta valores muy bajos de hierro durante los dos años, superando apenas los 100 microgramos por litro.

5.1.7. Manganese

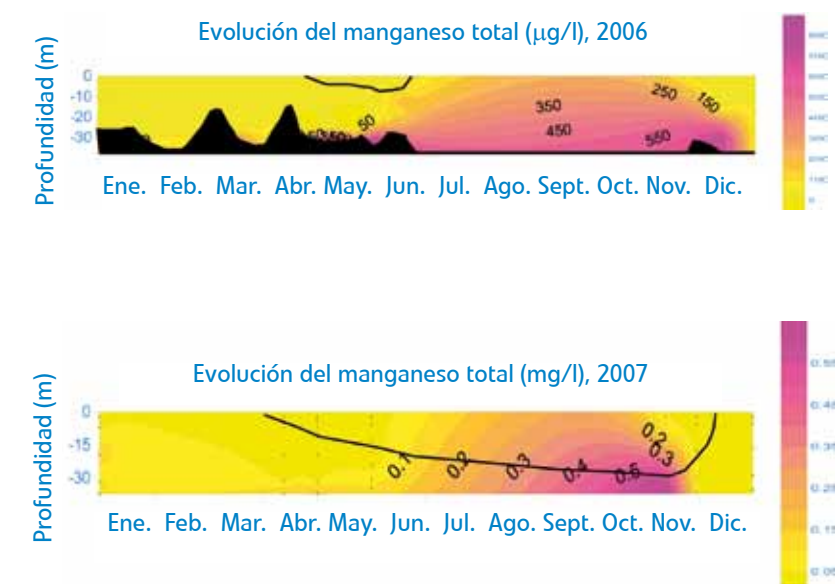
El manganeso aparece con relativa importancia en zonas alcalinas formando óxidos (Wetzel, R.G. 1981). (Ver figuras 86 a 94).

Su variación, tal y como hemos indicado anteriormente, es similar a la del hierro, aunque sus valores de equilibrio redox son más elevados y sus coeficientes de oxidación son menores. Esto, indica que la migración del manganeso al sedimento se produce con potenciales redox mayores (Balistreri, L.S., J.W. Murray, B. Paul, 1992).

Figuras 86 y 87. Evolución del manganeso en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



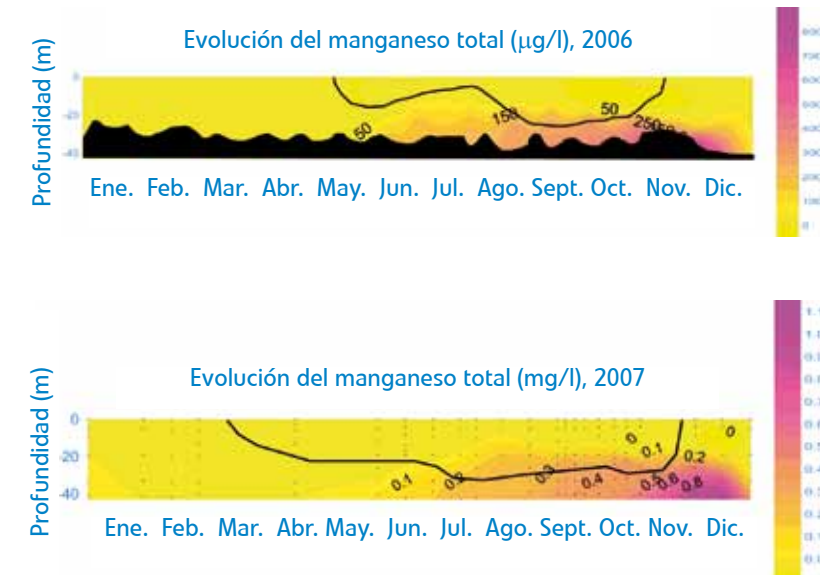
Figuras 88 y 89. Evolución del manganeso en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



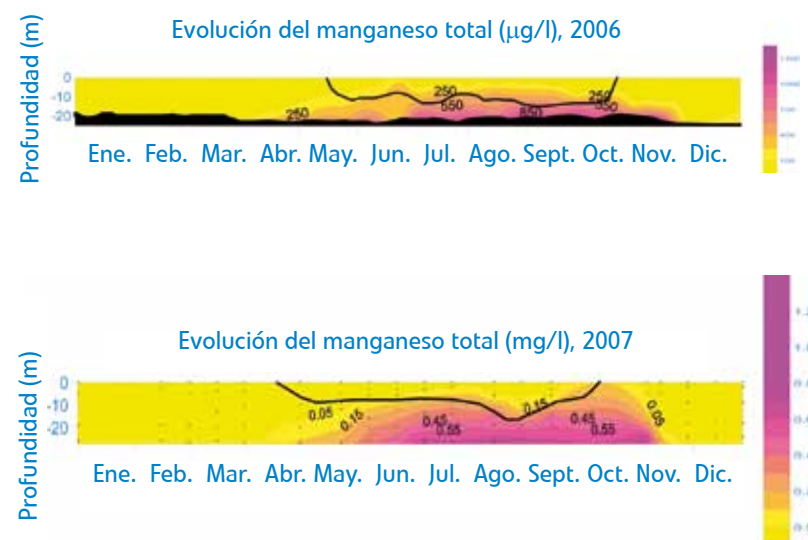
Figuras 90 y 91. Evolución del manganeso en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



Figuras 94 y 95. Evolución del manganeso en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



Figuras 92 y 93. Evolución del manganeso en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



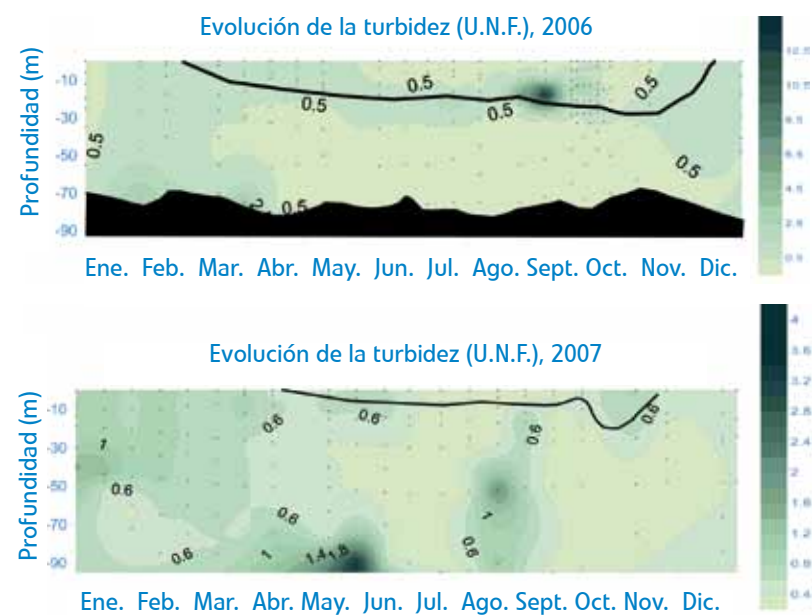
El manganeso sigue un patrón semejante al del hierro, siendo muy bajo en El Atazar, donde apenas supera los 100 microgramos por litro. En el resto de los embalses los máximos se localizan en el fondo, especialmente al final de la estratificación. Son máximos más tardíos en Valmayor y Pedrezuela y más intensos en Santillana.

5.1.8. Turbidez y disco de Secchi

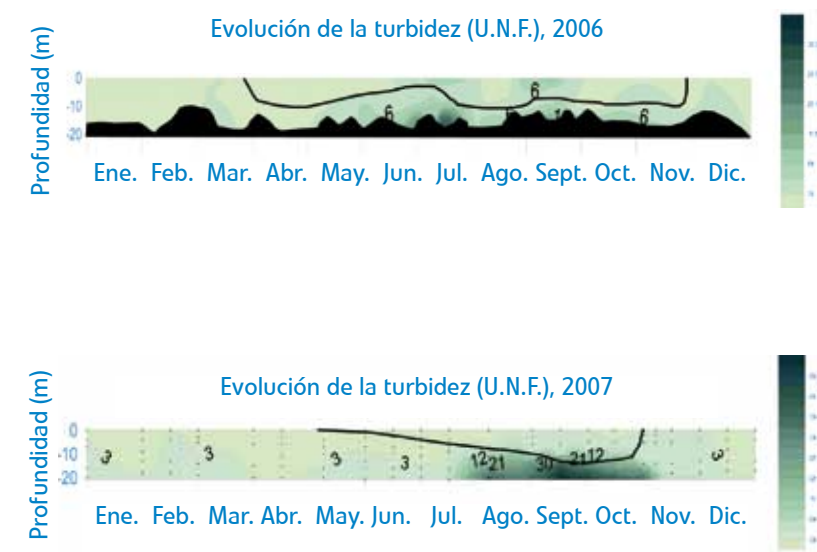
En la evolución de esta variable influyen tanto el ciclo de los metales, especialmente hierro y manganeso, como la variación de las clorofilas (figuras 96 a 105).

En líneas generales, si observamos los gráficos de evolución de los distintos embalses se aprecia el aumento de la turbidez al finalizar la estratificación térmica. Esto se debe a que el hierro, precipitado como fosfatos férricos y cálcicos se resolubiliza al haber potenciales electronegativos y medios ácidos, lo que se traduce en un aumento de la turbidez. En el hipolimnion, la turbidez se debe principalmente a los procesos de resuspensión que se producen en los sedimentos, al darse situaciones de anoxia. La turbidez también se modifica con la clorofila, directamente relacionada con la concentración de algas. Así, a mayor concentración de algas mayor turbidez, sobre todo en la zona fótica del embalse.

Figuras 96 y 97. Evolución de la turbidez en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



Figuras 100 y 101. Evolución de la turbidez en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



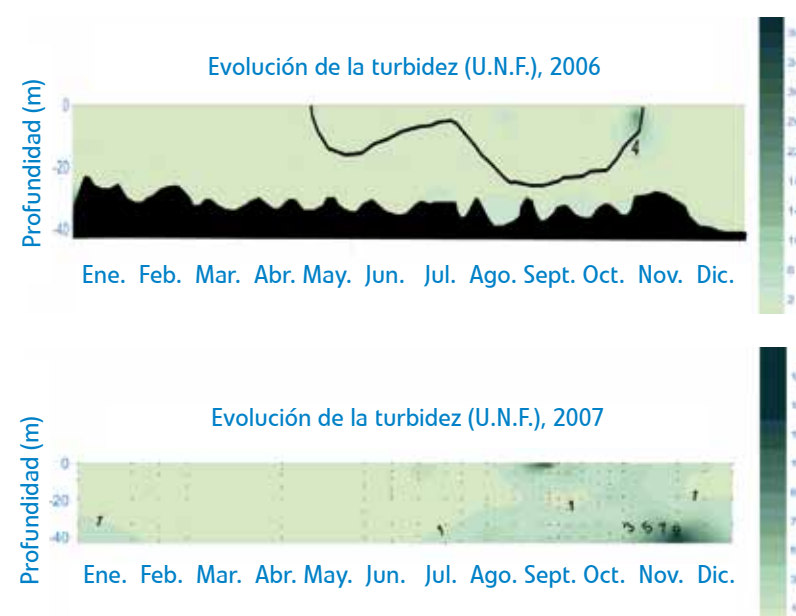
Figuras 98 y 99. Evolución del manganeso en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



Figuras 102 y 103. Evolución del manganeso en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



Figuras 104 y 105. Evolución del manganeso en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



El Atazar presenta unos valores muy bajos de turbidez, motivados posiblemente por tratarse del último embalse de la cadena, actuando los anteriores (Pinilla, Riosequillo, Puentes Viejas y El Villar) como decantadores naturales. Presenta pequeños máximos en el fondo, debido a depósitos de hierro o sobre la termoclina, debido a crecimientos puntuales de algas. El resto de los embalses tienen máximos de turbidez más importantes en el fondo al final del periodo de estratificación, coincidiendo con los máximos de hierro y manganeso. En Valmayor, a finales de verano del 2007, debido a un aumento del desarrollo algal, se localiza un máximo de turbidez.

La profundidad de la visibilidad del disco de Secchi es otra variable íntimamente relacionada con la turbidez. Depende de la extinción biótica, de la turbidez mineral y de la coloración del agua por sustancias húmicas disueltas. En general, se acepta "grosso modo" que el doble de dicha profundidad es aquella a la que deja de haber luz en una masa de agua. Por eso, la transparencia de un agua multiplicada por un coeficiente de 2 ó de 2,7 (según autores) es una buena aproximación del espesor de la capa fótica o iluminada. A esta profundidad, se considera que la producción de oxígeno por fotosíntesis, equilibra el consumo por respiración y coincide con el nivel al que se recibe el uno por ciento de la energía luminosa que llega a la superficie (nivel de compensación). Este punto de compensación señala, además, el punto límite de profundidad donde se desarrollarían las algas.

En el caso de El Atazar, los valores del disco de Secchi, pueden alcanzar hasta 13 metros en 2007, siendo el mínimo, en ambos años, de 3 metros. Es, con diferencia, el embalse que mejores condiciones lumínicas presenta. Los demás embalses presentan mínimos de un metro y pueden alcanzar, en condiciones favorables, hasta 7 metros en Valmayor y 8 en Pedrezuela, en el año 2007, pero generalmente se sitúan entre los 2 y los 4 metros de profundidad (tabla 6).

Tabla 6. Valores del disco de Secchi en los embalses de estudio en 2006 y 2007

Embalse	El Atazar		Pinilla		Pedrezuela		Santillana		Valmayor	
Año	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Máximo	9,80	13,00	3,80	4,00	3,00	8,00	2,40	4,00	3,70	7,00
Mínimo	3,00	3,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,10	1,00	1,40	1,00
Promedio	6,80	7,00	1,80	2,00	1,99	3,00	1,67	2,00	2,38	3,00
Nº casos	25	22	27	24	8	7	17	35	25	25

En general, los valores más altos se obtienen en épocas de circulación, donde la concentración de hierro y manganeso es menor. Además, en estos periodos invernales, el crecimiento algal es más pequeño debido a la menor presencia de nutrientes, luz y temperatura. Por los mismos motivos, los valores más bajos se obtienen al final del periodo de estratificación.

5.1.9. Sales minerales

5.1.9.1. Nitrógeno

Los compuestos de nitrógeno son, junto con los de fósforo, los nutrientes que suelen limitar el desarrollo algal, razón en la que radica su importancia como indicadores de la eutrofia de los embalses. Su origen en los embalses puede deberse a la precipitación atmosférica, a la fijación, a la descomposición de compuestos húmicos y abonado, o a diferentes aportaciones.

Los aportes más importantes suelen ser: el drenaje del agua de lluvia, los efluentes de las estaciones de tratamiento de agua (por ejemplo, las estaciones depuradoras de aguas residuales cercanas a varios embalses que incluso vierten directamente a ellos, como son el caso de Pinilla y Pedrezuela), los usos del territorio, sobre todo industrias, ganadería y agricultura así como el tipo de población que se asienta cercana a los embalses. Debido a que la mayoría de estas fuentes contaminantes son dispersas, la tarea de realizar estudios para la estimación de los aportes se ve dificultada.

En un embalse se puede asegurar que el ciclo del nitrógeno es de naturaleza microbiana, y se encuentra marcado por los procesos de desnitrificación y nitrificación, interviniendo bacterias de muy diversos tipos y requisitos metabólicos, (Gale P.M., Reddy K.R., Graetz D.A. 1992).

Durante el ciclo anual, se dan unas cantidades importantes de nitrato en la columna de agua al inicio de la estratificación, sin distribución aparente (por eso no se ha incluido en las figuras) ya que el amonio se oxida rápidamente. Al producirse el desarrollo algal de primavera, el nitrato normalmente disminuye su concentración, principalmente en la zona trofótica, aunque esto no ocurre siempre en los embalses del estudio, sobre todo cuando los máximos algales se desarrollan tempranamente.

En los niveles de mayor profundidad, con escasez de oxígeno, se produce la desnitrificación del nitrato a la vez que ocurre una amonificación en esta zona trofótica, hipóxica, principalmente al finalizar la estratificación.

Si el aporte de nitrógeno (en relación con el de los fosfatos) no se recupera, o se retira nitrógeno del medio (por desarrollo de macrófitos) y se mantiene suficiente concentración de fosfatos, puede darse un proceso de sustitución de especies en el plancton, predominando aquellas que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Nos referimos a las cianofíceas, cuya capacidad de asimilación se ve inhibida si en el medio aparece nitrato o amonio. En el medio acuático también existen bacterias heterótrofas capaces de fijar nitrógeno, tanto en el agua como en el sedimento.

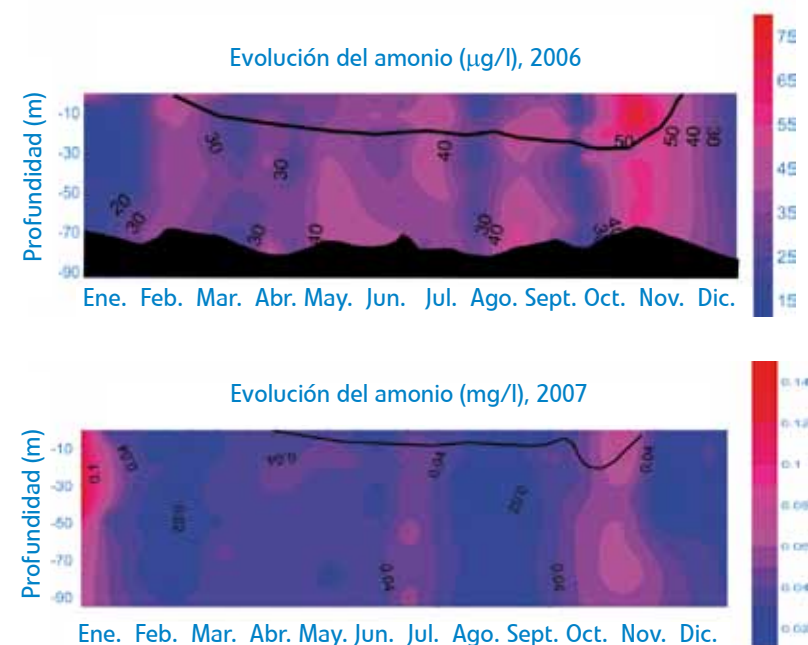
Con la llegada del período de mezcla se recuperan los niveles de nitrato en la columna de agua, oxidándose rápidamente el amonio presente en las aguas.

El amonio (figuras 106 a 115), resulta un producto final de la descomposición de la materia orgánica llevada a cabo por bacterias heterótrofas a partir de proteínas y compuestos nitrogenados, así como un producto de excreción del zooplancton y vertebrados acuáticos. Su liberación en el medio acuático está asociada normalmente con procesos trofocíticos y de carácter reductor, al mismo tiempo que se incrementa la concentración de hierro disuelto y de la alcalinidad (Balistrieri L.S; Murray J.W; Paul B; 1992). Hay que recordar, como anteriormente se expuso, que las concentraciones de amonio y ortofosfato están expresadas en miligramos por litro (mg/l) en 2007, pero en microgramos por litro ($\mu\text{g/l}$) en el 2006.

Figuras 108 y 109. Evolución del amonio en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



Figuras 106 y 107. Evolución del amonio en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



Figuras 110 y 111. Evolución del amonio en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



Figuras 112 y 113. Evolución del amonio en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



El amonio sigue un patrón de evolución semejante al del hierro y el manganeso. Por un lado, en El Atazar se dan valores muy bajos que apenas llegan a $1,2 \mu\text{g/l}$. En el resto de los embalses se localizan máximos en el fondo durante el periodo de estratificación (Pinilla y Santillana) o al final del mismo (Pedrezuela y Valmayor). En el caso de Valmayor, la presencia significativa de amonio en profundidad puede llegar a mantenerse hasta el mes de enero. Son especialmente elevados los valores de Santillana que llegan a superar los $12 \mu\text{g/l}$ en 2006.

5.1.9.2. Fósforo

El fósforo, debido a su participación en la composición del plancton en la proporción de 1 parte por cada 100 partes de carbono y 15 de nitrógeno (P/C: 1/100 y P/N: 1/15), resulta en la mayoría de los casos el nutriente limitante a tener en cuenta para detener el crecimiento algal. Su eliminación o reducción en las aguas supondría una mejora del estatus trófico, para lo que se estudia su capacidad de unión y precipitación con sales de hierro (Cooke G.D.; Welch E.B.; Martin A.B.; Fulmer D.G.; Hyde J.B.; Schriever G.D. 1993), (Quaak, M.; Does J.V.; Boers P.; Vlugt J.V. 1993) y (Boers P.; Does J.V.; Quaak M.; Vlugt J.V. 1994). También resulta importante el hecho de que es introducido por material forestal y polvo de carreteras circundantes (Tellería L.J. 1984).

Su ciclo es rápido y complejo. Su agotamiento puede darse en algunas ocasiones debido a que las algas llegan a incorporar más fósforo del que precisan, acumulándolo en su interior. La intensidad de la precipitación depende de la concentración de ortofosfato en las aguas, (Lijklema L. 1994). También puede precipitar con el hierro oxidado, constituyendo complejos de fosfato férrico e insolubilizando el fósforo, (Lopez C.; González J.F.; Curbelo R. 1993). Por si esto fuera poco, el fósforo sufre una adsorción sobre superficie, a pH bajo, principalmente sobre minerales arcillosos, (Urrutia, J. I. 1994).

Este compuesto es importante para la determinación del estado de calidad de las aguas de los embalses, sobre todo en lo referente a la eutrofia al ser, en la mayoría de los casos, el nutriente limitante en el crecimiento del fitoplancton, con relaciones de P/C: 1/100 y P/N: 1/15.

Su origen radica principalmente en los vertidos de las estaciones depuradoras de aguas residuales, la agricultura, así como en los detergentes utilizados en limpieza. Existen otros aportes como son los introducidos por la lixiviación de materiales forestales y el polvo de las carreteras cercanas a los embalses.

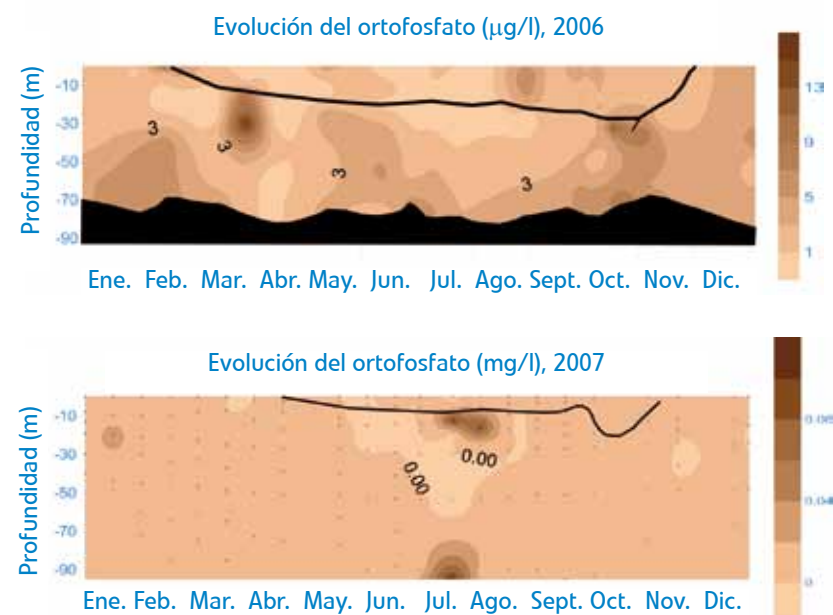
Su concentración depende fundamentalmente del oxígeno disuelto y del pH del medio y, por lo tanto, del potencial redox. En cambio, en periodos de anaerobiosis la concentración de fósforo aumenta notablemente debido a que los valores de potencial redox bajos potencian su resolubilización al medio acuático, lo que explica el incremento de estas sustancias al terminar el periodo de estratificación. Este fenómeno se ve favorecido en los embalses menos profundos, en los que se suelen dar zonas anóxicas y por lo tanto, potenciales redox negativos, por lo que suelen ser más proclives a la eutrofia.

La disminución de la concentración del fósforo en la superficie de las aguas se hace más patente con el transcurso de la estratificación, hasta alcanzar el período de mezcla, donde los aportes de lluvias y la resolubilización incrementan el contenido de fósforo en las aguas, (figuras 116 a 125).

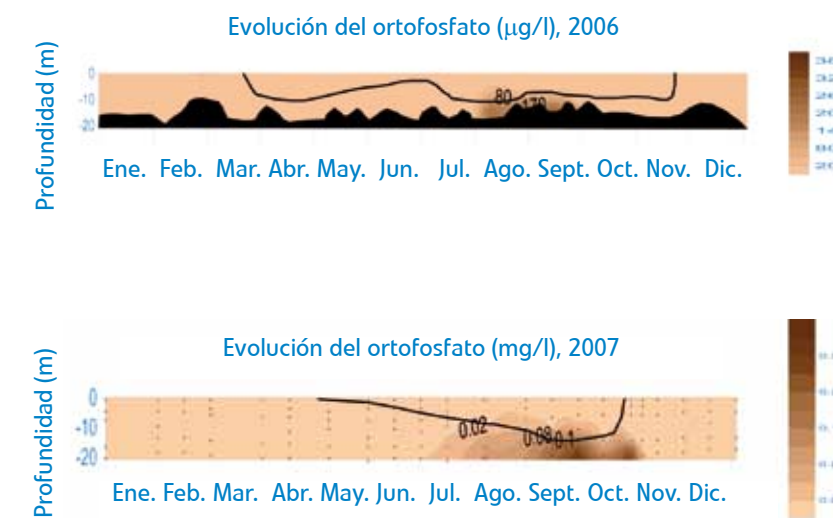
Figuras 114 y 115. Evolución del amonio en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



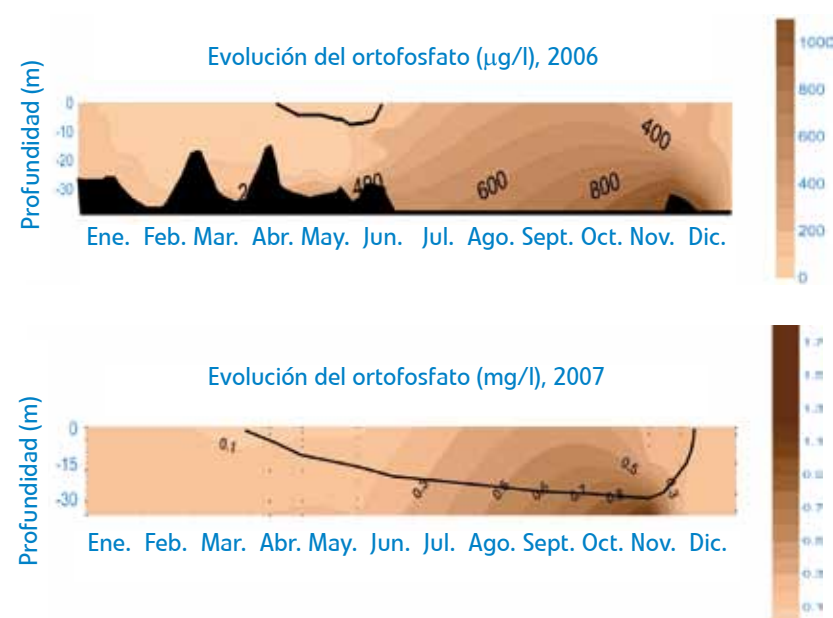
Figuras 116 y 117. Evolución del ortofosfato en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



Figuras 120 y 121. Evolución del ortofosfato en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



Figuras 118 y 119. Evolución del ortofosfato en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



Figuras 122 y 123. Evolución del ortofosfato en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



Figuras 124 y 125. Evolución del ortofosfato en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007



El ortofosfato tiene una evolución semejante a la del amonio. En El Atazar se dan valores muy bajos, con pequeños máximos bajo la termoclina, en ambos años. En el resto de los embalses se localizan máximos en el fondo durante el periodo de estratificación (Pinilla y Santillana) o al finalizarse (Pedrezuela y Valmayor). En el caso de Valmayor, los valores son más homogéneos, registrándose valores un poco más altos que en otros embalses durante el periodo de mezcla. Son especialmente elevados los valores de Santillana, que llegan a superar los 3,1 miligramos por litro en 2006 en el fondo del embalse.

5.2. Caracterización biológica

5.2.1. La clorofila y las algas

La evolución de las concentraciones de clorofila está directamente relacionada con la intensidad de radiación solar, la cantidad de nutrientes limitantes como son nitrógeno y fósforo, la temperatura y la profundidad.

Para un desarrollo óptimo de las algas, son necesarios aportes suficientes tanto de macronutrientes como de micronutrientes. En el caso del fitoplancton, la fuente de carbono no es limitante, puesto que se obtiene a partir del CO_2 disuelto en el agua, siéndolo en cambio el nitrógeno y el fósforo. Así, se puede observar que al aumentar la radiación solar y comenzar la estratificación térmica, aumenta la cantidad de clorofila, hasta que la relación nitrógeno/fósforo no es suficiente para aportar las cantidades requeridas por el fitoplancton, siendo los compuestos nitrogenados limitantes. En este momento, proliferan las especies capaces de fijar nitrógeno atmosférico, como son las cianobacterias nostocales, volviendo a aumentar la concentración de clorofilas.

Finalmente, con la llegada del nuevo periodo de mezcla, vuelve a darse una relación nitrógeno/fósforo suficiente para el desarrollo de la mayoría del fitoplancton. En este caso, el aumento de clorofila no es muy notable, puesto que la intensidad de la radiación solar no es tan importante.

A nivel local, la influencia de la morfometría del embalse, geología de la cuenca, o posición de la toma de agua en la columna de ésta, afecta también a la caracterización del plancton en las aguas embalsadas (Armengol J. 1982; Armengol J.; Sabater F.; Riera J.L.; Puig M.A. 1988).

En todo caso, la actividad humana sobre los embalses, acelera los procesos de eutrofización, evidenciados por el incremento de la biomasa algal en las aguas (Zakova Z. 1989).

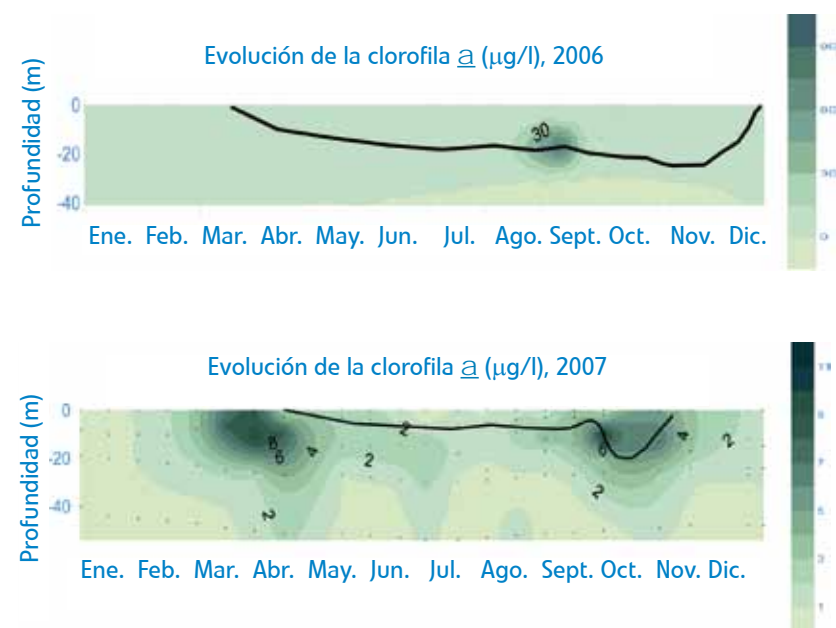
Así pues, teniendo en cuenta esta íntima relación entre el nivel trófico y el contenido y composición planctónico de los embalses, podemos establecer una tipología de éstos en relación a las estructuras, evolución y sucesión del fito y zooplancton (Brooks J.L. 1969), (Granf G.G., Oliver R.L. 1982), (Trifonova I.S. 1989), (Royle, R.N., King R.J. 1992), como más adelante se desarrollará.

Por lo que a Canal de Isabel II afecta, el objeto de estudio del fitoplancton, se lleva a cabo atendiendo a los organismos más numerosos y a los que mayores problemas pueden dar en el abastecimiento por olor, sabor o dificultad para la creación de flóculos, pero con especial atención a los productores de cianotoxinas.

La cuantificación de la clorofila a (figuras 126 a 135) resulta un buen estimador de la biomasa algal y, por tanto, del estado trófico de un embalse (Margalef R., 1983; Wetzel R.G. 1983).

El contenido en pigmentos fotosintéticos como estimador indirecto de la biomasa algal, presenta dos momentos de máxima importancia cuantitativa durante el ciclo anual. Normalmente, uno de estos dos máximos coincide con un bloom primaveral ocasionado por el aumento de la estabilidad en las aguas, junto a unos buenos niveles de nutrientes aportados tras el período de lluvias y al incremento de las horas de insolación. El otro aumento de los niveles de clorofila se suele apreciar al finalizar el período de estratificación, en el otoño, cuando la mezcla de las aguas o las lluvias aportan elementos nutritivos y la insolación aún tiene importancia.

Figuras 126 y 127. Evolución de la clorofila a en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007



Figuras 130 y 131. Evolución de la clorofila a en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007



Figuras 128 y 129. Evolución de la clorofila a en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007



Figuras 132 y 133. Evolución de la clorofila a en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007



Figuras 134 y 135. Evolución de la clorofila a en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007

La clorofila a tiene valores especialmente bajos en El Atazar, con máximos sobre la termoclina a finales de verano en los dos años y en primavera en 2007, debido a que se dieron condiciones propicias para un mayor crecimiento algal. En Pedrezuela se dan los máximos a inicios de la primavera, aunque no se dispone de datos en el periodo estival (por cierre de abastecimiento no se tomaron muestras del embalse en ninguno de los veranos) para determinar la presencia de máximos. En Pinilla los valores registrados son más homogéneos, con valores más altos en el periodo de muestra pero con máximos sobre la termoclina a finales de la estratificación del embalse. Algo similar le ocurre a Santillana, que además presenta altos valores en febrero de 2007. En Valmayor sólo se localizan máximos por encima de la termoclina.

5.2.2. Problemas producidos por las algas en el abastecimiento

Las algas, además de las sustancias metabólicas que segregan, generadoras de sabores y olores, pueden llegar a ser perjudiciales ya que las cianofíceas emiten sustancias fenólicas, con el riesgo de formar compuestos clorados en la desinfección de las aguas con cloro y porque después de su muerte, aparecen gustos y olores en su descomposición, bien provenientes de las mismas algas muertas o de la actividad de las bacterias y de los actinomicetos que se nutren de ellas. En esta actividad bacteriana se pueden producir compuestos azufrados como metilmercaptanos, isobutilmercaptanos, dimetilsulfuro, etc.

Los olores que provienen de las algas son más variados que los producidos por los actinomicetos, habiéndose citado más de 50 especies de algas capaces de producir sabores y olores en el agua. Las sustancias productoras de sabores y olores son puestas en libertad durante la fase de crecimiento de las células de las algas, habiéndose identificado metabolitos como alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y ácidos.

5.2.2.1. Las cianofíceas

Un problema común a todos los embalses consiste en mantener un equilibrio dinámico entre las relaciones atómicas del carbono, nitrógeno y fósforo de las aguas. Se supone que las algas necesitan para su desarrollo unas relaciones (carbono : nitrógeno : fósforo) C:N:P del orden de 100:16:1, respectivamente, (Redfield A.C., 1934). Aunque debe tomarse con cierto recelo el concepto de elemento limitante, debido a las diferencias nutricionales existentes entre los organismos, e incluso a las proporciones relativas, la relación varía ligeramente. Lo cierto es que estos valores pueden ser tomados como una buena referencia para determinar el contenido en estos elementos de las células algales. Cualquier desviación hacia el fósforo (entradas por escorrentía, vertidos, fuertes lluvias, etc) puede implicar una alteración en las proporciones, de tal forma que el elemento limitante sea el nitrógeno, y los organismos capaces de obtenerlo o fijarlo, sean los más eficientes en ese momento y se desarrollan sobre el resto.

Las cianofíceas son organismos no deseados en las aguas para el suministro y su desarrollo puede ser debido a un proceso de sustitución natural de los diferentes grupos de algas que aparecen en los embalses, o como consecuencia de un desequilibrio de las relaciones de nitrógeno y fósforo a favor de este último, por su capacidad para incorporar nitrógeno atmosférico, en clara ventaja frente al resto de organismos, lo que les puede configurar una estructura de "plaga" para el resto de componentes del fitoplancton durante los periodos de desarrollo. Según algunos autores (Granf G.G., Oliver R.L., 1982), su dominancia también puede ser debida a su capacidad de migración a la picnoclina para la obtención de nutrientes. Por otro lado, (Gamrasmi M., 1986) las cianofíceas producen sustancias inhibitoras para el desarrollo de organismos competencia, entre las que podemos mencionar:

- Geosmina y mucidona
- 2 Metil iso borneol
- Cadina 4 n 1 ol
- Selina
- Mercaptanos, sulfuros de dimetilo, etc.

Otro de los problemas con que nos podemos encontrar por el desarrollo de cianofíceas, aunque no exclusivamente por ellas ya que otras algas se pueden ver implicadas en estos procesos, es la deposición de limos en las conducciones de agua, afecciones por la corrosión en las tuberías, coloración en las aguas, interferencia en los procesos de coagulación y persistencia en la distribución, así como producción de sustancias tóxicas, como ya hemos señalado anteriormente (Smits J.G.C., 1991; Catalán J., 1990; Riera, J.L., 1993).

Este aporte de elementos químicos, sustancias orgánicas, bacterias, etc., junto a las fuertes cloraciones que habitualmente se emplean para eliminarlos, producen compuestos organoclorados en el agua potable que son consideradas potencialmente peligrosas para la salud humana (Vidal A., Omtuban J.). Además de afectar al rendimiento de los filtros de depuración, *Anabaena* y *Microcystis* provocan un olor a hierbas y mohos en concentración moderada, y ambas pueden llegar a ser importantes, en algunos momentos, en casi todos los embalses de Canal de Isabel II.

5.2.2.2. Las cianotoxinas

Algunas especies de cianobacterias producen toxinas, las cuales son clasificadas de acuerdo al modo de acción, en hepatotoxinas (*microcystinas*), neurotoxinas (*anatoxinas*), irritadoras de piel y otras.

Existen numerosos casos de intoxicación letal de animales por beber agua con presencia masiva de cianobacterias. Si bien la muerte de seres humanos a causa de toxinas cianobacterianas se ha limitado a

pacientes sometidos a diálisis renal, se sabe de daños a la salud a partir de numerosas noticias esporádicas de irritaciones a la piel y/o mucosas y también a partir de casos documentados de enfermedades a continuación de la exposición a través de ingestión de agua de bebida, así como la ingestión accidental o aspiración de espuma.

Las hepatotoxinas son producidas por varias especies de los géneros **Microcystis**, **Anabaena**, **Oscillatoria**, **Nodularia**, **Nostoc** y otros. La mayor parte de las hepatotoxinas son microcistinas. Al menos son conocidos 50 cogéneros de microcistinas y la mayoría de estos pueden producirse durante una floración.

Las neurotoxinas no son consideradas tan abundantes en fuentes de agua y no presentan el mismo riesgo a la exposición crónica que las microcistinas. Las **anatoxinas** son neurotoxinas altamente tóxicas que atacan el sistema nervioso y tienen un tiempo medio de vida corto.

Otro tipo de toxina generada por cianobacterias son las citotoxinas, presentes en las especies **Cylindrospermopsis raciborski**. Estas toxinas producen una variedad de problemas en la salud, desde gastroenteritis hasta enfermedades en el hígado.

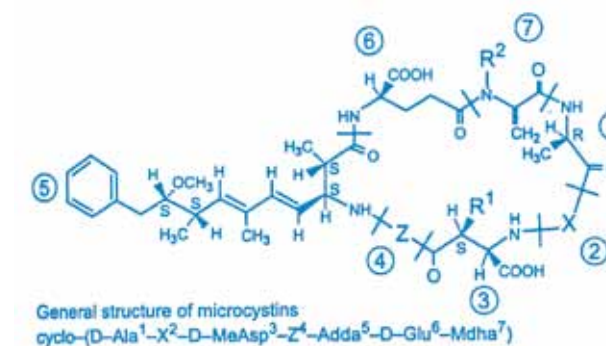
Las microcistinas son un grupo de hepatotoxinas (toxinas del hígado) formadas por siete aminoácidos (heptapéptido cíclico), con una cadena lateral de aminoácidos específica (ADDA) que hasta el momento, sólo ha sido encontrada en **microcistinas y nodularina**. Son producidas por un número de géneros de cianobacterias de los cuales el más importante es el género *Microcystis* del cual proviene el nombre de la toxina (tabla 7).

Las microcistinas consisten en un anillo peptídico de siete aminoácidos de los cuales cinco no pertenecen a proteínas, mientras que los dos restantes sí. Estos dos aminoácidos son los que permiten reconocer los distintos tipos de las aproximadamente 60 especies de microcistinas, mientras que los demás aminoácidos son, más o menos, constantes entre las variantes de microcistinas, (figura 136).

Tabla 7. **Microcistinas y organismos que la presentan**

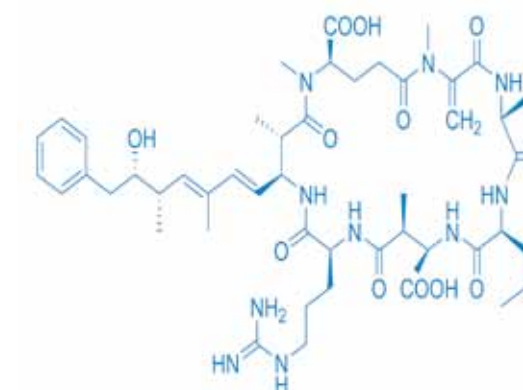
Cianotoxinas	LD50 (i.p. ratón) de toxina pura	Taxones que producen toxina	Mecanismo de toxicidad
Bloqueadores de fosfatasa de proteínas			
Microcistinas en general	45 - >1.000 g / kg	Microcystis Planktothrix Nostoc	Bloqueo de proteínas fosfatasas por enlace covalente y produce hemorragia del hígado; puede ocurrir daño acumulativo
Microcistina-LR	60 (25-125) g / kg	Anabaena Anabaenopsis	
Microcistina-YR	70 g / kg	Hapalosiphon	
Microcistina-RR	300 - 600 g / kg		

Figura 136. **Estructura general de una microcistina, en donde se muestran las posiciones donde se encuentran los aminoácidos variables (X y Z)**



Usando las iniciales de los dos aminoácidos distintivos, cada microcistina es designada con un nombre dependiendo de los aminoácidos variables que completan su estructura. La más común, y potencialmente tóxica, es la microcistina L-R la cual contiene los aminoácidos leucina (L) y arginina (R) en las dos posiciones variables (figura 137).

Figura 137. **Microcistinas y organismos que la presentan**



Como ya citamos anteriormente, la producción de microcistina depende de factores físicos, químicos y biológicos. Los factores principales que afectan la producción de la toxina son la luz y la temperatura. Estudios de laboratorio han demostrado que factores como el pH, concentración de nitrógeno, fósforo y dióxido de carbono también afectan el crecimiento de microcistinas.

El crecimiento de las cianobacterias y la formación de **blooms** están influenciados por factores físicos, químicos y biológicos. Como resultado del cambio en estos factores ocurren grandes fluctuaciones en los niveles de cianobacterias y toxinas. En algunas especies, las variaciones estacionales afectan a la producción de las últimas. La biodegradación y fotólisis son los medios por los cuales esta microcistina puede degradarse en el agua de forma natural.

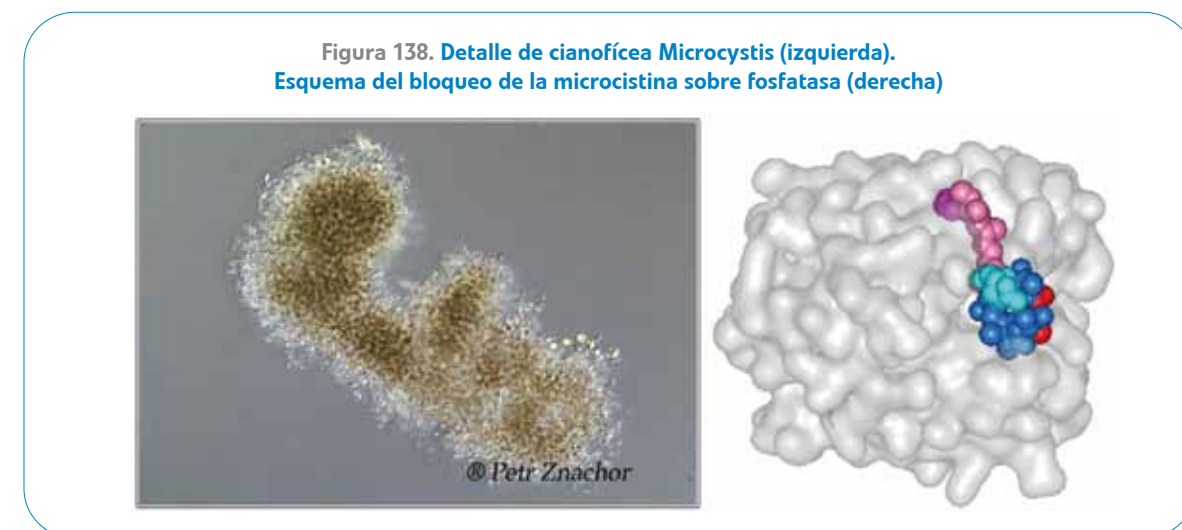
5.2.2.3. Principios tóxicos presentes y mecanismos de acción

Hasta la fecha se conocen aproximadamente 60 organismos análogos estructurales de microcistinas, los cuales se diferencian en los grupos metilo y en los dos aminoácidos variables. Esto afecta a la estructura terciaria de la molécula y resulta en diferencias pronunciadas en la toxicidad.

Las microcistinas bloquean la fosfatasa de las proteínas 1° y 2°, (que son conmutadores moleculares, importantes para todas las células eucarióticas) con un enlace covalente irreversible (figura 138).

La toxicidad de la microcistina es acumulativa. La vía más común de intoxicación por cianotoxinas en el hombre y el ganado se debe al consumo de agua de bebida. Una vía, que afecta en menor grado, es el uso recreativo en donde se encuentran estas toxinas. La absorción a través de la piel no es común debido a que difícilmente penetra por las membranas celulares. Algunas personas están expuestas al consumir algunos tipos de algas.

El método más común de análisis para la determinación de microcistinas y nodularina, emplea HPLC³ (Braga, M.N. 2004).



5.3. Resultados de bioensayos

5.3.1. Resultados del test rápido de toxicidad (FTZ)

El objetivo de este test es la evaluación de la toxicidad aguda en embriones de pez cebra en sus primeros estadios de desarrollo. El test permite calcular, de una manera rápida y económica, datos tales como la LC50 para una determinada muestra en 1,5 horas.

³ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) método analítico de cromatografía de líquidos de alta eficiencia

El test de toxicidad basado en embriones de pez cebra se beneficia de su alta capacidad reproductora, de la similitud del desarrollo embrionario de los vertebrados, de su facilidad de mantenimiento y de la transparencia de los embriones para dar lugar a un test que permite determinar la toxicidad aguda de una manera rápida, sencilla y económica.

El test se basa en el recuento de una serie de *endpoints* ya detallados anteriormente, su cuantificación en número de embriones que los presentan, respecto al control y la estimación de unos datos estadísticos que permiten visualizar la presencia o ausencia de efecto tóxico y determinar su potencial en el primer caso.

A continuación se detalla el protocolo experimental.

Protocolo experimental del test rápido de toxicidad (FTZ)

1. Inducción hormonal y fecundación
2. Incubación a 26 +/- 0,5° C
3. A las 1:25-1:30 hpf, lectura de 30 embriones (en la misma placa de Petri) por puesta para estimar la viabilidad y seleccionar las más aptas, considerando viable aquel embrión en fase de 8 células, (o al menos 4) con un desarrollo normal de las mismas. El porcentaje mínimo de viabilidad para utilizar una puesta será del 60 por ciento.
4. Carga de los embriones a las 1:25-1:45 hpf, un total de 24 por concentración y réplica (48 para el control), en 25 µl de medio por pocillo.
5. A las 1:30-1:50 hpf, lectura inmediata tras la carga de las placas. Se considerará:
 - (1) Apto, será aquel embrión en fase de 8 ó más células, con un desarrollo normal de las mismas.
 - (0) No apto, será todo aquel embrión, con menos de 8 células, o con el número correcto de células pero una disposición de las mismas alejada del modelo normal.
 - (-) Nulo, será aquel embrión en que no se pueda apreciar correctamente la fase de desarrollo.
 Únicamente los embriones aptos, marcados con (1), se tendrán en cuenta durante el desarrollo del test.
6. Incubación a 26° C.
7. Lectura a las 3:00-3:20 hpf. Estarán en fase de blástula; se diferenciarán embriones "coagulados", "normales" o "anómalos". Se considerarán "nulos" (-) aquellos embriones en los que no puede observarse con seguridad el desarrollo del mismo, eliminándose del test.
8. Comparación de los porcentajes de anomalías en control y muestra del extracto, determinando su significación en un intervalo de confianza dado. Se descartarán aquellos ensayos con un porcentaje de anomalías en el control superior al 30 por ciento.

Tabla 8. Lectura del test rápido de toxicidad de ZF biolabs

Plantilla de lectura del FTZ																								
Compuesto:	Concentración:			Ronda:			Fecha:																	
Hora de fecundación:	Temperatura:			Réplica:			Filas:																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Viabilidad (1,5 hpf)																								
Toxicidad (3 hpf)																								
Coagulado																								
Anómalo																								
Observaciones:																								

5.3.1.1. Protocolo de preparación de reactivos

5.3.1.1.1. Anestésico (tricaína)

Solución primaria: se añaden 0,4 gramos de tricaína en polvo (Ethyl 3-aminobenzoate, methanesulfonic acid salt, 98%. Acros organics; conservada a -15° C, en el congelador de la nevera) a 50 mililitros de agua mineral. Agitar y mezclar bien. Esta solución de 8.000 miligramos por litro (8 g/l) se conservará a 4° C.

Solución final: se añade 1 mililitro de la solución madre (8.000 mg/l) a 50 mililitros de agua declorada. Esta solución final resultante tendrá una concentración de 160 miligramos por litro de tricaína, suficiente para anestesiar adultos de gran tamaño en 30-60 segundos, como norma general. Sólo es válida para su uso a lo largo de 3 ó 4 horas.

5.3.1.1.2. Solución salina (para el esperma)

Se añade 0,4 gramos de NaCl (cloruro de sodio) y 0,02 gramos de KCl (cloruro de potasio) en 50 mililitros de agua destilada. Esta solución se conservará a 4° C.

5.3.1.1.3. Agua de embriones

Solución primaria: se añaden las siguientes cantidades de cada compuesto en 1 litro de agua destilada:

- Ca Cl ₂ :	0,1499 gramos	- KCl:	0,29973 gramos
- MgSO ₄ :	0,74929 gramos	- NaCl:	6,25015 gramos
- NaHCO ₃ :	0,96023 gramos	- CaSO ₄ · 2H ₂ O	0,5991516 gramos

Esta solución se mantendrá a 4° C.

Solución final: Se añaden 100 mililitros de la solución primaria a 900 mililitros de agua destilada. Se renueva cada semana.

5.3.1.2. Protocolo de extracción para muestras de embalses

Extracción de muestras de embalses

- 1° Filtración con malla de fitoplancton de 20 µm
- 2° Secado en estufa a 48,5° C de los filtros de malla
- 3° Cuantificación del peso seco de cada filtro
- 4° Introducción del filtro en medio de embriones, o en el propio medio acuoso de la muestra problema, con uno por ciento de DMSO a razón de 1 ml de medio por miligramo de peso seco para conseguir en todos los casos concentraciones de 1.000 mg/l
- 5° Agitación, pocos minutos.
- 6° Sonicación, 15 minutos.
- 7° Agitación, pocos minutos.
- 8° Sonicación, 15 minutos.
- 9° Agitación, pocos minutos.
- 10° Retirada de los fragmentos de filtro, y centrifugación a media potencia durante 15 minutos.
- 11° Recogida del sobrenadante para su testado.
- 12° Conservación a -20° C del extracto sólido, si fuera necesario para posteriores análisis.

5.3.1.3. Resultados de la aplicabilidad del FTZ

Los datos obtenidos a partir de los primeros ensayos, especialmente aquellos obtenidos a partir del uretano, muestran una notable sensibilidad del ensayo a las 1,5 horas. Los efectos producidos por la exposición a sustancias tóxicas incluyen el siguiente par de efectos:

- Retraso en el desarrollo, observable por el menor número de células en el embrión, fruto de una disminución de divisiones celulares. En el intervalo estudiado, 1:40-2:00 hpf (horas post fecundación) los embriones han de encontrarse en estadios de 8 a 16, incluso 32 células, siendo frecuentes en las concentraciones efectivas de compuesto tóxico, los embriones en estadio de 4, 2, o incluso una célula; señal, esta última, de total inhibición del proceso de desarrollo.
- Desarrollo anormal del embrión, observándose disposiciones irregulares de las células, debido a un proceso anormal de división celular.

En relación con el efecto de las sustancias tóxicas a más largo plazo (3,5 y 24 hpf), se aprecia una enorme similitud en lo relativo a los datos de 1,5 y 3,5 hpf, considerando los casos de embriones viables y anormales. Igualmente ocurre a las 24 hpf, respecto a viables (1,5 hpf) vs. viables (24 hpf) y anormales (1,5 hpf) vs. letales (24 hpf), si bien en este caso, la sensibilidad a 1,5 hpf es sensiblemente menor.

Una vez comprobada la posibilidad de realizar el test en poco más de 1,5 horas, se procedió a elaborar un primer protocolo que optimizara estos ensayos previos y permitiera testar una batería más amplia de compuestos.

La primera variación importante, fue delimitar el rango de lectura de embriones de manera que se ajustase al máximo, a dos estadios concretos de desarrollo, eliminando variabilidad en la observación de las anomalías consideradas en el test. De esta manera, se estableció la lectura a las 1:30-1:50 hpf, tiempo en que los embriones se encuentran en estadio de 8 ó 16 células. Estos estadios de desarrollo son fácilmente observables y, al constar de pocas células, resulta igualmente sencillo detectar anomalías en la disposición de las mismas o en su cantidad. Una observación aún anterior, en fases de 2 ó 4 células, resultaría menos fiable (especialmente para el caso de 2 células), a tenor de la experiencia acumulada en la observación de embriones de pez cebra, ya que es relativamente frecuente que embriones incorrectamente fecundados alcancen estadios de 2 ó 4 células, si bien lo hacen presentando anomalías más o menos claras en su disposición, pero en cualquier caso puede ser origen de falsas interpretaciones y añadir ruido a los datos recabados.

La elaboración de un protocolo más definido, es una herramienta útil a la hora de buscar el reducir la variabilidad al máximo. En este punto, se concentraron los restantes cambios establecidos, principalmente enfocados a homogeneizar el proceso inicial de fecundación de los embriones con el propio medio tóxico a testar.

Una primera observación de los datos muestra, a grandes rasgos, una sensibilidad inferior para la lectura a 1,5 hpf que a 24 hpf, aunque por debajo de un rango de magnitud, las observaciones a 1,5 y 3,5 hpf muestran una sensibilidad muy similar, al igual que entre 24 y 48 hpf, si bien a 48 hpf la sensibilidad es sensiblemente superior al resto de casos.

Un problema achacable a este protocolo de testado es el desconocimiento de la influencia que puede presentar el hecho de fecundar las puestas con las propias diluciones a testar, respecto al propio mecanismo en sí de la fecundación, principalmente la influencia que pueda tener en la viabilidad del esperma.

No obstante, la principal limitación de este protocolo se centra en la imposibilidad de seleccionar puestas y embriones, lo que redundará en un aumento de la variabilidad en el test, al no existir un uso homogéneo de

material biológico en el testado, mezclando puestas de calidad con malas puestas, y embriones viables con inviables. Esto hace que los controles muestren a menudo una tasa de anomalías muy importante, cuando no mayoritaria, que provoca la invalidación de numerosas réplicas e introduce variabilidad en el análisis.

Partiendo de este hecho de trascendental importancia, los esfuerzos en el desarrollo del segundo protocolo se centraron en eliminar esta variabilidad, optimizando las muestras biológicas a utilizar en el test, con el consecuente ahorro en tiempo de trabajo y ganancia de fiabilidad asociada.

En este caso, la experiencia en las observaciones a 1,5 hpf e incluso un poco anteriores se ha utilizado para, en lugar de testar las propiedades toxicológicas de los compuestos, observar la viabilidad de las puestas obtenidas, marcando un protocolo de control de calidad que oriente con bastante fiabilidad acerca de las puestas más aptas para su utilización en el desarrollo del test de una determinada sustancia.

A este primer criterio de calidad, encaminado a elegir las puestas con mayor viabilidad, se une un segundo control de calidad, igualmente determinante, que ya va dirigido a elegir embriones con la mayor probabilidad posible de resultar viables de manera que se minimice la variabilidad entre réplicas. Para lograr este objetivo, los embriones se seleccionan inmediatamente después de cargar el compuesto tóxico, asegurándose así que los efectos observados en lecturas posteriores van a ser debidos al efecto de la sustancia tóxica, y no a la variabilidad intrínseca entre puestas o entre embriones en lo tocante a calidad a grandes rasgos.

En un principio, la lectura propiamente dicha del test se estableció en 3,5 horas tras la exposición al compuesto, es decir, 5 hpf, pensando en paliar una supuesta pérdida de sensibilidad al no exponer el embrión al compuesto desde el mismo momento de la fecundación.

Como era de esperar, el doble control de calidad de embriones mejoró sustancialmente los controles aumentando la fiabilidad de los ensayos, reduciendo la variabilidad entre réplicas y los tiempos de trabajo para la obtención de resultados. Por contra, presentó el esperado efecto reductor de la sensibilidad, moviéndose en torno a un orden de magnitud entre la lectura a 5 hpf y a 24 hpf, si bien la variabilidad en este apartado es grande, según el compuesto que consideremos.

Los últimos esfuerzos se han centrado en probar el mismo protocolo con lecturas más cortas, de 3 y 4 hpf, con el fin de hacer más rápido el test sin perder información. Igualmente, se ha probado a aumentar la temperatura de incubación de las réplicas a 32° C, para observar si se produce aceleración en el proceso toxicológico al debilitar ligeramente los embriones con una mayor temperatura.

En el primer caso, a 3 y 4 hpf las variaciones observadas respecto a 5 hpf son relativamente pequeñas llevando, generalmente, los embriones un desarrollo de la respuesta toxicológica similar en los tres casos, por lo que, una vez analizados en detalle los datos, es factible reducir el tiempo de duración del test hasta las 1,5 horas tras la exposición al compuesto.

En el segundo caso, la influencia del aumento de temperatura ha sido casi inapreciable, no pareciendo que pueda resultar un factor interesante de cara a su inclusión en el test.

En un caso, el del pentaclorofenol, se probó la influencia que el pH puede tener en la actividad de este compuesto; a falta de más datos, parece que podría resultar más tóxico a niveles más ácidos de pH (7 frente a 7,8).

En relación con los resultados obtenidos con las dos primeras series de muestras procedentes de embalses de Canal de Isabel II, en la primera ocasión se obtuvieron unos resultados confusos, donde se apreciaba un efecto tóxico en la totalidad de las muestras estudiadas, en mayor o menor medida a las 1,5 y 3,5 hpe (horas post-exposición), y casi total a las 72 hpe. Esto llevó a pensar en un posible efecto tóxico provocado por el proceso de extracción, para lo

que se realizó una segunda tanda de ensayos con otra serie de muestras procedentes de embalses, comparando muestras con el proceso de extracción metabólico realizado y no realizado. Se observó, en este caso, toxicidad en las muestras metabólicas, incluso en una muestra de control sometida al mismo proceso de extracción con metanol y, por el contrario, no se encontró toxicidad en las muestras no extraídas con metanol. Era necesario continuar los ensayos hasta encontrar un procedimiento de extracción que nos permitiera estar seguros de que la actividad tóxica localizada se debe a componentes propios de la muestra, sin influencia del proceso de preparación de la misma llevado a cabo; esto se logró mediante el protocolo de sonicación ya explicado en este documento.

Una vez optimizado el protocolo de extracción con muestras provenientes de embalses madrileños, se procedió a testar diferentes muestras acuosas de manera rutinaria utilizando el protocolo definitivo del FTZ, afinando al mismo tiempo los pequeños detalles derivados del uso cotidiano de dicho test a gran escala.

Los resultados obtenidos a lo largo del proceso de testado rutinario de muestras procedentes de embalses sugieren que:

- El método extractivo mediante sonicación resulta efectivo a la hora de obtener soluciones acuosas a partir de muestras de embalses con presencia de algas cianotóxicas, de modo que dichas soluciones potencialmente tóxicas puedan ser testadas
- Los experimentos de repetibilidad llevados a cabo con estas muestras, han arrojado un alto porcentaje de las mismas con la máxima concordancia. En el desarrollo del test se recomienda realizar los ensayos por triplicado, de manera que los datos obtenidos den una orientación más precisa del posible potencial toxicológico de la muestra en cuestión. Igualmente, resulta interesante estudiar la significación toxicológica del total de embriones de todas las repeticiones de una muestra, tomando estos datos sumados, con el fin de obtener una orientación más precisa debido al aumento del tamaño de muestra.

– Total de muestras con dos repeticiones:	18
– Concordancia al 100% entre repeticiones:	14/18 (77,8%)
– Total de muestras con tres repeticiones:	41
– Concordancia al 100% entre repeticiones:	30/41 (73,2%)
– Total de muestras con repeticiones:	59
– Concordancia al 100% entre repeticiones:	44/59 (74,6%)

- Dada la posibilidad de existir, disueltos en el agua, componentes químicos ajenos a los liberados mediante el procedimiento de extracción, resulta conveniente resuspender el extracto directamente en el agua filtrada y testar de forma conjunta ambos elementos.
- Si bien fueron recopilados más datos al respecto, a la hora de testar la batería inicial de compuestos químicos, especialmente con metil-mercurio, con el fin de establecer una posible correlación con muestras de embalses entre los ensayos de toxicidad rápida (FTZ) y el ensayo de toxicidad y teratogenia (DTZ) desarrollado por ZF Biolabs, se probaron varias muestras más provenientes de embalses. Con los resultados obtenidos, únicamente han podido realizarse comparaciones con la última de las muestras, 140.456 (datos que además no han resultado totalmente completos y que sería necesario ampliar para obtener unos datos estadísticos más fiables), arrojando estos resultados:

– LC50- 48 h:	1.429 – 2.500 mg/l
– EC50-1,5 h:	3.301 +/- 1.346 mg/l

Ha resultado, como era de esperar, mayor sensibilidad del ensayo a las 48 horas, si bien manteniéndose los datos para 1,5 horas dentro del mismo orden de magnitud, en consonancia con datos obtenidos en el ensayo con compuestos químicos.

5.3.2. Resultados del test de neurotoxicidad

Los embriones que se someten al test de neurotoxicidad suelen presentar las siguientes características:

Coagulación. Embriones que presentan un aspecto lechoso, opaco, con notable degeneración celular y todas sus estructuras normales, parcial o totalmente, irreconocibles.

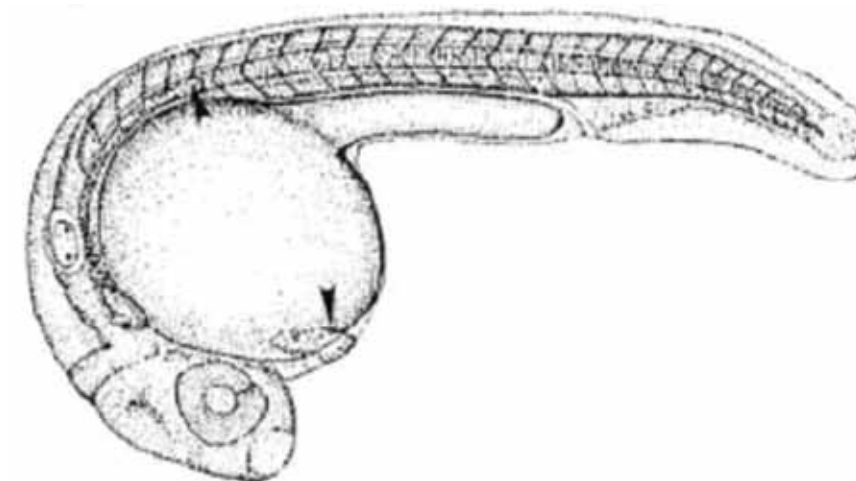
Ausencia de somitas. La distintiva ordenación segmentada de los somitas debe ser reconocible, aunque sea de manera muy tenue. El número total de dichos somitas es irrelevante a la hora de considerar este criterio: únicamente importa su presencia o ausencia. La observación de este criterio ha de ser muy minuciosa, girando el embrión si fuera conveniente para buscar rastros, por pequeños que sean, de organización en somitas.

Cola no separada. La separación de la cola, respecto a la bolsa de la yema, ha de ser reconocible con claridad (figura 139). El progreso de dicha separación depende del estadio de desarrollo embrionario, pero, en el caso que nos ocupa, únicamente resulta importante el criterio de presencia/ausencia. Para considerar que existe separación de la cola, es necesario que exista una mínima prolongación que sobrepase el límite caudal de la extensión de la yema.

A las 28 hpf, los criterios de neurotoxicidad para determinar los resultados del test, son los siguientes:

Movimiento espontáneo. Se observan contracciones laterales espontáneas a las 27,5 - 28,5 hpf; su actividad consiste normalmente en una única o una corta serie de contracciones rítmicas. Para su evaluación, se observará un máximo de 30 segundos cada embrión, anotando la presencia o ausencia de estas contracciones espontáneas.

Figura 139. Embrión de pez cebra a las 28 hpf, (Kimmel et al. 1995)



Encéfalo. Se considera anomalía cualquier deformación de la estructura encefálica, así como la variación anormal de su tamaño, ya sea del órgano completo o de alguna de sus partes (figura 140).

Vesícula óptica. Se considera anomalía tanto la ausencia, como cualquier forma irregular del ojo, variación en su tamaño (microftalmia), o la parcial o total fusión de ambos ojos (ojo ciclópeo).

Vesícula ótica. Las anomalías consideradas incluyen tanto la ausencia, como una formación anómala de las vesículas, pudiendo encontrarse divididas en dos vesículas contiguas, así como la presencia de un número de otolitos distinto al habitual (dos).

Figura 140. Embrión normal (izquierda) y con anomalías en encéfalo y vesícula óptica (derecha) a las 28 hpf



5.3.2.1. Protocolo experimental

1ª Ronda test de neurotoxicidad

Extracción de muestras de embalses

- 1° Se preparan al menos cinco diluciones seriadas, separadas por un factor de 10, a partir del stock del compuesto, partiendo de 1g/l, de un valor cercano a la máxima concentración soluble si ésta es menor o de 1/10 de la máxima concentración si esta es muy alta.
- 2° Inducción hormonal y fecundación *in vitro*.
- 3° Incubación a 26 +/- 0.5° C.
- 4° A las 3:00 hpf, lectura de 30 embriones por puesta (en la misma placa de Petri), para estimar la viabilidad y seleccionar las más aptas, considerando "viable" aquel embrión en fase de blástula, sin anomalías de ningún tipo: polo vegetativo, yema o corion.
- 5° Carga de los embriones a las 3:30 hpf en 49 µl de medio, por pocillo.
- 6° A las 3:30 - 4:00 hpf, lectura inmediata, tras la carga de las placas. Se considerarán únicamente, los embriones viables para la continuación del test.
- 7° Incubación a 26° C.
- 8° Lectura a las 23:00 - 25:00 hpf. Detección de los criterios de letalidad.
- 9° Delimitación del rango de interés toxicológico, de cara a realizar la segunda ronda.

Tabla 9. Lectura de neurotoxicidad

Plantilla de Lectura de neurotoxicidad																								
Compuesto:	Concentración:				Ronda:				Fecha:															
Hora de fertilización:	Viabilidad (3hpf):				Réplica:				Filas:															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Viabilidad (4 hpf)																								
Letalidad (28 hpf)																								
Coagulación																								
Ausencia de somitas																								
Cola no separada																								
Neurotoxicidad (28 hpf)																								
Movimiento espontáneo																								
Encéfalo																								
Vesícula óptica																								
Vesícula ótica																								
Observaciones:																								

2ª Ronda test de neurotoxicidad

1º Inducción hormonal y fecundación in vitro.

2º Incubación a 26 +/- 0,5° C.

3º A las 3:00 hpf, lectura de 30 embriones por puesta (en la misma placa de Petri), para estimar la viabilidad y seleccionar las más aptas, considerando "viable" aquel embrión en fase de blástula, sin anomalías de ningún tipo: polo vegetativo, yema o corion.

4º Carga de los embriones a las 3:30 hpf.

5º A las 3:30 - 4:00 hpf, lectura inmediata tras la carga de las placas. Se considerarán, únicamente, los embriones viables para la continuación del test.

6º Incubación a 26° C.

7º Lectura a las 27:30 - 28:30 hpf. Detección de los criterios letales y neurotóxicos.

8º Cálculo estadístico de la LC50 y EC50neurotox, utilizando el programa Probit 1.5, suministrado por la EPA (Environmental Protection Agency - USA).

5.3.2.2. Resultados de la aplicabilidad del test de neurotoxicidad

Con el objetivo de definir un protocolo de test de neurotoxicidad, se han llevado a cabo ensayos con diferentes compuestos, a saber:

- Ácido valproico, sospechoso de neurotoxicidad según Scorecard, (http://www.scorecard.org/health-effects/chemicals-2.tcl?short_hazard_name=neuro&all_p=t)
- Hidroxiurea, no sospechoso de neurotoxicidad según Scorecard
- Isoniazida, no sospechoso de neurotoxicidad según Scorecard
- Colchicina, sospechoso de neurotoxicidad según Scorecard
- Cafeína, sospechoso de neurotoxicidad según Scorecard

Los datos con ácido valproico e hidroxiurea, recogidos en el informe anterior, mostraban una total concordancia con el status de ambos compuestos según la base de datos Scorecard. Isoniazida y cafeína presentan unos resultados que indican una cierta duda acerca de su potencial neurotóxico, que podría confirmarse en la cafeína, si bien serían necesarios ensayos más detallados para confirmar estos datos. En el caso de la colchicina no se ha apreciado potencial neurotóxico, contradiciendo su status según Scorecard, si bien serían necesarios nuevos ensayos para confirmar este punto.

Los ensayos con extractos de muestras acuosas de Canal de Isabel II se centraron en probar este protocolo de neurotoxicidad junto con el proceso de extracción de cianotoxinas, haciendo especial hincapié en la

repetibilidad de los resultados. A propósito de esta última cuestión, los resultados han sido altamente satisfactorios, encontrándose una concordancia total en todos los casos estudiados:

- Total de muestras con repeticiones: 4
- Concordancia al 100% entre repeticiones: 4/4 (100%)

Con el fin de determinar de manera precisa el potencial neurotóxico de las muestras de embalses, hemos observado la necesidad, en el caso de llevarse a cabo futuros ensayos, de utilizar una mayor cantidad de muestra que permita estudiar el efecto a concentraciones más altas, de manera que sea factible observar efectos de toxicidad aguda y contrastarlos con posibles efectos neurotóxicos, evaluando dicho potencial con la máxima seguridad.

El desarrollo de un protocolo para un test de neurotoxicidad ha sido satisfactorio, obteniendo un test con resultados prometedores en la batería de compuestos estudiada, así como de factible acoplamiento al proceso de ensayos con muestras de embalses, mostrando a su vez, en estos ensayos, un alto grado de repetibilidad.

5.3.3. Resultados del test de hepatotoxicidad

5.3.3.1. Protocolo experimental

Este es el criterio de letalidad a las 144 hpf:

Coagulación (figura 141). Embriones que presentan un aspecto lechoso, opaco, con notable degeneración celular y todas sus estructuras normales parcial o totalmente irreconocibles.

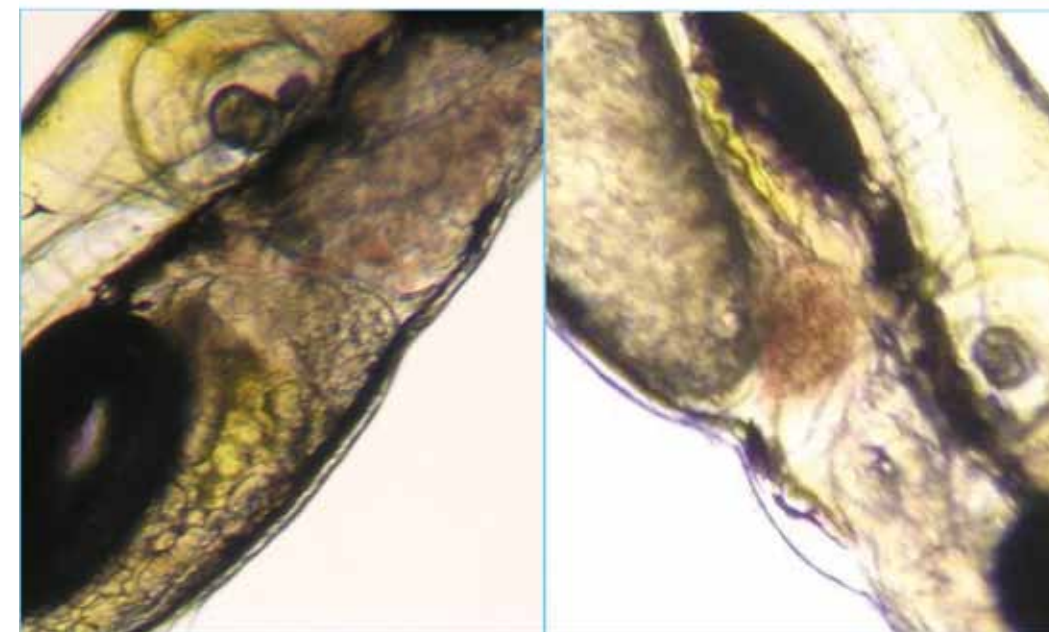
Figura 141. Embrión normal de 6 dpf



Estos son los criterios de hepatotoxicidad a las 144 hpf:

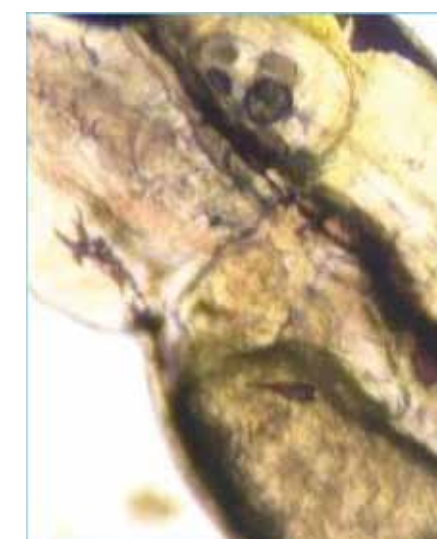
Necrosis hepática (figura 142). Hígado embrionario opaco, con notable degeneración celular y todas sus estructuras normales parcial o totalmente irreconocibles.

Figura 142. Embrión con hígado normal (izquierda) y presentando síntomas de necrosis (derecha)



Hipotrofia (figura 143). Hígado de tamaño notablemente reducido respecto a un órgano desarrollado con normalidad.

Figura 143. Embrión con hígado hipotrofiado



A continuación se expone el protocolo experimental del test de hepatotoxicidad, rondas 1 y 2 y plantilla de lectura del test.

Protocolo Experimental. 1ª Ronda test de hepatotoxicidad

1º Se preparan, al menos, cinco diluciones seriadas, separadas por un factor de 10, a partir del stock del compuesto partiendo de un gramo por litro, de un valor cercano a la máxima concentración soluble, si ésta es menor, o de 1/10 de la máxima concentración, si esta es muy alta.

2º Inducción hormonal y fecundación *in vitro*.

3º Incubación a 26 +/- 0,5º C.

4º A las 3:00 hpf, lectura de 30 embriones por puesta (en la misma placa de Petri), para estimar la viabilidad y seleccionar las más aptas, considerando "viable" aquel embrión en fase de blástula sin anomalías de ningún tipo: polo vegetativo, yema o corion.

5º Carga de los embriones a las 3:30 hpf en 49 µl de medio, por pocillo.

6º A las 3:30 - 4:00 hpf, lectura inmediata tras la carga de las placas. Se considerarán únicamente los embriones viables para la continuación del test.

7º Incubación a 26º C.

8º Lectura a las 23:00 - 25:00 hpf. Detección de los criterios de letalidad.

9º Delimitación del rango de interés toxicológico, de cara a realizar la segunda ronda.

Tabla 10. Lectura de hepatotoxicidad

Plantilla de lectura de hepatotoxicidad																								
Compuesto:	Concentración:			Ronda:			Fecha:																	
_____	_____			_____			_____																	
Hora de fertilización:	Viabilidad (3hpf):			Réplica:			Filas:																	
_____	_____			_____			_____																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Viabilidad (4 hpf)																								
Letalidad (4 -144 hpf)																								
Coagulación																								
Hepatotoxicidad (144 hpf)																								
Necrosis																								
Hipotrofia																								
Otras anomalías																								
Observaciones:																								

Protocolo experimental. 2ª Ronda test de hepatotoxicidad

1º Inducción hormonal y fecundación *in vitro*.

2º Incubación a 26 + / - 0,5° C.

3º A las 3:00 hpf, lectura de 30 embriones por puesta para (en la misma placa de Petri), estimar la viabilidad y seleccionar las más aptas, considerando "viable" aquel embrión en fase de blástula, sin anomalías de ningún tipo: polo vegetativo, yema o corion.

4º Carga de los embriones a las 3:30 hpf, en placas de 96 pocillos, con un embrión y 100 µl de medio, en cada uno.

5º A las 3:30-4:00 hpf, lectura inmediata, tras la carga de las placas, señalando cada embrión como viable, anómalo o no fecundado. Únicamente los organismos viables serán tenidos en cuenta en el desarrollo del test.

6º Incubación a 26° C.

7º Cada 24 horas, retirada de los ejemplares coagulados.

8º A las 48 hpe (horas post exposición), cambio del 75 por ciento del medio.

9º A las 72 ó 96 (preferiblemente) hpe, cambio del 75 por ciento del medio.

10º Si resulta factible, cambio del 75 por ciento del medio a las 120 hpe.

11º A las 144 hpf (6 días post fecundación), anestesia con tricaina (10 µl de solución, 8 g/l por pocillo) y observación microscópica *in vivo*.

5.3.3.2. Resultados de la aplicabilidad del test de hepatotoxicidad

Los experimentos previos con varios compuestos (ácido acetilsalicílico, uretano, ácido valproico e isoniazida) para la observación de preparaciones histológicas, arrojó resultados prometedores, si bien este método de observación fue descartado por el estudio *in vivo* de larvas a los 6 días post fecundación, ya que la relación calidad/tiempo resultaba mucho más interesante en este segundo caso.

Tras realizar algunas experiencias previas sin método sistematizado con el objetivo de estudiar los futuros *endpoints* a desarrollar, finalmente nos decantamos por los expuestos en el protocolo del test, consistente en varios *endpoints* morfológicos que reflejaran el correcto o incorrecto desarrollo del hígado en larvas de 6 días de edad.

Posteriormente, este método se puso a punto, de manera sistemática, mediante el testado con cafeína, compuesto citado como potencialmente hepatotóxico según Scorecard, con resultados esperanzadores.

A continuación, se testaron diversas muestras procedentes de embalses, si bien sería necesaria una mayor

cantidad de muestra para determinar, de manera inequívoca, el potencial hepatotóxico apuntado en alguna de ellas.

Se ha llegado a un prometedor protocolo de test de hepatotoxicidad, que ha dado lugar resultados satisfactorios en los ensayos realizados con cafeína y muestras de embalses, si bien no se ha alcanzado aún el grado de desarrollo y optimización deseado.

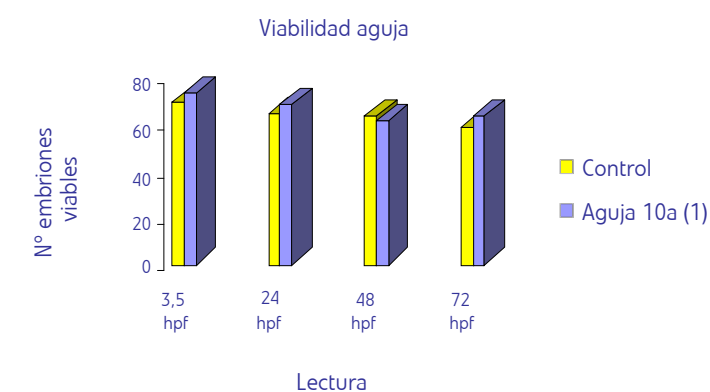
5.3.4. Resultados de la microinyección

5.3.4.1. Calidad de las agujas de microinyección

Los experimentos realizados se describen a continuación:

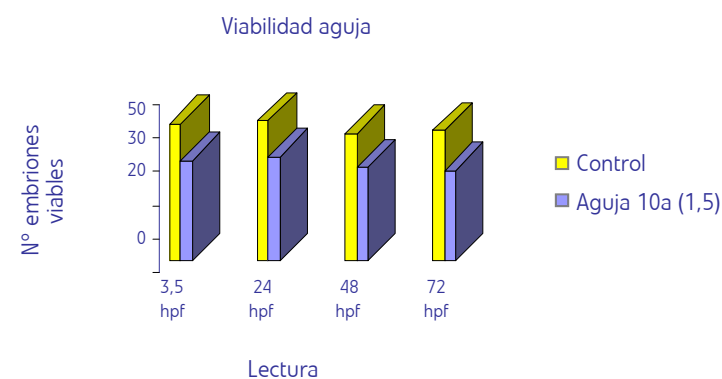
- 96 embriones microinyectados con 10 nL (nanolitros) de 0,05% rojo fenol en Tris HCl pH 7,6; empleando la aguja 10a (1) en presión 1. Se realizan lecturas de los embriones a 3,5; 24; 48 y 72 hpf (horas post fecundación) y del mismo número de embriones sin inyectar (control).

Figura 144. Viabilidad de las agujas con 10nL de rojo fenol



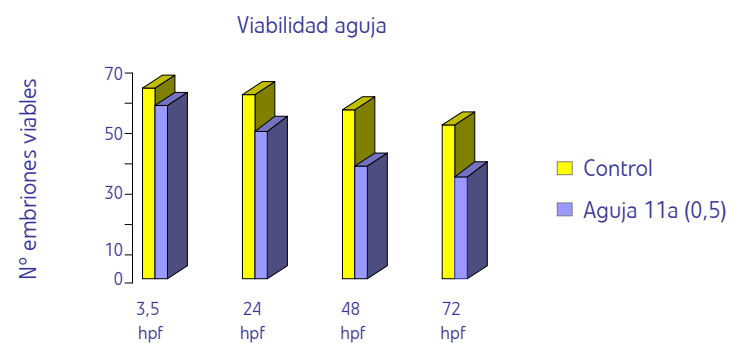
- 48 embriones microinyectados con 150 nL rojo fenol 0,05% en Tris HCl pH 7,6; empleando la aguja 10a (1,5) en presión 1,5; comparados con 48 embriones sin microinyectar y realizando lecturas a 3,5; 24; 48 y 72 hpf.

Figura 145. Viabilidad de las agujas con 150nL de rojo fenol



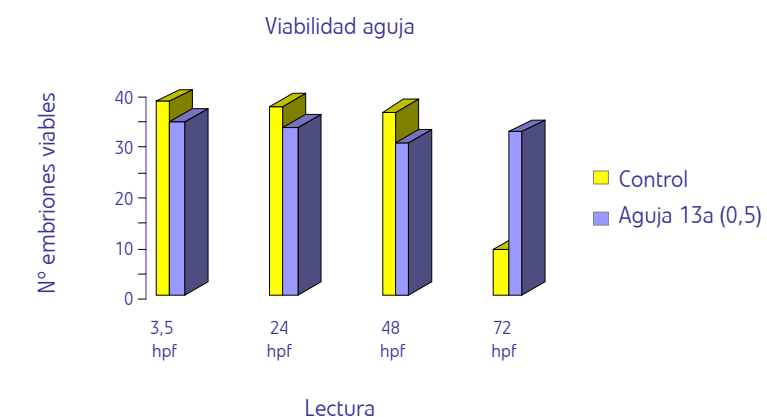
- Microinyección de 96 embriones con 52 nL de rojo fenol, empleando la aguja y presión 11a (0,5); respecto a su control y leídos a los mismos tiempos.

Figura 146. Viabilidad de las agujas con 52nL de rojo fenol a 96 embriones



- Microinyección de 48 embriones con 52 nL de rojo fenol con la aguja 13a y presión (0,5); comparado con su control y observando su desarrollo a las 3,5; 24; 48 y 72 hpf.

Figura 147. Viabilidad de las agujas con 52nL de rojo fenol a 48 embriones



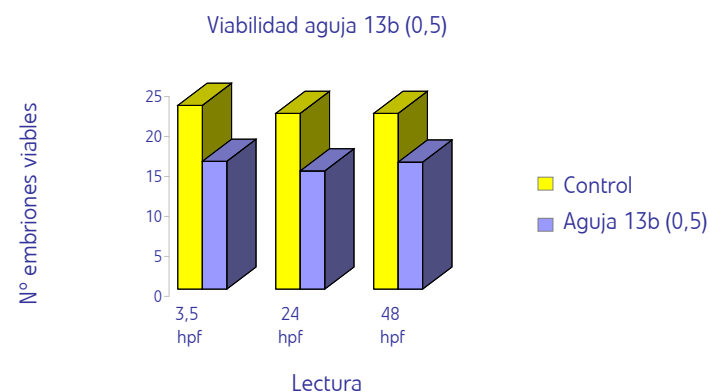
El criterio llevado a cabo en las lecturas se basa en asignar el valor 1 a aquellos embriones normales y que cumplan los criterios del test DTZ. El valor 0 para aquellos embriones coagulados o claramente muertos, sin actividad celular. Y 0,5 a los embriones con malformaciones claramente observables, o que no cumplen todos los criterios del DTZ, para cada estadio del desarrollo.

- De los 4 bloques de microinyección, con diferentes agujas y distintos volúmenes de rojo fenol, se deduce lo siguiente:
- Ninguna aguja de las testadas produce a priori un excesivo daño al embrión causando una mortalidad muy significativa, respecto al control.
- La cantidad de rojo fenol inyectado no parece ser tóxica, aunque se observa que a mayor volumen de rojo fenol inyectado, mayor mortalidad ó mayor diferencia de supervivencia respecto al control.
- De las tres agujas ensayadas, 10a, 11a y 13a, concluimos que la 10a y 13a son las mejores. Por lo tanto, para sucesivas inyecciones emplearemos réplicas de estas dos agujas.

En otro experimento, similar al anterior, se prueba la viabilidad de nuevas agujas:

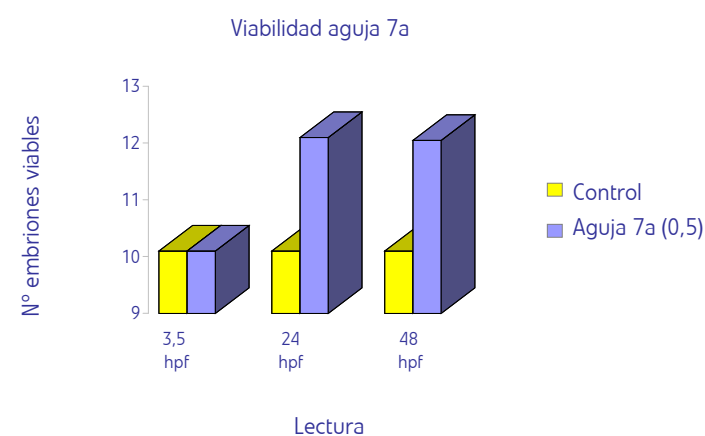
- Microinyección de 53 embriones con la aguja y presión 13b (0,5); se dispensa una cantidad de 80 nL de rojo fenol, comparando con el control y leído a 3,5; 24 y 48 hpf.

Figura 148. Microinyección de 53 embriones, aguja 13b



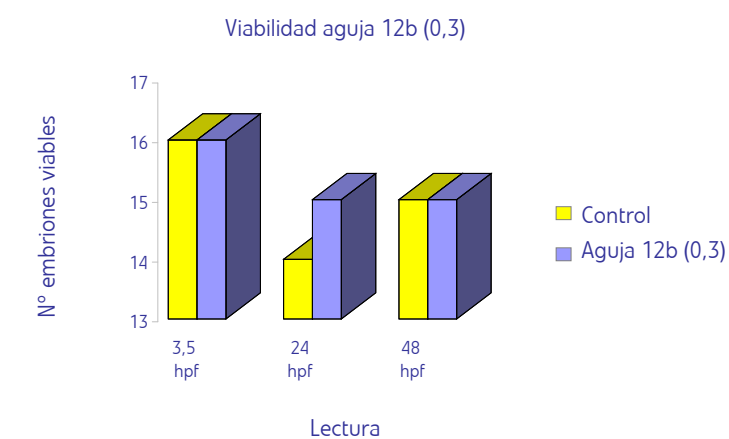
- Microinyección de 38 embriones con la aguja y presión 7a (0,5) frente al control, observados a los mismos estadios que el punto anterior.

Figura 149. Microinyección de 38 embriones, aguja 7a



- Microinyección de 46 embriones con 12b (0,3) respecto al control, y observando su desarrollo a 3,5; 24 y 48 hpf.

Figura 150. Microinyección de 46 embriones



De estos últimos experimentos no se han podido obtener conclusiones sobre la calidad de las agujas empleadas ni sobre el volumen inyectado, ya que la viabilidad de las puestas era muy baja. Sin embargo, retomando los experimentos descritos con anterioridad más otros experimentos no descritos, concluimos que la aguja número 13a tiene unas condiciones óptimas para el embrión. No produce herida y no se bloquea fácilmente, por lo que para los sucesivos experimentos se utilizarán réplicas de la aguja 13a.

5.3.4.2. Microinyección de compuestos tóxicos

Los compuestos seleccionados han sido: isoniazida, metil-mercurio, uretano, 5'-fluorouracilo, hidroxiurea, talidomida.

5.3.4.3. Resultados de la aplicabilidad de los ensayos de microinyección

En la primera parte se detallan todos los pasos que se han llevado a cabo para poner a punto un sistema de microinyección funcional y eficaz. Así mismo, queda explícito el material de partida necesario para poder microinyectar embriones de pez cebra como son: una lupa binocular que proporciona una imagen tridimensional, un inyector, un micromanipulador, una fuente de luz fría, agujas de microinyección, etc.

En la segunda parte se analiza el efecto que determinados compuestos tóxicos, de naturaleza variable, tienen cuando se microinyectan en embriones de pez cebra. Se han ensayado diferentes compuestos, a fin de obtener resultados similares o al menos extrapolables, a los obtenidos en nuestro laboratorio mediante el test DTZ³ (LC50, EC50,...) para los mismos compuestos. En este sentido, existen algunos factores limitantes

³ Developmental Toxicity test with Zebrafish embryos, conocido por sus siglas en inglés DTZ.

ya que se trata de conseguir concentraciones muy altas en volúmenes muy pequeños, del orden de μL^4 ó nL y, por lo tanto, la solubilidad es un factor limitante. Otro factor importante a tener en cuenta es que los compuestos son moléculas generalmente muy pequeñas y por ello quizá sean capaces de atravesar las membranas y circular libremente por el medio, independientemente de la vía de entrada del compuesto, de forma que se solubilizan y su efecto es menor al esperado.

La microinyección de Isoniazida y metil-mercurio muestra efectos más drásticos a concentraciones más elevadas que las ensayadas en el DTZ y en algunos casos a las 72 hpf. Por el contrario, 5-fluorouracilo, uretano e hidroxurea tienen efectos muy drásticos en la viabilidad del embrión, generando una mortalidad muy alta incluso a las 24 hpf. El compuesto talidomida, no muestra un efecto drástico sobre la viabilidad del embrión, como ya apuntaban otros estudios (Hagstrom & Lönning, 1977), posiblemente como consecuencia de la baja solubilidad de este compuesto en agua. Sin embargo, parece que los efectos fenotípicos observados concuerdan con los descritos en la bibliografía.

La microinyección no ha resultado eficaz para las aplicaciones previstas, con excepción de la microinyección de la microcistina LR para los estudios del pez cebra recombinante.

5.3.5. Utilización de peces cebra recombinantes

5.3.5.1. Secuencias homólogas en pez cebra

La lista de enzimas elegidos para el análisis de su expresión génica, en presencia y ausencia de los distintos compuestos seleccionados, es la que aparece en la tabla 11. Los números de acceso de las secuencias de DNA de cada una de las enzimas, así como del gen que se utilizará como control en la cuantificación (β -actina), se detallan en la tabla 12.

Tabla 11. Enzimas elegidas para el presente estudio

Enzima	Cianotoxina
γ -glutamyl transferasa	Microcistina- LR
Aspartato aminotransferasa	Microcistina- LR
Alanina aminotransferasa	Microcistina- LR
L-lactato deshidrogenasa	Microcistina- LR
Glutation-S-transferasa	Microcistina- LR

Tabla 12. Proteínas elegidas para el presente estudio

Gen	Número acceso
β -actina	NM_131031
Gamma-glutamyl transferasa	NM_200415
Aspartato aminotransferasa	NM_213379
Alanina aminotransferasa	BC061955
L-lactato deshidrogenada	NM_131246
Glutation-S-transferasa	NM_213394

Las LC_{50} y LC_5 de cada uno de los compuestos elegidos, se detallan en la tabla 13. La determinación de las LC_{50} y LC_5 de microcistina-LR y warfarin se describe más adelante.

Tabla 13. Concentraciones letales en el 50% y 5% del número de individuos, de los compuestos tóxicos estudiados

Compuesto	CAS	LC_{50} (mg/l)	LC_5 (mg/l)
MICROCISTINA-LR	101043-37-2		
ISONIAZIDA	54-85-3	20.322,689 +/- 10.110,325	8.366,553 +/- 4.097,548
METIL-MERCURIO	115-09-3	0,299 +/- 0,048	0,254 +/- 0,025
URETANO	51-79-6	5.182,625 +/- 575,459	3.232,958 +/- 1.031,742
VALPROICO	99-66-1	132,043	48,849
WARFARIN	81-81-2		

⁴ μL (picolitro = 10^{-12}); nL (nanolitros 10^{-9})

5.3.5.2. Obtención de RNA total

El análisis por electroforesis del RNA obtenido, tras poner a punto el método de extracción, con el kit Trizol Reagent de Invitrogen, muestra un RNA de alta calidad para ser utilizado como molde para la síntesis del cDNA (figura 151).

5.3.5.3. Síntesis de cDNA

Una vez obtenido el RNA total de las 39 muestras, se ha procedido a la síntesis de su cDNA con el kit ThermoScript RT-PCR System de Invitrogen, utilizando 500 nanogramos de RNA total, tras cuantificarlo mediante el espectrofotómetro Nanodrop.

De cada una de estas muestras, se realizaron 6 reacciones de RT-PCR (5 muestras más un gen control) para comparar la expresión de los genes a analizar en presencia y en ausencia de compuesto.

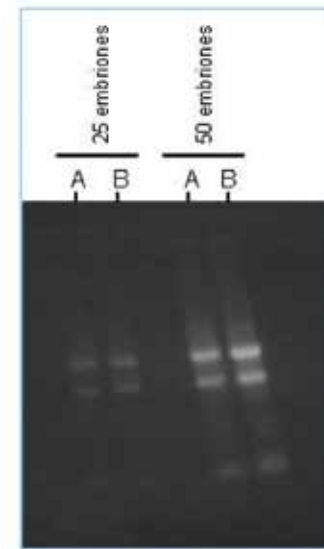
5.3.5.4. Diseño de oligonucleótidos para RT-PCR

Para el diseño de los oligonucleótidos necesarios para poder realizar la cuantificación, se hizo uso de herramientas bioinformáticas en red como la alojada en http://pathogene.swmed.edu/rt_primer/. La secuencia de los oligonucleótidos diseñados, así como sus características se detallan en la tabla 14.

Tabla 14. Características de los oligonucleótidos a emplear en la RT-PCR. Nombre del gen a amplificar; secuencia, temperatura de hibridación y tamaño del fragmento que resulta de la amplificación

Gen	Secuencia oligo (5'-3')	Tm oligo	Fto PCR (pb)
Glutation-S-transferasa	GST-f CTCCACTGGCCACATTCC	60	118
	GST-r CTCCTCATCTGGTGGAGGTT	60	
β-actina	β-actin-f CCCAGACATCAGGGAGTGAT	60	117
	β-actin-r CACAATACCGTCTCAATGG	60	
Gamma-glutamyl transferasa	GGT-f GTGTTGAACGAGACGCCATTG	61	124
	GGT-r CTGAGAAGTTGAAACCGTCCA	60	
Aspartato aminotransferasa	GGT-f GTGTTGAACGAGACGCCATTG	60	120
	GGT-r CTGAGAAGTTGAAACCGTCCA	60	
Alanina aminotransferasa	AlaAT-f CCGTGCAGATCGAGAAGGAA	60	121
	AlaAT-r ACCTGTCGGAAGAAGGTGATT	60	
L-lactato deshidrogenasa	LDH-f ATTCTGCTCGTTTCCGCTACT	60	120
	LDH-r CATTACACCACTCCACACAG	61	

Figura 151. Análisis electroforético de dos muestras de RNA total, obtenidas a partir de 25 y 50 embriones de pez cebra de 48 hpf, utilizando el kit Trizol Reagent (Invitrogen). Las muestras se cargaron por duplicado (A y B)



5.3.5.5. Cuantificación de los genes seleccionados

Antes de llevar a cabo la PCR cuantitativa se quisieron realizar algunas pruebas para determinar si los oligonucleótidos elegidos funcionaban correctamente en PCR (figura 152). Para ello, se realizó una PCR con DNA genómico aislado de embriones de pez cebra de 48 hpf (+DNA). Como control negativo, se ha realizado la misma reacción sin DNA genómico (-DNA), con el objetivo de ver si la banda de DNA amplificada es específica o si se trata de un artefacto. Por otro lado, se ha realizado una PCR utilizando como molde el cDNA sintetizado con el kit Thermo Script (Invitrogen) a partir del RNA total aislado de embriones de pez cebra de 48 hpf (+cDNA). Como control negativo se realizó una PCR con el cDNA sintetizado a partir de una muestra que no llevaba RNA total (-cDNA).

Como se observa en la figura 152, las bandas de DNA amplificadas se corresponden con los datos esperados.

Según estos resultados, podemos concluir que los oligos elegidos para amplificar el gen de β-actina son apropiados para realizar la PCR cuantitativa. A continuación, se realizaron experimentos similares con el resto de los genes seleccionados (figura 153).

De nuevo, las bandas de DNA amplificadas se corresponden con los datos esperados, por lo que podemos concluir que los oligos elegidos para amplificar los genes de las proteínas aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa son apropiados para realizar la PCR cuantitativa.

Figura 152. PCR sobre DNA genómico y RT-PCR sobre el cDNA sintetizado a partir de RNA total aislado de embriones de pez cebra de 48 hpf, utilizando los oligos que amplifican la proteína β-actina

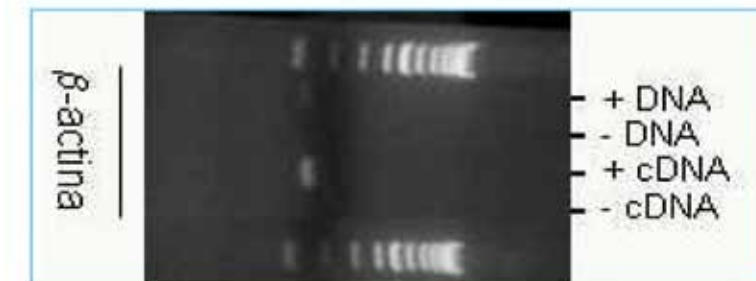
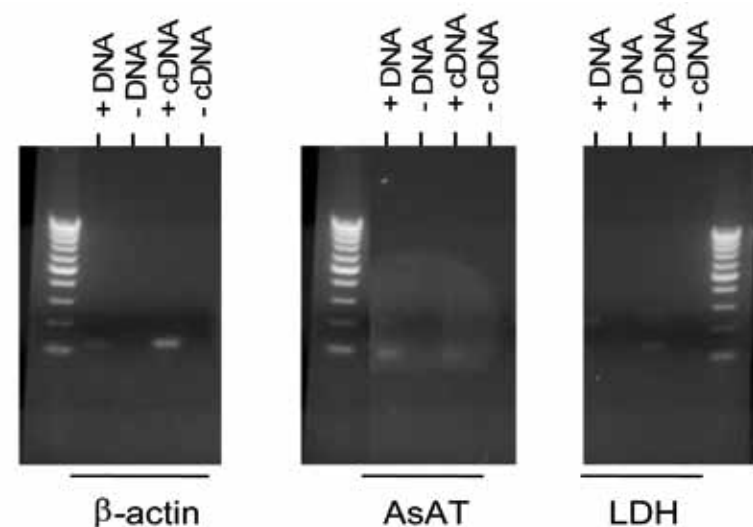


Figura 153. PCR sobre DNA genómico y RT-PCR sobre el cDNA sintetizado a partir de RNA total aislado de embriones de pez cebra de 72 hpf, utilizando los oligos que amplifican las proteínas β -actina (β -actin), aspartato aminotransferasa (AsAT) y lactato deshidrogenada (LDH)



El paso siguiente consistió en, de aquellos compuestos de los que se conoce su LC50 y su LC5 (isoniazida, metil-mercurio, uretano y ácido valproico), incubar un número de embriones suficiente para el estudio de la expresión génica. Para aquellos compuestos con LC50 desconocida (MC-LR y warfarin), hay que calcular las LC50 y LC5, de cada uno de ellos y, a continuación, incubar los embriones necesarios para el análisis de expresión.

5.3.5.6. Isoniazida, metil-mercurio, uretano y ácido valproico

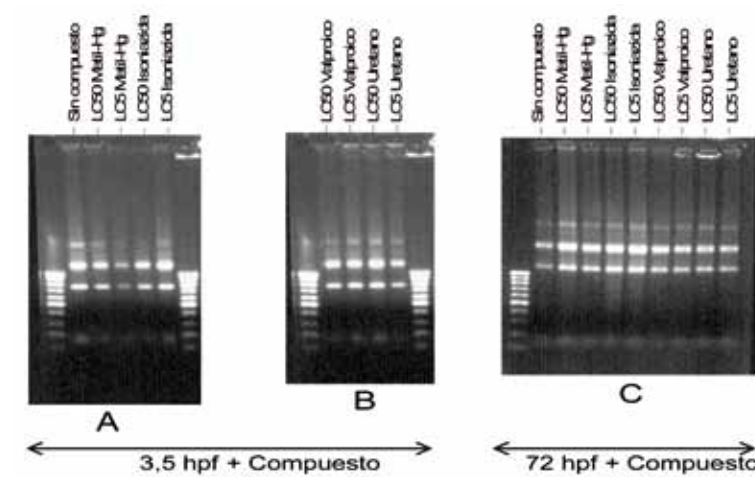
Se han expuesto embriones de pez cebra frente a isoniazida, metil-mercurio, uretano y ácido valproico a las concentraciones que determinan su LC50 y su LC5. Para obtener datos concluyentes y, puesto que se desconoce el patrón de expresión de los distintos genes seleccionados para el estudio, se decidió incubar los embriones en presencia de los distintos compuestos, siguiendo dos protocolos distintos:

- Incubación desde las 3,5 hpf: Los embriones se incuban hasta que cumplen 72 hpf (el hígado se encuentra en avanzado estado de desarrollo), realizándose cambios de medio cada 24 horas.
- Incubación a partir de las 72 hpf durante 20 horas más.
- En todos los casos y, con el objetivo de obtener una puesta de alta calidad, a las 3 hpf se realiza una lectura de viabilidad de las distintas puestas obtenidas y se cuantifica el número de embriones normales frente al de anómalos y al de no fecundados. La puesta se selecciona si posee más de un 60 por ciento de viabilidad. A continuación se incuban, como mínimo, 48 embriones en cada una de las condiciones a testar.

Paralelamente, se ha aislado RNA total de las distintas muestras a analizar. Para ello se han incubado 48 embriones a las concentraciones LC50 y LC5 de los siguientes compuestos: metil-mercurio, isoniazida, ácido

valproico y uretano, en las dos condiciones que se explican en el apartado anterior. En todos los casos, se han incubado el mismo número de embriones en medio sin compuesto para ser utilizado como control. Según esto, el número de embriones utilizados para realizar este objetivo ha sido de 1.000 embriones aproximadamente. Una representación de alguno de los distintos aislamientos de RNAs realizados se muestra en la figura 154.

Figura 154. Aislamiento de RNA total de embriones de pez cebra incubados en presencia de los siguientes compuestos: metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano a las concentraciones que indican su LC50 y LC5



- RNA total de embriones de pez cebra de 3,5 hpf, incubados en presencia de las concentraciones LC50 y LC5 de metil-mercurio e isoniazida.
- RNA total de embriones de pez cebra de 3,5 hpf, incubados en presencia de las concentraciones LC50 y LC5 de ácido valproico y uretano.
- RNA total de embriones de pez cebra de 72 hpf, incubados 20 horas en presencia de las concentraciones LC50 y LC5 de metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano.

Una vez obtenido el RNA total de las diferentes muestras, 20 en total (4 compuestos + 1 control X 2 concentraciones X 2 condiciones de incubación), se procedió a la síntesis de su cDNA con el kit **ThermoScript RT-PCR System de Invitrogen**. De cada una de estas muestras se realizaron 6 reacciones de RT-PCR (5 genes más un gen control) para comparar la expresión de los genes a analizar en presencia y en ausencia de compuesto. Según esto, el número de muestras del que se está obteniendo su cDNA es de 120 muestras (5 genes + un control X 20 muestras de RNA total). Este experimento se realizó por duplicado para obtener datos fiables. Tras comprobar que los oligos seleccionados son correctos, se procedió a la realización de la técnica qRT-PCR. Un resultado positivo para alguno de estos genes indicaría el potencial del mismo como indicador de hepatotoxicidad.

Para la cuantificación de los distintos genes seleccionados, se puso a punto la técnica siguiendo el protocolo descrito por la casa suministradora del kit **Power Sybr Green PCR Master Mix de Applied Biosystems**. Para ello se han utilizado dos concentraciones distintas de los oligos (50 ó 900 nM) y dos cantidades distintas de

cDNA por muestra (1 ó 2 microlitros). Se comienza realizando pruebas con el RNA extraído de embriones de 72 hpf, que no han sido incubados con ningún compuesto. El programa de RT-PCR empleado ha sido el siguiente (tabla 15).

Tabla 15. Programa de RT-PCR empleado en los embriones

Paso	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo (horas)
1	1 ciclo	50,0 °C	2:00
2	1 ciclo	95,0 °C	10:00
3	40 ciclos	95,0 °C	0:15
4 (Disociación)	1 ciclo	60,0 °C	1:00
		95,0 °C	0:15
		95,0 °C	0:15

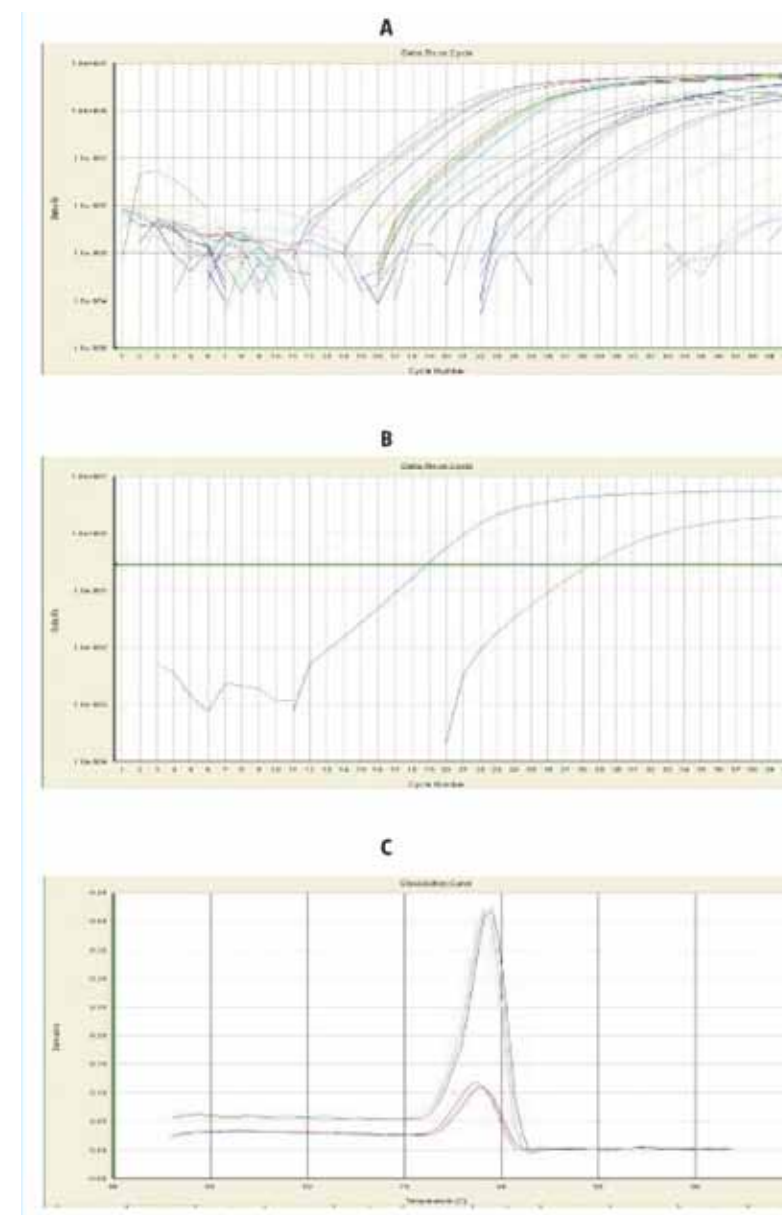
Como se puede observar en la figura 155 (A, B y C), se ha incluido un último paso de disociación con el objetivo de confirmar que el producto de PCR obtenido es específico.

Con estos resultados podemos concluir que para el análisis comparativo de la expresión de los distintos genes, en presencia o en ausencia de los diversos compuestos hepatotóxicos, utilizaremos 900 nM de cada oligonucleótido y un microlitro de cDNA por ensayo.

El análisis de los datos se ha realizado utilizando el método descrito en Livak K.J. & Schmittgen T.D. (2001).

Los resultados obtenidos se detallan en la figura 155 (A, B y C).

Figura 155. qRT-PCR sobre cDNA sintetizado a partir de RNA total aislado de embriones de pez cebra de 72 hpf



- A. Gráficas de amplificación obtenidas con los distintos genes seleccionados, en las que se han probado dos concentraciones de oligo y dos concentraciones de cDNA.
- B. Ejemplo de amplificación en la que se compara la expresión del gen β -actina con 50 nM (línea roja) ó 900 nM (línea azul) de oligonucleótidos.
- C. Curva de disociación en la que se observa que el producto de amplificación obtenido con los oligos de β -actina es específico.

El resultado obtenido del experimento, con embriones de 3,5 hpf, incubados con metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano hasta las 72 hpf, se detalla en la figura 156.

Como se puede observar, parece que los dos únicos genes que manifiestan una expresión aumentada en presencia de ciertos compuestos hepatotóxicos son los enzimas γ -glutamyl transferasa y, en menor grado, glutathion-S-transferasa. Este experimento se repitió y el resultado obtenido se muestra en la figura 157.

En este caso no se ha podido concluir nada porque alguna de las muestras de control ha fallado y no se han podido calcular los niveles de expresión relativa. Se repitió el ensayo con nuevas muestras, produciendo el resultado observado en la figura 158.

Agrupando los datos obtenidos con los experimentos realizados al incubar los embriones desde las 3,5 hpf, podemos concluir que los enzimas γ -glutamyl transferasa y glutathion-S-transferasa (en menor grado) se inducen en presencia de compuestos hepatotóxicos.

El resultado del experimento, con embriones de 72 hpf, incubados con metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, durante 20 horas, se detalla en la figura 159.

Los datos obtenidos muestran una expresión incrementada del enzima aspartato aminotransferasa (Asp-AT), en la mayoría de los casos, y de glutathion-S-transferasa, en el caso del uretano, a la LC50.

Este experimento se realizó por duplicado y el resultado se observa en la figura 160.

Figura 156. Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina aminotransferasa (Ala-AT), L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutathion-S-transferasa (GST), en presencia o ausencia, de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, en embriones de 3,5 hpf. En esta gráfica no están representadas las concentraciones MeHg-LC5, Iso-LC50 y Val-LC5, porque fallaron las reacciones.

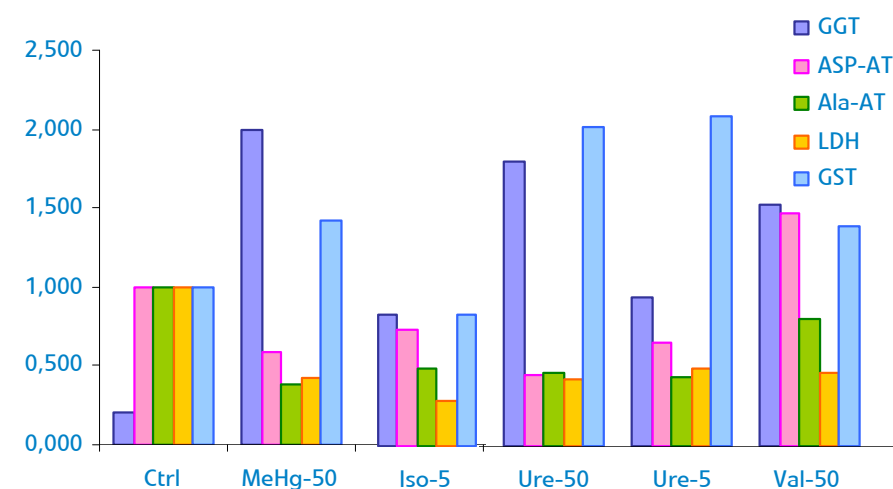


Figura 157. Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en presencia o en ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, en embriones de 3,5 hpf. Repetición del experimento anterior.

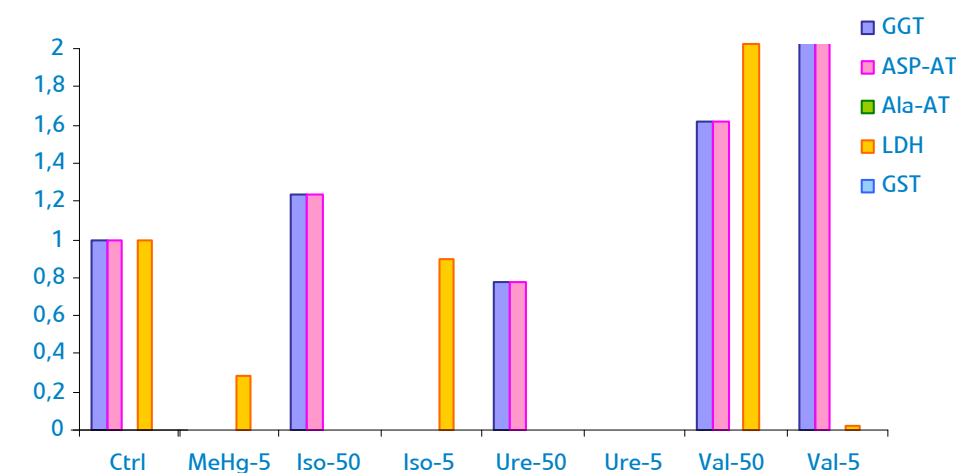


Figura 158. Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en presencia o ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano en embriones de 3,5 hpf. Repetición del experimento anterior con nuevas muestras.

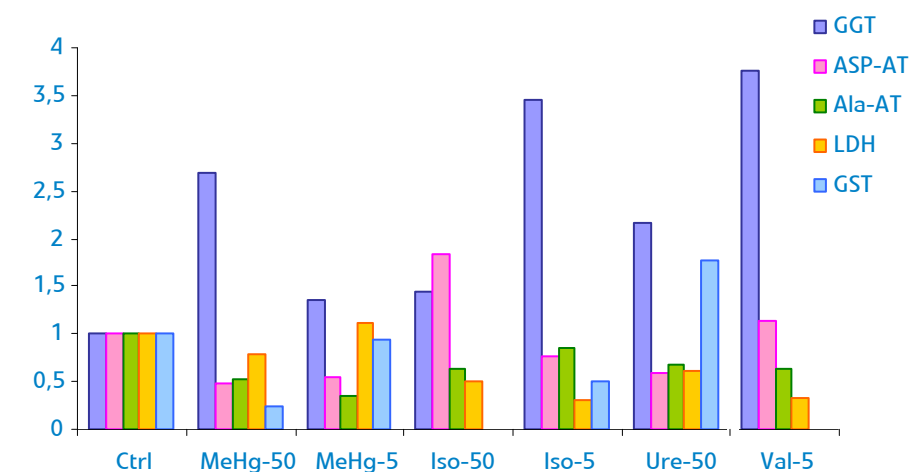


Figura 159. Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina aminotransferasa (Ala-AT), L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutation-S-transferasa (GST), en presencia o en ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano en embriones de 72 hpf. En esta gráfica no está representadas las concentraciones MeHg-LC5, Iso-LC50 y Val-LC5, porque fallaron las reacciones. Repetición del experimento anterior con nuevas muestras.

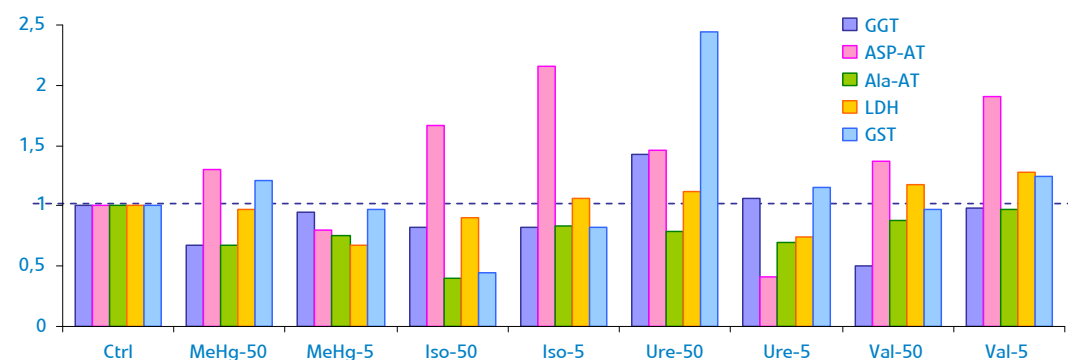
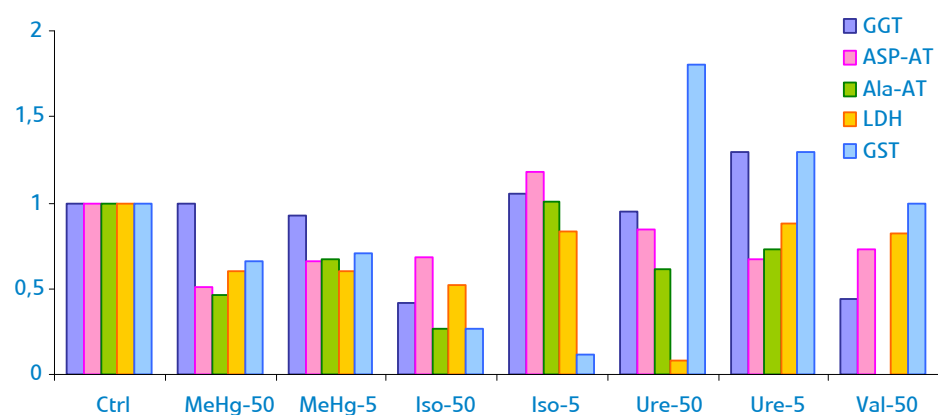


Figura 160. Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en presencia o en ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, en embriones de 72 hpf. Repetición del experimento anterior.



Como se puede observar, el resultado no muestra claramente una inducción enzimática como la observada con anterioridad, por lo que se decidió realizar un nuevo análisis. El resultado obtenido se muestra en la figura 161.

La repetición de este ensayo corrobora el resultado obtenido con anterioridad, es decir, la expresión de estas enzimas no se ve aumentada cuando los embriones tienen 72 hpf y se incuban, a esta edad, durante 20 horas, con los distintos compuestos tóxicos elegidos. Esto podría ayudar a la hora de diseñar el protocolo de incubación de los peces cebras transgénicos, al seleccionar embriones transgénicos y no adultos, para la incubación con el agua a testar.

El resultado obtenido del experimento, con embriones de 48 hpf, incubados con metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano hasta 96 hpf, se detalla a continuación.

Como se comentó anteriormente, pensando en la posibilidad de construir el pez cebrá transgénico y en los ensayos apropiados para el testado del agua una vez estuviera construido este modelo (utilizando embriones o larvas), se entendió oportuno realizar un estudio de expresión génica partiendo de embriones que hubieran estado en presencia del compuesto desde las 48 hpf. De esta forma, se conseguiría un estudio de expresión, tratando los embriones en diferentes estadios del desarrollo. Con este objetivo en mente, aunque no estaba contemplado en el proyecto, se decidió analizar la expresión génica de los distintos enzimas en embriones de una edad de 48 hpf incubados hasta que cumplieron las 96 hpf. El estudio se realizó por duplicado y el resultado de las dos réplicas se muestra en la figura 162.

El análisis de los datos obtenidos revela que, en estas condiciones, los enzimas que ven incrementada su expresión en presencia de compuestos hepatotóxicos son γ -glutamyl transferasa y glutation-S-transferasa, en menor grado, como ocurriría si se les incubaba desde las primeras horas de vida. La aspartato aminotransferasa parece que se induce un poco cuando los embriones se crecen en presencia de ácido valproico.

Figura 161. Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en presencia o ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano en embriones de 72 hpf. Repetición del experimento anterior, con nuevas muestras.

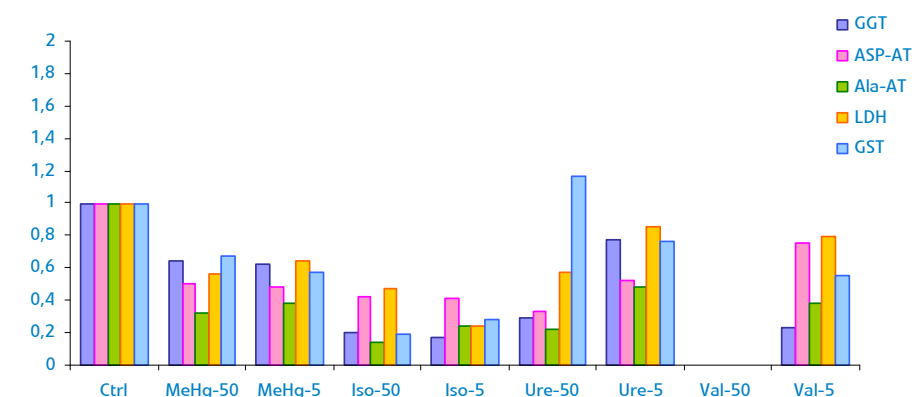
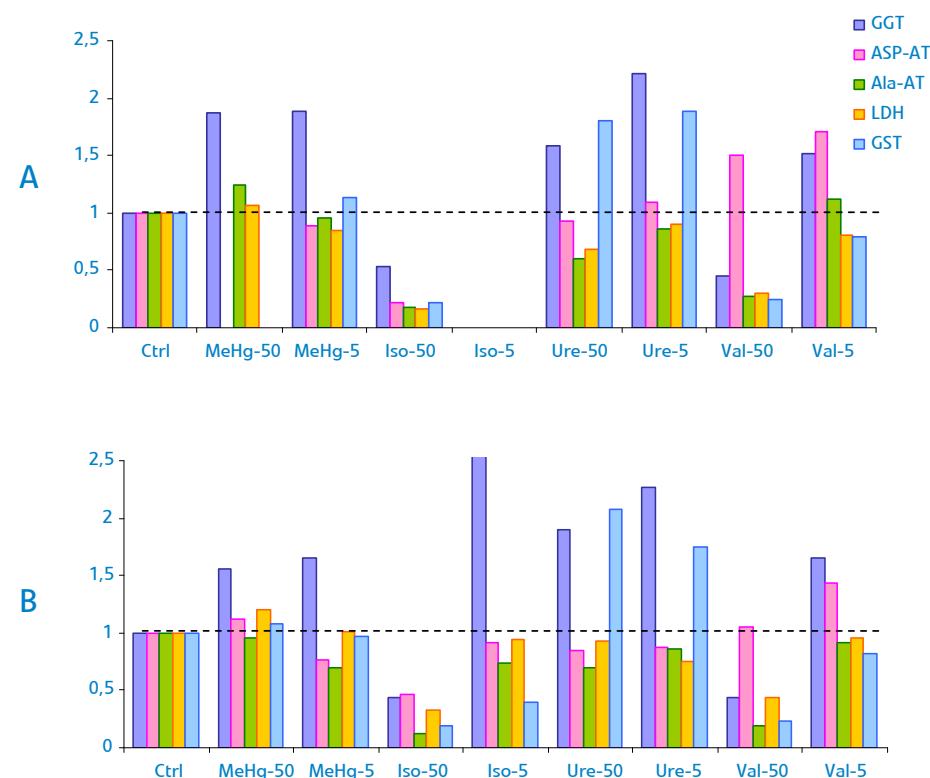


Figura 162. Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina aminotransferasa (Ala-AT), L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutation-S-transferasa (GST), en presencia o en ausencia de la LC50 y LC5, de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, en embriones de 48 hpf.



5.3.5.7. Microcistina-LR

Antes del análisis génico los primeros datos a obtener son la LC50 y LC5 de la MC-LR en embriones de pez cebra.

Para el cálculo de la LC50 y la LC5 de microcistina-LR se procedió a realizar el test DTZ (developmental toxicity test), desarrollado por ZF Biolabs.

Antes de comenzar el test de toxicidad de la microcistina-LR, se procedió a realizar una recopilación de datos científicos publicados con el objetivo de obtener un valor orientativo de la LC50. Tras esta búsqueda, se concluyó que la LC50 de la microcistina está en torno a 1 miligramo por litro. Según esto, se incubaron 24 embriones en agua de embriones con uno por ciento DMSO (dimetilsulfóxido), sin compuesto, y otros 24 embriones en MC-LR a razón de un miligramo por litro, disuelta en el mismo medio.

Este experimento se repitió dos veces más, con distintas puestas. Los datos obtenidos, tras las lecturas de 3,5 hpf y 72 hpf, se representan en la figura 163.

Protocolo experimental para el cálculo de la LC50 y la LC5 de microcistina-LR

1. Elección de puestas aptas para el test a las 3 hpf basada en criterios morfológicos, cualitativos y en el cálculo aproximativo de su tamaño, para cubrir el espectro de muestra requerido.
2. Inmediatamente después, carga de los embriones en placas de 96 pocillos, con 50 μ l por pocillo de control o sustancia tóxica a diferentes concentraciones, e incubación a 26°C.
3. Lectura, a las 3:30-4:00 hpf, de los mismos embriones, anotando el estado que presenten: normal, anómalo o coagulado, según el caso.
4. Incubación a 26°C.
5. Lectura a las 24 \pm 1 hpf, diferenciando entre embriones vivos por un lado y con signos de letalidad o directamente coagulados, por otro.
6. Se cambia el 75 por ciento del medio a las 24h \pm 1,5h y se incuba de nuevo a 26 \pm 1°C hasta la siguiente lectura.
7. Lectura a las 48 \pm 1.5 hpf, diferenciando entre embriones normales y embriones que portan algún tipo de malformación considerando los *endpoints* que aparecen en la Tabla 16.
8. Recopilación y análisis de datos. Los cálculos estadísticos se realizan mediante el programa Probit 1.5, habilitado por la Environmental Protection Agency norteamericana (EPA).

El protocolo experimental utilizado en estos ensayos se detalla seguidamente.

Como se observa en la figura 163, esta concentración no afecta la viabilidad de los embriones de pez cebra. Basados en estos datos, se procedió a realizar un nuevo test a mayores concentraciones, de 15, 8, 4, 2 y 0,5 miligramos por litro. El análisis de los datos obtenidos (no se muestra) indica que, ni siquiera a la mayor concentración, parece haber un claro efecto sobre la viabilidad de los embriones hasta las 48 hpf (última lectura realizada en el DTZ para calcular la LC50).

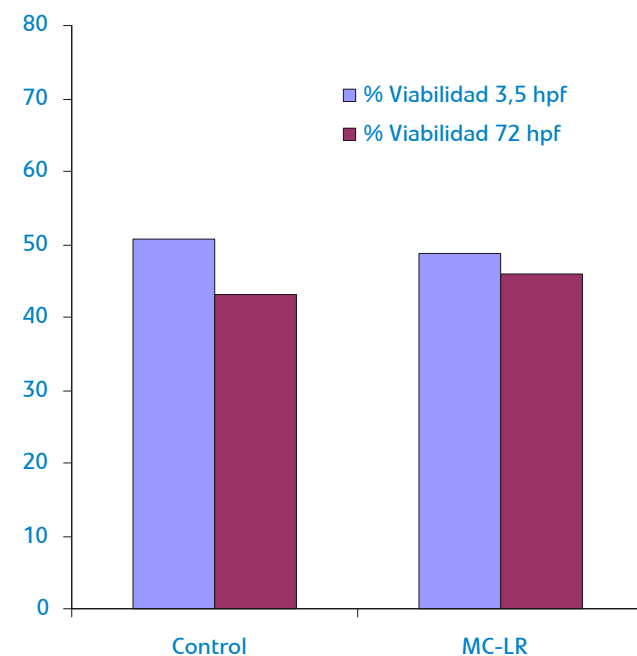
Para corroborar que la concentración de MC-LR era la que debía, se envió al laboratorio de la subdirección de Calidad de las Aguas de Canal de Isabel II una parte alícuota del stock, para que confirmasen dicha concentración. Sus resultados indicaron que la concentración de MC-LR testada era la mitad de lo que se pensaba.

Con los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta la falta de homogeneidad existente entre los distintos estudios publicados con pez cebra y con MC-LR (Mizell et al., 1997; Oberemm et al.,

Tabla 16. Tipos de malformaciones que presentan los embriones expuestos a tóxicos

Malformaciones (48 hpf)
Circulación sanguínea
Encéfalo
Notocorda
Ojo
Vesícula ótica
Edema
Aletas medianas
Pigmentación
Yema
Cabeza
Cola

Figura 163. Porcentaje de viabilidad de embriones de pez cebra incubados con 1 mg/l de microcistina-LR (MC-LR), comparados con un control sin compuesto. Los datos proceden de la media de tres experimentos distintos.



1999; Wiegand et al., 1999; Oberemm et al., 1997; Jacquet et al., 2004), se decidió realizar dos nuevas aproximaciones:

- descornizar los embriones antes de ser incubados con microcistina-LR (MC-LR) y,
- microinyectar el compuesto directamente en el embrión.

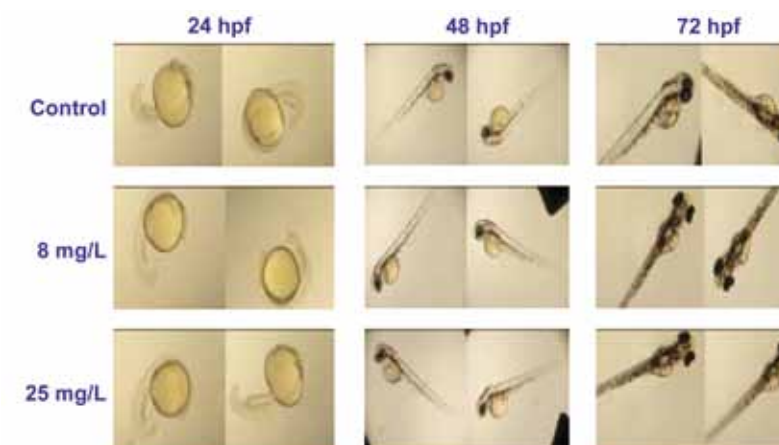
En la incubación de embriones descornizados con microcistina-LR, el protocolo seguido ha sido el siguiente:

Protocolo para la incubación de embriones descornizados con microcistina-LR (MC-LR)

1. Elección de puestas aptas para el test a las 3 hpf, basada en criterios morfológicos cualitativos y en el cálculo aproximativo de su tamaño, para cubrir el espectro de muestra requerido.
2. Incubación de los embriones en Pronasa 50 µg/ml disuelta en agua de embriones durante 15 minutos.
3. Eliminación de los corion pasando suavemente los embriones por una pipeta Pasteur.
4. Lavado de los embriones descornizados 3-4 veces con agua de embriones con un uno por ciento de DMSO (Dimetilsulfóxido).
5. Incubación de los embriones en placas P12 con MC-LR, a las distintas concentraciones seleccionadas (25, 15, 8, 4, 2 y 0,5 mg/l) durante 15 minutos, a 26°C.
6. Eliminación del compuesto e incubación de los embriones en agua de embriones sin DMSO, a 26°C.
7. Lectura a las 24 ± 1 hpf; diferenciar entre embriones vivos, por un lado; o con signos de letalidad o directamente coagulados, por otro.
8. Cambio del 75 por ciento del medio a las 24h ± 1,5h e incubación a 26 ± 1°C, hasta la siguiente lectura.
9. Lectura a las 48 ± 1,5 hpf, diferenciando entre embriones normales y embriones que portan algún tipo de malformación, considerando los *endpoints* mencionados anteriormente.
10. Recopilación y análisis de datos.

Los resultados obtenidos a partir de este experimento se detallan en la figura 164.

Figura 164. Embriones de 3,5 hpf, descornizados, tratados con distintas concentraciones de MC-LR(8 mg/l y 25 mg/l) durante 15 minutos. Imágenes tomadas a las 24, 48 y 72 hpf



El análisis de los datos obtenidos no muestra que la MC-LR provoque un efecto evidente sobre el desarrollo del pez cebra en estas condiciones, posiblemente debido a que el tratamiento de 15 minutos no es suficiente. Para intentar solucionar esta falta de efecto y así conseguir embriones que manifiesten algún tipo de malformación provocado por la MC-LR para aislar su RNA y realizar el estudio genético, se repitió el ensayo tratando a los embriones con el compuesto durante más tiempo. En este caso, se incubaron los embriones según el protocolo del DTZ (a partir de 3.5 hpf) y durante 24 horas, resultando que el número de embriones que quedaron vivos a las 24 hpf fue muy bajo y no se pudieron obtener datos fiables. Por otro lado, simultáneamente a la realización de estos experimentos, se obtuvieron datos satisfactorios con la microinyección de la MC-LR por lo que se decidió no continuar con el desarrollo del DTZ en embriones descorionizados.

Paralelamente, y siguiendo las pautas de microinyección basadas en el protocolo desarrollado en ZF Biolabs, se procedió a la microinyección de microcistina-LR. El protocolo detallado se describe a continuación.

Protocolo detallado de pautas de microinyección con el protocolo ZF Biolabs

1. Depositar los embriones en una placa de agar (1,5 por ciento) en la que existen ranuras para facilitar la colocación de los mismos.
2. Cargar la aguja de microinyección con la solución de compuesto a testar.
3. Colocar la aguja en el inyector, ajustar la presión de cada pulso y medir el volumen de cada microgota en el microscopio, anotando el diámetro para poder calcular el volumen que expulsa.
4. Con la ayuda del manipulador se procede a microinyectar los embriones con 10 nl de solución en el corion y la yema para alcanzar la unión entre la yema y el blastodisco.
5. Añadir agua de embriones al molde para despegar los embriones del agar y depositarlos en una placa Petri.
6. Colocar los embriones individualmente en los pocillos de una placa de 96 con una micropipeta.
7. Incubar a 26,5°C hasta sus posteriores lecturas.
8. Los experimentos de microinyección de MC-LR realizados para la obtención de datos concluyentes se muestran en la tabla 5.12 (las columnas muestran el número de concentraciones ensayadas cada vez y, finalmente, los nanolitros microinyectados).

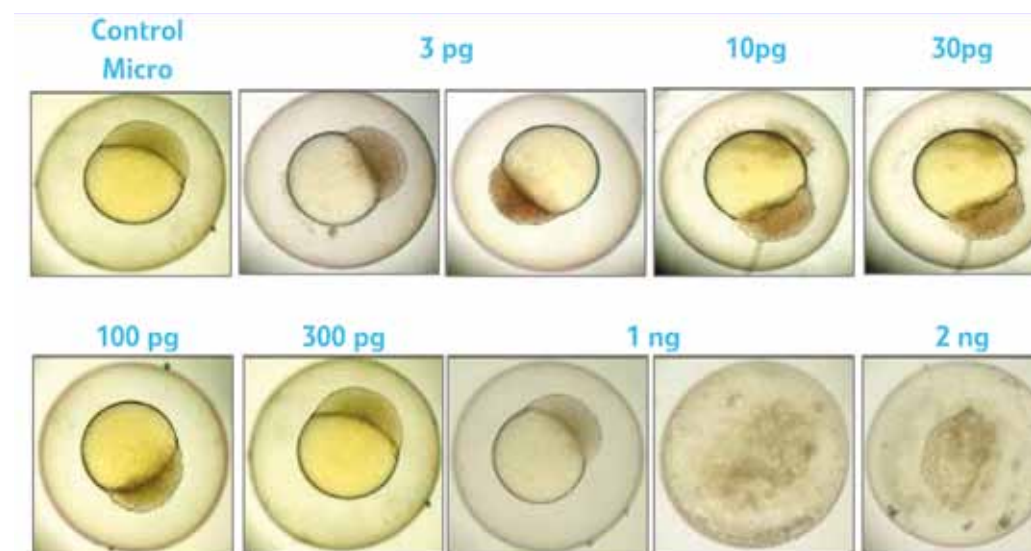
Tabla 17. Experimentos de microinyección de MC-LR

Agua gr / L	1% DMSO gr / L	Agua gr / L	Agua gr / L	Agua gr / L	picogramos
0,2		0,2	0,2	0,2	2.000
0,125		0,1	0,1	0,1	1.000
			0,05	0,05	500
	0,02	0,03	0,03	0,03	300
	0,01	0,01	0,01	0,01	100
		0,003	0,003	0,003	30
	0,002	0,001	0,001	0,001	10
		0,0003	0,0003	0,0003	3
10 nl	10 nl	10 nl	10 nl	2 nl	

Si recopilamos los datos obtenidos con estos experimentos, vemos que el fenotipo que se desarrolla es el siguiente:

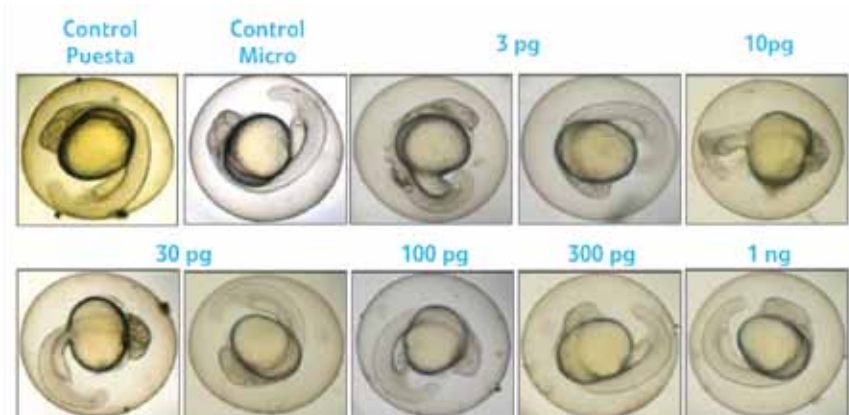
- Lectura a 3,5 hpf: A concentraciones elevadas, los embriones mueren antes de las 3,5 hpf (figura 165).

Figura 165. Lectura del fenotipo a 3,5 hpf



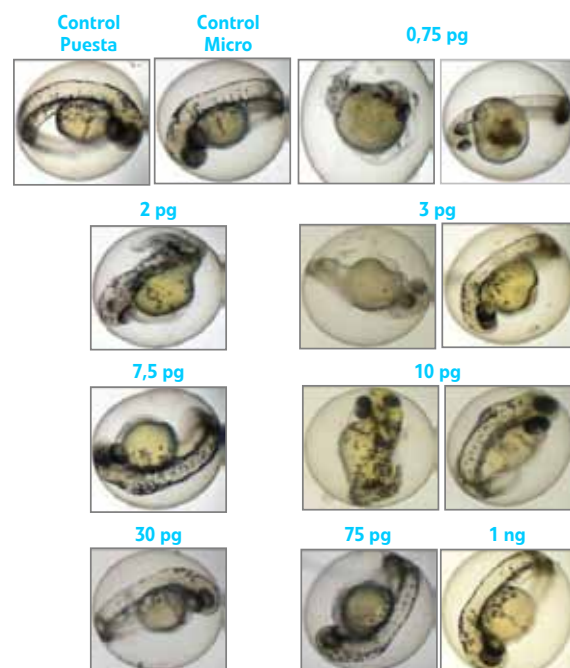
- Lectura a 24 hpf: Con estas lecturas no podemos obtener mucha información puesto que los *endpoints* que se observan son mayoritariamente morfológicos, aunque sí se ve una predisposición al edema y cola malforme en algunos casos. Este fenotipo se corroboró a las 48 hpf (figura 166).

Figura 166. Lectura del fenotipo a 24 hpf



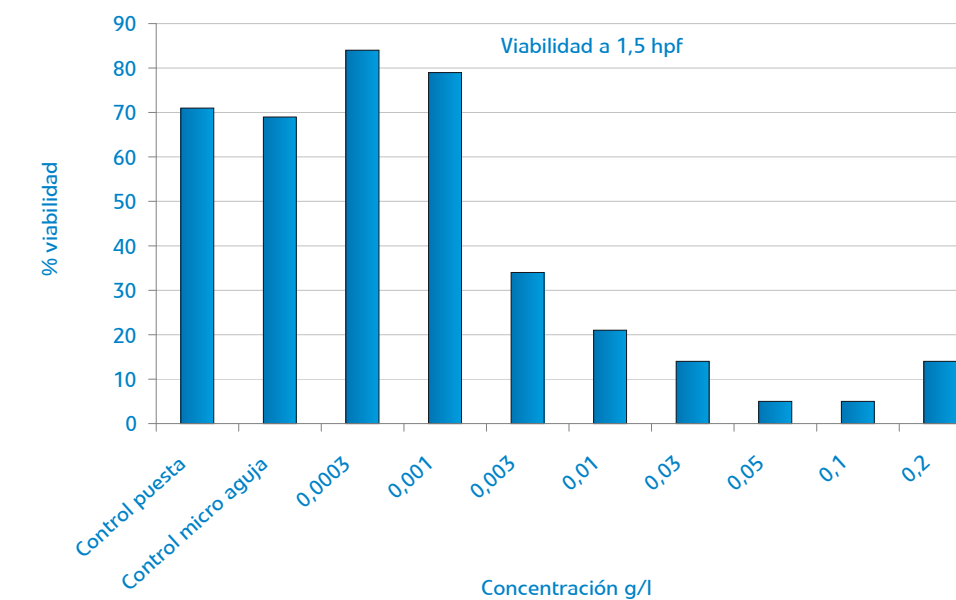
- Lectura a 48 hpf: Esta lectura es la más importante y en ella se tienen en cuenta endpoints morfológicos y funcionales. Como se puede ver, la mayoría de las malformaciones producidas afectan a la cola (curvaturas y contorsiones) así como al aparato circulatorio (edemas y agrandamiento de la cavidad pericárdica) (figura 167).

Figura 167. Lectura del fenotipo a 48 hpf



La representación gráfica del porcentaje de viabilidad frente a la concentración microinyectada nos muestra una LC50 de MC-LR microinyectada de 4 mg/l, (figura 168).

Figura 168. Determinación de la LC50 de la MC-LR microinyectada en embriones de pez cebra



Con este dato ya se pueden obtener embriones microinyectados suficientes para el análisis génico. Una vez microinyectados, se dejaron crecer los embriones hasta alcanzar las 54 hpf y, a continuación, se procedió a la obtención de su RNA (figura 169) y a la síntesis de sus cDNAs.

Para el análisis de expresión génica, el ensayo se realizó por duplicado y de cada uno se hicieron dos réplicas. El resultado se muestra a continuación (figura 170).

Figura 169. Aislamiento de RNA total de embriones de pez cebra microinyectados con MC-LR correspondiente a una EC50 de 4 mg/l. La figura muestra el RNA aislado de dos puestas distintas

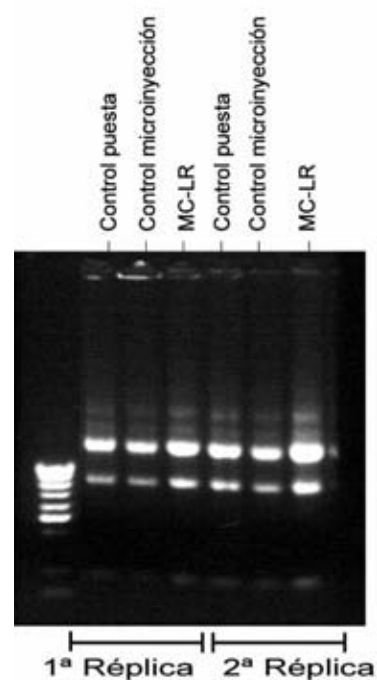


Figura 170. Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT); aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina aminotransferasa (Ala-AT); L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutatión-S-transferasa (GST), en embriones de pez cebra no microinyectados (control puesta), microinyectados con el buffer de microinyección (control micro) y microinyectados con MC-LR a 4 mg/l

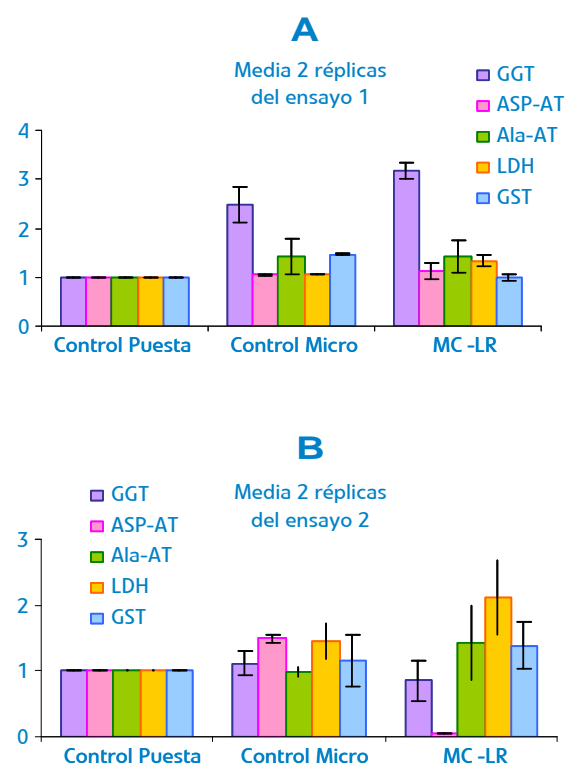
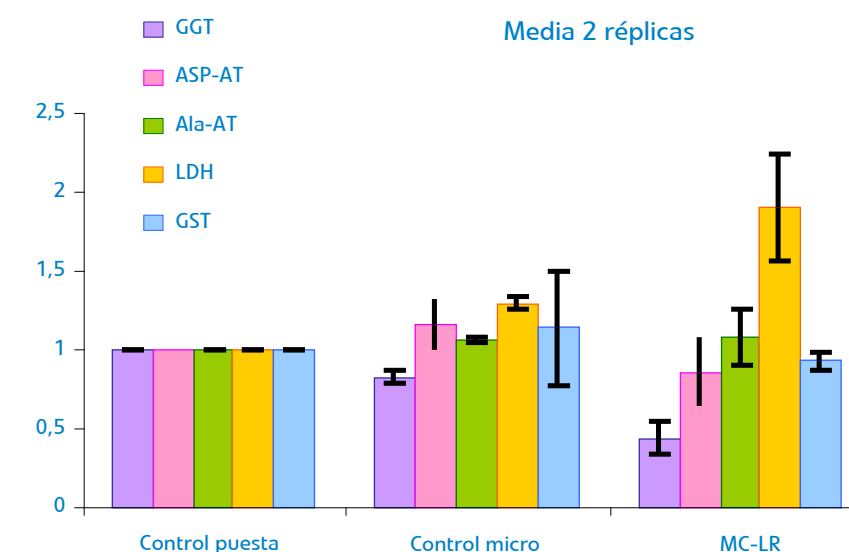


Figura 171. Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en embriones de pez cebra, no microinyectados (control puesta), microinyectados con el buffer de microinyección (control micro) y microinyectados con MC-LR a 4 mg/l. A. Media de dos réplicas del ensayo 1. B. Media de dos réplicas del ensayo 2. Repetición del experimento anterior.



Como puede observarse, la reproducibilidad entre réplicas es muy buena; sin embargo, la reproducibilidad que hay entre dos días distintos disminuye. Según esto, se decidió repetir el ensayo para confirmar el dato correcto. El resultado se muestra en la figura 171.

El análisis de los datos obtenidos al comparar la expresión génica de los distintos enzimas seleccionados microinyectando o no MC-LR, no muestra un patrón similar al obtenido al crecer los embriones en presencia de los otros compuestos tóxicos. Para corroborar estos datos sería necesario repetir estos ensayos microinyectando MC-LR a distintas concentraciones y analizar los niveles de expresión en cada caso. Sin embargo, al tratarse de una técnica distinta a la empleada con el resto de los compuestos, no se puede descartar que el efecto observado no sea debido a ello.

Otra alternativa para estudiar la expresión de estos genes en presencia de microcistina, podría implicar la incubación de embriones en agua que contenga cepas de cianobacterias tóxicas (*microcystis*, *planktothrix*, etc.) y su posterior estudio génico.

5.3.5.8. Warfarin

Antes del análisis génico, los primeros datos a obtener son la LC50 y LC5 del pesticida Warfarin en embriones de pez cebra.

Para el cálculo de la LC50 de este compuesto en pez cebra se siguió el protocolo de toxicidad DTZ, desarrollado en ZF Biolabs. Haciendo una revisión bibliográfica de los datos publicados de la LC50 del Warfarin en otros organismos, se decidió comenzar el test con las concentraciones (miligramos por litro) siguientes: 10; 5; 3,33; 2,22; 1,48; 0,988 y 0,6584 mg/l (tabla 18, columna I).

El resultado obtenido con estas concentraciones mostró que la viabilidad, incluso a la máxima concentración testada, era igual que la del control, por lo que se decidió aumentar el rango de concentraciones a testar. En este caso, las concentraciones fueron: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56 y 0,78 mg/l., (tabla 18, columna II).

Este experimento se repitió dos veces más, añadiendo las concentraciones de 150 y 200 mg/l (tabla 18, columnas III y IV).

Los resultados obtenidos a partir de estos dos últimos experimentos no son totalmente válidos puesto que es necesario realizar un control de acetona (el Warfarin se ha diluido en 100% acetona porque es muy insoluble en agua) y en dicho control (1% acetona), la viabilidad a las 48 hpf disminuyó con respecto al control de puesta.

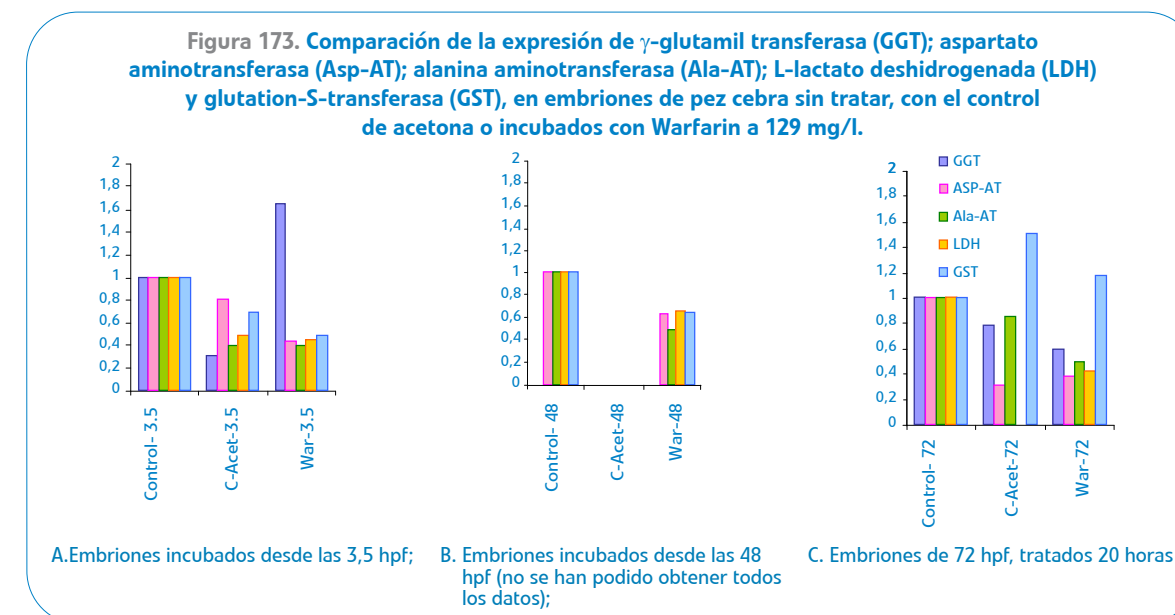
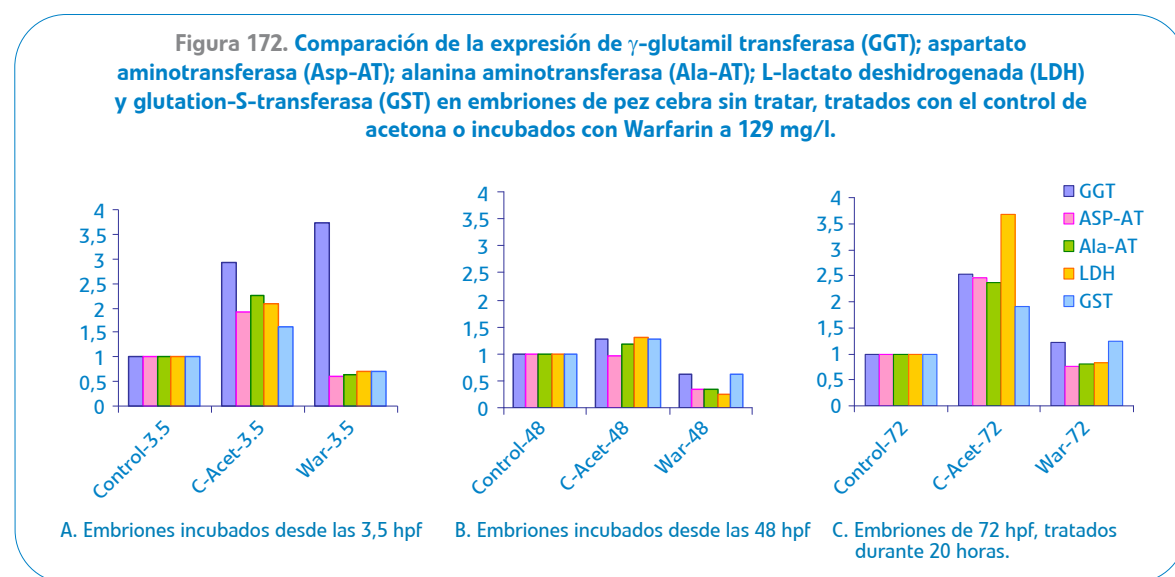
En el tercero de los experimentos se pudo obtener una EC50 de 129 mg/l.

Tabla 18. Experimentos realizados para calcular la LC50 del Warfarin

	I	II	III	IV
			200	200
			150	150
		100	100	100
		50	50	50
		25	25	25
10		12,5	12,5	12,5
5		6,25	6,25	6,25
3,33		3,13	3,13	3,13
2,22				
1,48		1,56		
0,99				
0,66		0,78		

El análisis comparativo de la expresión de los distintos genes seleccionados en presencia o en ausencia de Warfarin se realizó creciendo los embriones en contacto con la concentración que determina la EC50 de dicho compuesto. Tras el aislamiento del RNA y de la síntesis de cDNA de estas muestras, se procedió a realizar la qRT-PCR. Los datos obtenidos se indican en la figura 172.

El análisis de los primeros datos obtenidos, muestra una inducción del mismo gen que se inducía en las anteriores condiciones con los otros compuestos testados: γ -glutamyl transferasa al incubar los embriones desde el principio. Este experimento se repitió de nuevo partiendo de un stock que contenía una concentración de acetona menor, con el objetivo de evitar los efectos causados por este disolvente sobre la expresión de los genes a estudio. Los resultados se detallan en la figura 173.



En este caso, aunque no se observa una inducción tan pronunciada como en el anterior experimento, sí se puede apreciar un incremento de la expresión del enzima gamma-glutamyl transferasa cuando se incuban los embriones desde las 3,5 hpf.

Por todo lo explicado anteriormente y basado en los resultados obtenidos hasta el momento, podemos decir que el gen que codifica para la gamma-glutamyl transferasa podría ser un gen idóneo para la construcción de un pez cebra transgénico, fusionando el promotor de este gen delante del gen que codifica para la proteína fluorescente verde.

5.3.5.9 Resultados de la aplicabilidad de la utilización de peces cebra recombinantes

De los 5 genes seleccionados para el estudio, el gen de la γ -glutamyl transferasa, puede ser un candidato adecuado para la construcción de un pez cebra transgénico que sea capaz de detectar compuestos tóxicos en el agua. Este pez transgénico, portaría el promotor del gen de la γ -glutamyl transferasa fusionado delante del gen que codifica la proteína fluorescente verde.

La expresión de este gen es mayor cuando los embriones se incuban en presencia del compuesto tóxico desde las primeras horas de vida, por lo que para la detección de compuestos tóxicos en el agua se emplearían embriones de pez cebra transgénico y no individuos adultos.

6

Contraste de resultados

Uno de los objetivos del proyecto consiste en analizar la aplicabilidad de los diversos test de biotoxicidad mediante el pez cebra, con las aguas naturales o tratadas de Canal de Isabel II.

Con el fin de contrastar los protocolos de los bioensayos, se han probado los diversos tipos de aguas y situaciones a lo largo del período de estudio tanto de las muestras de los embalses, como de las ETAP, aplicando los test de toxicidad desarrollados.

Durante el desarrollo de las pruebas, una parte considerable del tiempo se caracterizó por la falta de situaciones o tipos de agua que pudieran dar positivos en los test empleados, lo que supuso la preparación de muestras diversas, en algunos casos ajenas a las aguas naturales, dopándolas con compuestos tóxicos y peligrosos para la salud humana, según la fichas de seguridad de los productos.

Por otro lado, cuando se produjeron crecimientos importantes de cianofíceas, potencialmente productoras de toxinas, aun siendo embalses y ETAP diferentes a las previstas, también se trasladaron para su contraste.

Se han enviado un total de 223 muestras a ZF Biolabs para realizar los contrastes y bioensayos pertinentes. De éstas, 19 son muestras preparadas o en las que se podrían esperar resultados singulares (agua destilada, agua destilada dopada con diferentes compuestos, muestras duplicadas, muestras dopadas y muestras especiales, sospechosas de un alto nivel de biotoxicidad).

Por último, se han cruzado los positivos encontrados por ZF Biolabs mediante el test FTZ con los análisis regulares que aplica el Laboratorio de la subdirección de Calidad de las Aguas, de acuerdo al R. D. 140/2003, con el fin de buscar probables interrelaciones entre los test de toxicidad y las posibles incidencias de calidad en las aguas de los embalses y ETAP.

En las tablas siguientes se pueden observar las muestras con potencial toxicológico positivo y, en contraste, las preparadas en Canal de Isabel II o recogidas en otros embalses, con el fin de contrastar la eficacia de los diversos test.

6.1. Muestras positivas de los bioensayos

A los resultados de las muestras se les ha aplicado un tratamiento estadístico que refleja significativamente el potencial toxicológico, para un 75 ó un 95 por ciento de probabilidad. En las ocasiones en las que se disponía de muestra para hacer repeticiones, se ha estimado la suma de toxicidad, valor más exacto al disponer de un número "n" de casos, superior. Es por esto que se considera con toxicidad significativa las muestras que presentan un potencial toxicológico positivo al 95 por ciento, o las que presentan toxicidad en la suma. Cuando el valor es positivo al 75 por ciento en el potencial toxicológico, se consideran indicativo aunque no definitivo.

Tras aplicar el test FTZ, se han obtenido resultados positivos en 38 casos. De éstos, 35 corresponden a un potencial toxicológico positivo, 12 han dado resultados positivos al 95 y 75 por ciento y las 23 restantes sólo al 75 por ciento (valor indicativo pero no definitivo). El resto corresponden a muestras con potencial toxicológico negativo, pero con toxicidad en la suma. (Ver tabla 19).

Tabla 19. Muestras con resultados positivos al 75 y 95 por ciento de potencial toxicológico y con suma de toxicidad según el test FTZ

Nº	Punto de muestreo	Profundidad	Fecha muestreo	Observaciones	Potencial toxicológico al 95%	Potencial toxicológico al 75%	FTZ: Observaciones
1	Preparado con HP	Preparado	23/08/2007	Agua destilada + benzo (b) fluoranteno: 9ml de 10 ppm => 0,045ppm, Indeno (1,2,3-c,d) pireno: 2,5ml de 10 ppm => 0,0125ppm, heptachlor-epóxide: 1 ml de 100ppm => 0,05ppm	-	-	Toxicidad al 75%
2	Embalse	0	05/07/2007		+	+	Toxicidad al 75%
3	Embalse	8	12/04/2007		-	+	Toxicidad al 75%
4	Embalse	16	19/07/2007		+	+	Toxicidad al 95%
5	ETAP	Entrada	26/07/2007		-	+	Toxicidad al 75%
6	ETAP	Entrada	30/07/2007		-	+	Toxicidad al 75%
7	ETAP	Salida	17/07/2007		-	+	Toxicidad al 75%
8	ETAP	Salida	09/07/2007		-	+	Toxicidad al 75%
9	Embalse	9	21/06/2007		+	+	Toxicidad al 75%
10	Embalse	0	21/06/2007	Muestra por duplicado	-	+	Toxicidad al 95%
11	Embalse	P1	11/05/2007	Mortandad de peces	+	+	Toxicidad al 75%
12	Embalse	P2	11/05/2007	Mortandad de peces	-	+	Toxicidad al 75%
13	ETAP	Entrada	31/05/2007	Bloom de algas	-	+	Toxicidad al 75%
14	ETAP	Entrada	31/05/2007	Bloom de algas	+	+	Toxicidad al 75%
15	Embalse	3	11/07/2007		-	-	Toxicidad al 75%

Continúa en página siguiente

Tabla 19. (continuación)

Nº	Punto de muestreo	Profundidad	Fecha muestreo	Observaciones	Potencial toxicológico al 95%	Potencial toxicológico al 75%	FTZ: Observaciones
16	Embalse	3	29/05/2007		-	+	
17	Embalse	0	10/07/2007		-	-	Toxicidad al 75%
18	Embalse	0	19/09/2007		-	+	
19	Embalse	0	18/09/2007		-	+	
20	ETAP	Salida	17/04/2007		+	+	
21	ETAP	Entrada	18/09/2007		-	+	
22	ETAP	Entrada	18/07/2007		+	+	
23	ETAP	Entrada	25/07/2007		+	+	
24	Embalse	3	26/02/2007		-	+	
25	Embalse	0	09/07/2007		-	+	
26	Embalse	0	17/07/2007		-	+	
27	ETAP	Entrada	26/02/2007		-	+	
28	ETAP	Entrada	23/07/2007		+	+	Toxicidad al 75%
29	ETAP	Salida	17/07/2007		-	+	
30	ETAP	Entrada	21/06/2007		-	+	
31	ETAP	Entrada	16/07/2007		-	+	
32	ETAP	Entrada	30/07/2007		-	+	
33	ETAP	Entrada	20/08/2007		-	+	
34	ETAP	Entrada	19/09/2007		-	+	
35	ETAP	Entrada	19/09/2007		-	+	
36	Embalse	5	20/08/2007		+	+	Toxicidad al 95%
37	Embalse	0	17/09/2007	Bloom de cianofíceas	+	+	
38	Embalse	0	02/10/2007		+	+	Toxicidad al 95%

Si observamos la tabla con los resultados totales donde se detallan los valores obtenidos en cada una de las pruebas y en cada una de las muestras (nótese que las muestras, en algunas ocasiones, han sido sometidas a ensayo varias veces: sin filtrar, filtrada y a diferentes concentraciones, según se muestra en la tabla 20), veremos que se suman todas las repeticiones llevadas a cabo al testar dicha muestra, considerando los datos en su conjunto.

Por lo tanto, es posible encontrar muestras con resultados positivos puntuales (20 muestras al 75 por ciento y, 7 muestras al 75 por ciento y al 95 por ciento, ver tabla 19) que luego se han considerado sin toxicidad en la suma final, y por el contrario, se han encontrado muestras con resultados del test negativos (en 3 casos, ver tabla 19) con valoración final de toxicidad en la suma de las repeticiones. Es el caso de un par de muestras de embalse y el preparado con HAP. A modo de resumen, la tabla 21 recoge la diversa tipología aplicada al estudio del número de casos analizados.

Tabla 20. Número de muestras de cada tipo que se ha sometido a ensayo. En el caso de que el extracto no fuera suficiente se concentra el número de veces indicado (1.000, 2.000, etc.) respecto al peso seco por volumen de la muestra original, con el fin de homogeneizar el proceso.

Extracto (mg/l)	Nº muestras
Agua filtrada	2
Agua sin filtrar	97
No especificado	6
Extracto concentrado:	
250	1
500	1
533	1
933	1
1.000	159
1.633	1
2.000	10
2.857	1
4.000	1
5.000	3

Tabla 21. Resumen general de resultados

Muestras enviadas		223		
Muestras sin poder ser testadas		46		
Muestras con resultados		177		
Resultados 177	35 positivos	23 positivos al 75%	20 sin suma	Dudosas
		12 positivos al 95%	3 tóxicas en suma (dos al 75% y una al 95%)	Con toxicidad
			7 sin suma	Con toxicidad
	142 negativos	3 consideradas tóxicas al 75% en suma	5 tóxicas en suma (dos al 75% y tres al 95%)	Con toxicidad
			139 consideradas no tóxicas en suma o sin suma	Sin toxicidad

6.2. Muestras de control del laboratorio

Nos referimos a las muestras preparadas, duplicadas o en las que se esperaba una alta toxicidad.

En cuanto a las primeras, sorprende descubrir que las muestras dopadas, en las que se esperaban encontrar valores medianamente altos de potencial toxicológico, todas hayan dado negativo excepto la de HAP. Si bien es posible que el sulfato de hidracina no haya generado esa toxicidad en los embriones, sí que debería haberse producido en la muestra de embalse de agosto, a la que se añadieron mercurio y cianuros.

En el caso de muestras con un importante contenido en algas, de las que se esperaba encontrar un alto valor toxicológico, todas han dado negativo, excepto dos: la muestra de embalse de fecha 2-10-07 y las dos muestras repetidas de 31-05-07 que dan probabilidades positivas (una al 75 por ciento y otra al 95 por ciento).

Las denominadas P1 y P2 (dos puntos concretos de embalse), se recogieron de una zona con gran mortandad de peces –supuestamente causados por una viriasis de la carpa- y han dado valores positivos al 95 por ciento, en el caso del club, y al 75 por ciento en la estación de aforos, aunque en nuestros análisis del laboratorio no se han apreciado sustancias o compuestos que hubieran motivado estos positivos (tabla 22).

Las muestras por duplicado han dado resultados de toxicidad similares, aunque –en algún caso- con potencial toxicológico diferente (tabla 22).

De los resultados obtenidos se desprende que los ensayos de toxicidad, aplicados a las aguas naturales de Canal de Isabel II, no se correlacionan (no siguen pautas comparables con la analítica físico-química y biológica del laboratorio), motivado por la diferente naturaleza del tipo de ensayo, los efectos sinérgicos o incluso los posibles contrastes y efectos colaterales de muchos de los productos que pueden encontrarse en el interior celular de las algas, o causados por vertidos o disoluciones que en la naturaleza pudieran darse.

La falta de importantes “floraciones” algales de cianobacterias tóxicas a lo largo de la mayor parte del período estudiado también ha dificultado sobremanera la consecución de este objetivo por falta de “materia prima”, las microcistinas, suficientes para evaluar la toxicidad natural del agua.

En cuanto a las muestras dopadas por el laboratorio para contrastar la bondad de los bioensayos, se observa una cantidad de casos en los que no se han producido los efectos esperados en un principio. Podemos pensar en varios motivos que justifiquen estas diferencias, el primero de éstos es que en ZF Biolabs, un buen número de ocasiones se ha trabajado con el contenido “particulado” de la muestra, es decir con el extracto de la misma, compuesto preferentemente por fitoplancton. El haber dejado pasar el contenido disuelto de la muestra ha podido afectar, sin duda, a los resultados esperados, ya que una buena parte de los compuestos añadidos presentan un carácter tóxico en sí que debería haber afectado al desarrollo embrionario del pez cebra.

Por último, a tenor de los resultados obtenidos en los diversos tipos de test probados, podríamos pensar que no se han probado suficientemente los patrones de microcistinas para testar el ensayo FTZ o el resto de bioensayos.

Tabla 22. Muestras de control enviadas para realizar el test FTZ

Nº	Punto de muestreo	Profundidad	Fecha muestreo	Observaciones	Potencial toxicológico %		FTZ: Observaciones
					95%	75%	
1	Agua destilada	Preparado	23/08/2007	Agua destilada	-	-	
2	Preparado con HAP	Preparado	23/08/2007	Agua destilada + benzo (b) fluoranteno: 9 ml de 10 ppm => 0,045 ppm, Indeno (1,2,3-c,d) pireno: 2,5 ml de 10 ppm => 0,0125 ppm, Heptachlor-epóxido: 1 ml de 100 ppm => 0,05 ppm	-	-	Toxicidad al 75%
3	ETAP	Entrada	21/03/2007	Agua con cloro	-	-	
4	Embalse	12	16/08/2007	Dopada con 30 ppm sulfato hidracina	-	-	
5	Embalse	12	16/05/2007	Dopada con acetoniitrilo	-	-	
6	ETAP	Entrada	04/06/2007	Bloom de algas	No testada	No testada	
7	ETAP	Entrada	21/06/2007	Muestra por duplicado	-	+	Sin toxicidad
8	ETAP	Entrada	21/06/2007	Muestra por duplicado	-	-	
9	Embalse	P2	11/05/2007	Mortandad de peces	+	+	
10	ETAP	Entrada	31/05/2007	Bloom de algas y por duplicado	-	+	
11	ETAP	Entrada	31/05/2007	Bloom de algas y por duplicado	+	+	
12	Embalse	P1	11/05/2007	Mortandad de peces	-	+	
13	Embalse	3	08/08/2007	Dopada con 30 ppm sulfato de hidracina	-	-	Sin toxicidad
14	Embalse	2	29/08/2007	Dopada con 0,04 g de HgSCN (1.5 ppm Hg)	-	-	
15	Embalse	0	19/09/2007	Bloom de algas y por duplicado	-	-	
16	Embalse	0	18/10/2007	Bloom de cianofíceas	No testada	No testada	
17	ETAP	Entrada	18/10/2007	Bloom de cianofíceas	No testada	No testada	
18	ETAP	Entrada	19/09/2007	Bloom de algas y por duplicado	-	-	
19	Embalse	0	02/10/2007	Bloom de cianofíceas	+	+	Toxicidad al 95%

Tabla 23. Resumen de resultados de muestras control del laboratorio

Tipos de muestra	Número de muestra	Resultados	Esperados
6 muestras duplicadas	7,8,10,11,15,18	Semejantes	SÍ
4 muestras dopadas	4,5,11,14	4 negativos	NO
5 muestras con bloom de algas testadas	10,12,19	3 positivos	SÍ
	15,18	2 negativos	NO
2 muestras con mortandad de peces	9,13	2 positivos	SÍ
1 muestra de agua con cloro	3	Negativo	SÍ
1 agua destilada	1	Negativo	SÍ
1 agua + HAP	2	Toxicidad	SÍ

7

Propuesta para la aplicabilidad de los
bioensayos a Canal de Isabel II

En el caso de querer aplicar los bioensayos generados en este proyecto a Canal de Isabel II, se proponen diversas alternativas, según la frecuencia de los controles a realizar.

7.1. Propuesta para la construcción de un pez cebra transgénico capaz de detectar toxicidad en el agua

7.1.1. Plan de trabajo previsto

El plan diseñado implica la realización de los siguientes objetivos:

- Construcción de un pez cebra transgénico que porte el promotor de la gamma-glutamyl transferasa fusionado a la GFP.
- Mejora del proceso de microinyección.
- Diseño y montaje de estanterías.

7.1.1.1. Construcción de un pez cebra transgénico que porte el promotor de la gamma-glutamyl transferasa fusionado a la GFP

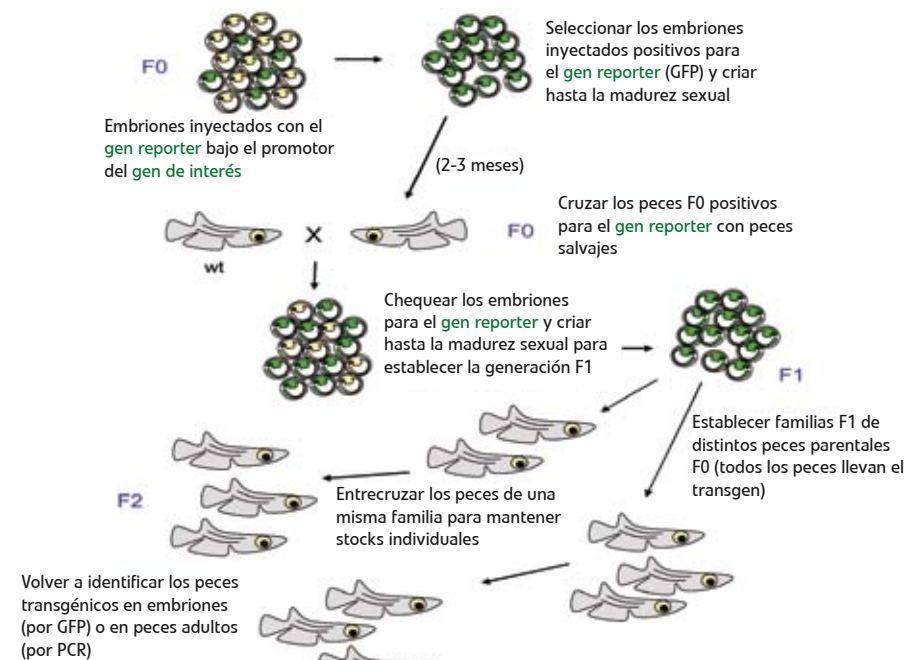
Estudiando las últimas técnicas puestas a punto para la construcción de peces transgénicos y teniendo en cuenta el objetivo de este proyecto, planteamos la posibilidad de construir un pez que lleve integrado en el

genoma el promotor de la enzima gamma-glutamyl transferasa (elegida tras el estudio de la expresión génica de distintas enzimas estudiadas por qRT-PCR, a lo largo del proyecto anterior) fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP). Esta construcción se realizaría en, al menos, dos vectores distintos (plásmidos recombinantes o transposones), con el objetivo de seguir ambas alternativas para la obtención del transgénico.

Para conseguir el pez transgénico, serían microinyectados cientos de embriones con cada una de las construcciones obtenidas y se dejaría que cada uno alcanzase la madurez sexual; se cruzarían con peces salvajes y se identificarían en la generación F1 resultante, por ensayos apropiados, aquellos peces parentales positivos. A continuación, dichos parentales se cruzarían entre sí, para conseguir transgénicos en línea germinal y, seguidamente, se volvería a identificarlos (figura 174).

1. Construcción de los plásmidos recombinantes (2-3 meses).
2. Preparación de los DNAs (máximo 1 semana).
3. Microinyección (1 día cada experimento de microinyección):
 - a. Preparación de los peces y de las soluciones de microinyección.
 - b. Lectura de las puestas.
 - c. Microinyección de los embriones en estadio de 1-2 células.
 - d. Transferencia de los embriones a placas P96.
4. Screening para expresión del gen reporter (varios días).
5. Criar los peces de la generación F0 positivos hasta madurez sexual (2-3 meses). Cada individuo contiene potencialmente el transgén de interés en un punto de inserción diferente dentro del genoma y podría ser usado para establecer una línea transgénica distinta.
6. Cruzar de forma individual los peces F0 positivos en el gen reporter con peces salvajes. La transferencia del transgén a lo largo de las generaciones se produce sólo si la inserción se ha producido en la línea germinal.
7. Identificar los embriones de la generación F1, resultantes de cada pez F0 parental, para ver si portan el gen de interés (varios días).
8. Establecimiento de la generación F1 transgénica (2-3 meses). Con este cruzamiento se asegura que todos los peces porten el transgén en la línea germinal.
9. Comprobación de embriones (expresión de GFP) o larvas (por PCR) transgénicos.
10. Entrecruzar los peces de una misma familia para mantener stocks individuales.
11. Volver a identificar los peces transgénicos (por expresión de GFP y PCR).

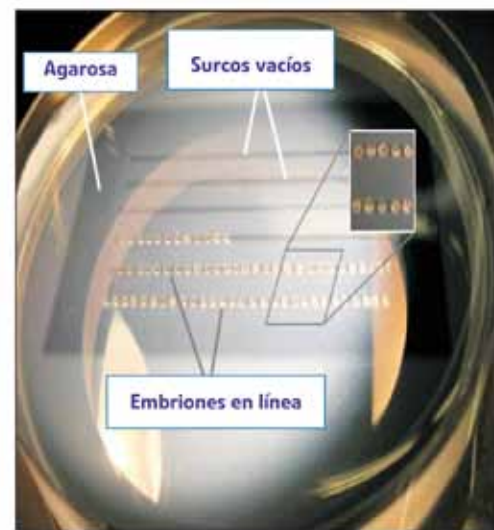
Figura 174. Esquema detallado de la construcción de un pez cebra transgénico: El primer paso del esquema incluye la construcción de los vectores que se microinyectarán en los embriones, en estado de 1-2 células



7.1.1.2. Mejora del proceso de microinyección

El desarrollo de este proyecto conlleva, además de la construcción del pez cebra transgénico, una mejora del proceso de microinyección con el objetivo de facilitar la integración en el genoma. La obtención de transgénicos en línea germinal se ve beneficiada si la inserción se produce en el estadio de 1 célula, por lo que mejoras en el desarrollo de la microinyección aumentarían la probabilidad de obtener transgénicos estables. Una parte de estas mejoras se basaría en mejorar los moldes utilizados para colocar los embriones antes de ser microinyectados (ver figura 175), así como en mejorar la forma de colocación de los mismos sobre las placas, con el objetivo de que el polo animal quede en la parte superior.

Figura 175. Moldes de agarosa empleados para la microinyección de embriones de pez cebra



7.1.1.3. Diseño y montaje de estanterías

Finalmente, debe saberse que el desarrollo, la cría y el mantenimiento de peces cebra transgénicos requiere de instalaciones especiales y por ello, parte del proyecto tendría que contemplar el diseño y montaje de las estanterías necesarias al efecto (figura 176).

En función de los resultados que se obtuvieran con la obtención de este pez cebra transgénico, se podría diseñar un protocolo preliminar sobre la hipótesis de utilización del pez cebra transgénico como biosensor de productos tóxicos en el agua.

Este protocolo preliminar constaría de 5 apartados (figura 177).

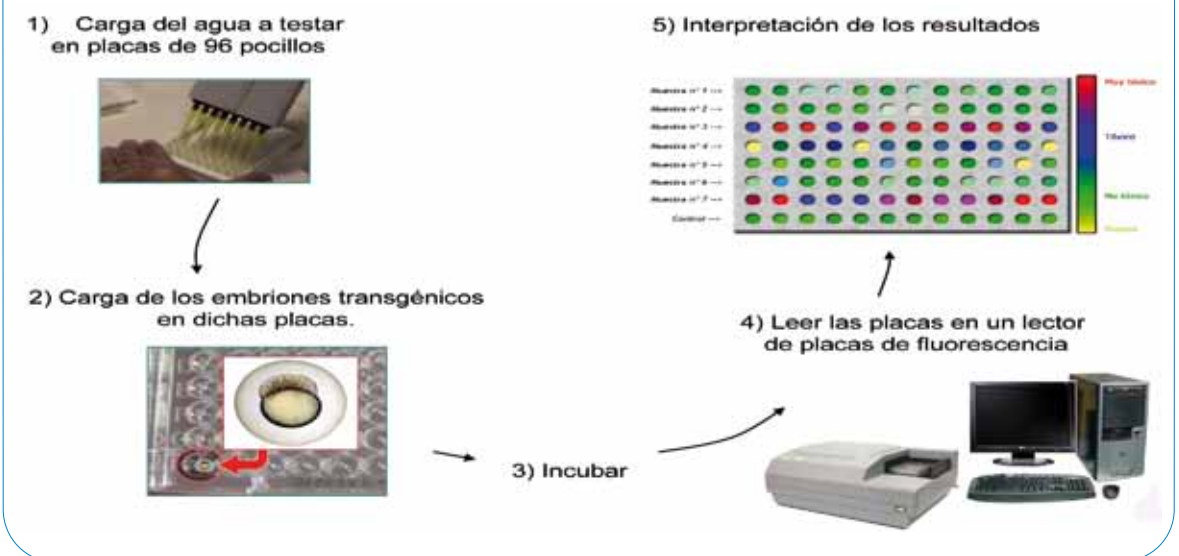
Figura 176. Ejemplo de estanterías y acuarios para el desarrollo y la cría de peces cebra transgénicos



Protocolo preliminar

1. Carga de las muestras de agua a testar en placas de 96 pocillos: Se podría testar la muestra original, el extracto filtrado, y el agua correspondiente a cada muestra original con el objetivo de conocer la procedencia de la toxicidad en los casos positivos. El número de embriones a testar depende de la calidad de la puesta y en ningún caso excedería de 20 embriones.
2. Carga de los embriones transgénicos en dichas placas. Tras una lectura a las 3,5 hpf, se seleccionaría la puesta y se cargaría en las placas que contienen las muestras.
3. Incubación: Los embriones se incubarían a 26°C hasta observar el desarrollo de la fluorescencia en un control positivo.
4. Leer las placas en un lector de placas de fluorescencia.
5. Interpretación de los resultados. La lectura de la fluorescencia observada en las placas discriminaría las muestras positivas de las negativas.

Figura 177. Protocolo aproximado para la detección de compuestos tóxicos en el agua, utilizando embriones de pez cebra transgénicos



7.1.2. Planificación teórica prevista

La planificación descrita en esta propuesta incluiría dos métodos de transgénesis; mejora del proceso de microinyección y diseño-montaje de estanterías especiales para la cría y mantenimiento de peces cebra transgénicos. La planificación detallada se da en la tabla 24.

Tabla 24. Programación del proyecto

		años	
		1º	2º
Construcción plásmido recombinante y transposón			
Transgénesis	Obtención generación F0		
	Obtención generación F1		
	Obtención generación F2		
Mejora del proceso de microinyección para facilitar la integración en el genoma			
Diseño y montaje de estanterías para cría y mantenimiento de peces cebra transgénicos			

El cálculo aproximado del presupuesto necesario para llevar a cabo este proyecto implicaría la dedicación, a tiempo completo, de al menos dos personas (biólogo molecular y licenciado en biología), reactivos de biología molecular, instalaciones específicas, etc.

Se proponen diversas alternativas, según la frecuencia de los controles a realizar.

7.2. Test diario

El test diario se aplicaría a nueve estaciones de tratamiento de agua potable, tomando una muestra al día por ETAP con tres repeticiones por muestra, lo que daría un total de 1.944 embriones al día.

El tiempo de trabajo incluye todo el proceso de desarrollo del test, así como el mantenimiento mínimo de la instalación.

Material necesario

- 1 módulo automático con filtro de lecho fluido para alta densidad, destinado a reproductores y reserva.
- 1 módulo semiautomático para cuarentena.
- 1.360 peces reproductores.
- 1.360 peces en reserva y cuarentena.

Tiempo estimado de trabajo

- 26,1 horas por ensayo triplicado de 9 muestras diarias.

Personal necesario

- 5 personas.

Tiempo estimado para la formación del personal

- (5 personas): 37 horas.

Ventajas

- Mayor eficacia en la obtención de embriones.
- Reducción de costes en material y personal.
- Centralización del servicio.

Inconvenientes

- Traslado de muestras al laboratorio central.
- Algunos meses hasta que el procedimiento esté puesto a punto.

7.2.1. Instalación en ETAP

7.2.1.1. Instalación particular en cada una de las nueve ETAP

Se precisarían los siguientes equipos por ETAP:

Material necesario

- 1 módulo mixto automático y semiautomático, destinado a reproductores, reserva y cuarentena.
- 151 peces reproductores.
- 151 peces en reserva y cuarentena.

Tiempo estimado de trabajo

- 5,95 horas por ensayo triplicado de 1 muestra diaria.
- 151 peces reproductores.

Personal necesario

- 2 personas. Tiempo estimado para la formación del personal (2 personas): 18 horas.

7.2.1.2. Instalación en las nueve ETAP

Considerando las nueve ETAP, serían necesarios los equipos descritos a continuación:

Material necesario

- 9 módulos mixtos automáticos y semiautomáticos, destinados a reproductores, reserva y cuarentena.
- 1.360 peces reproductores .
- 1.360 peces en reserva y cuarentena.

Tiempo estimado de trabajo

- 53,55 horas por ensayo triplicado de 9 muestras diarias.

Personal necesario

- 18 personas. Tiempo estimado para la formación del personal (2 personas): 162 horas.

Ventajas

- No requiere traslado de muestras.

Inconvenientes

- Mayor variabilidad en la obtención de embriones.

- Se dispara el coste en material y personal.
- Requiere algunos meses hasta la puesta a punto de todos los sistemas y procedimientos.

7.2.2 Laboratorio ajeno al Canal de Isabel II

Material necesario

- 1 módulo automático con filtro de lecho fluido para alta densidad, destinado a reproductores y reserva.
- 1 módulo semiautomático para cuarentena.
- 1.360 peces reproductores.
- 1.360 peces en reserva y cuarentena.

Tiempo estimado de trabajo

- 26,1 horas por ensayo triplicado de 9 muestras diarias. Personal necesario: 5 personas.

Ventajas

- Experiencia en el desarrollo de todo el proceso.
- Máxima eficacia en la obtención de embriones.
- Centralización del servicio.

Inconvenientes

- Traslado de muestras al laboratorio externo.
- Necesaria inclusión en la oferta de los costes generales del laboratorio.

7.2.3 Suministro de embriones y ejecución del test

7.2.3.1. Suministro de embriones a cargo del laboratorio externo

Material necesario

- 1 módulo automático con filtro de lecho fluido para alta densidad, para reproductores y reserva.
- 1 módulo semiautomático para cuarentena.
- 1.360 peces reproductores.
- 1.360 peces en reserva y cuarentena.

Tiempo estimado de trabajo

- 6,75 horas por ensayo triplicado de 9 muestras diarias. Personal necesario: 2 personas.

7.2.3.2. Ejecución del test a cargo de Canal de Isabel II (en un único centro)

Tiempo estimado de trabajo

- 19,35 horas por ensayo triplicado de 9 muestras diarias.
- Personal necesario: 5 personas.
- Tiempo estimado para la formación del personal (5 personas): 7 horas.

Ventajas

- Experiencia en el proceso de obtención de embriones.
- Máxima eficacia en la obtención de embriones.
- Centralización del servicio.

Inconvenientes

- Traslado de muestras al laboratorio de Canal de Isabel II.
- Traslado de los embriones, que puede resultar problemático por los tiempos y mantenimiento de la temperatura exacta.
- Necesaria inclusión en la oferta de los costes generales de la parte concerniente al laboratorio.

Tabla 25. Ventajas e inconvenientes de las diversas alternativas, para el test diario

	Instalación general (9 ETAP)	9 instalaciones (1 por ETAP)	Servicio subcontratado	Servicio de envío de embriones
	Laboratorio de Canal de Isabel II		Laboratorio externo	
Ventajas	Mayor eficacia en la obtención de embriones.	Reducción de costes en material y personal (frente a las instalaciones particulares en cada una de las ETAP).	Experiencia en el desarrollo de todo el proceso.	Experiencia del laboratorio en el proceso de obtención de embriones.
	Centralización de los servicios.	No requiere el traslado de las muestras.	Máxima eficacia en la obtención de embriones.	Máxima eficacia en la obtención de embriones.
			Centralización del servicio.	Cierta centralización del servicio.
Inconvenientes	Traslado de muestras al laboratorio Central.	Requerirá algunos meses hasta que el procedimiento esté puesto a punto.	Mayor variabilidad en la obtención de embriones.	Traslado de muestras al laboratorio de Canal de Isabel II.
		Se dispara el coste en material y personal.	Traslado de muestras al laboratorio desde laboratorio.	Traslado de los embriones: puede resultar problemático por los tiempos y mantenimiento de la temperatura exacta.
		Requiere algunos meses hasta la puesta a punto de todos los sistemas y procedimientos.	Necesaria inclusión en la oferta de los costes generales de laboratorio.	Necesaria inclusión en la oferta de los costes generales de la parte concerniente a laboratorio.

El resumen de los servicios y las instalaciones se detalla en la tabla 26.

Tabla 26. Tabla resumen de servicios e instalaciones precisos para el test diario

Concepto	Compañía	Instalación general para las 9 ETAP	9 instalaciones (1 por ETAP)	Servicio subcontratado a laboratorio especializado	Envío de embriones de laboratorio
Material	Canal de Isabel II	2 módulos	9 módulos	-	-
	Laboratorio independiente	-	-	2 módulos	2 módulos
Peces	Canal de Isabel II	2.720	2.720	-	-
	Laboratorio independiente	-	-	2.720	2.720
Tiempo de trabajo (horas/día)	Canal de Isabel II	26,1	53,55	-	19,35
	Laboratorio independiente	-	-	26,1	6,75
Personal a tiempo completo	Canal de Isabel II	3,2	6,7	-	2,4
	Laboratorio independiente	-	-	3,2	0,8
Personal necesario	Canal de Isabel II	5	18	-	5
	Laboratorio independiente	-	-	5	2
Tiempo para formación (horas)	Canal de Isabel II	37	162	0	7
	Laboratorio independiente	-	-	-	-

El instrumental necesario para realizar este servicio es

- Equipo de filtración/malla de fitoplancton (2-3 en instalación general, 1 por instalación a pequeña escala).
- Sonificador (1 por instalación).
- Microscopios ópticos (2-3 para una instalación general, 1 en cada instalación a pequeña escala).
- Incubador (1 por instalación).

7.3. Test semanal

El test diario se aplicaría a 9 ETAP, tomando una muestra al día por ETAP y tres repeticiones por muestra, lo que daría un total de 1.944 embriones al día, una vez por semana.

El tiempo de trabajo incluye todo el proceso de desarrollo del test, así como el mantenimiento mínimo de la instalación.

- El término de personal necesario difiere del de personal a tiempo completo, debido a que el proceso del test conlleva realizar determinadas operaciones simultáneamente, haciendo necesario el concurso de un número de trabajadores superior al estipulado en el personal a tiempo completo.

Material necesario

- 1 módulo mixto automático y semiautomático para alta densidad, destinado a reproductores, reserva y cuarentena.
- 311 peces reproductores.
- 311 peces en reserva y cuarentena.

Tiempo estimado de trabajo

- 26 horas por ensayo triplicado de 9 muestras el día del ensayo y 2,1 horas diarias el resto de la semana (trabajos de mantenimiento). Total semanal: 34,4 horas (0,9 personas a tiempo completo). Personal necesario: 5 personas el día del ensayo, 1 persona el resto del tiempo.
- Tiempo estimado para la formación del personal (5 personas): 37 horas.

Ventajas

- Centralización del servicio.

Inconvenientes

- Traslado de muestras al laboratorio central.
- Requerirá algunos meses hasta que el procedimiento esté puesto a punto.

7.3.1. Servicio subcontratado a laboratorio externo

Material necesario

- 1 módulo mixto automático y semiautomático para alta densidad, destinado a reproductores, reserva y cuarentena.
- 311 peces reproductores.
- 311 peces en reserva y cuarentena.

Tiempo estimado de trabajo

- 26 horas por ensayo triplicado de 9 muestras el día del ensayo y 2,1 horas diarias el resto de la semana (trabajos de mantenimiento).
- Total semanal: 34,4 horas.
- Personal necesario: 5 personas el día del ensayo, 1 persona el resto del tiempo.

Ventajas

- Experiencia en el desarrollo de todo el proceso.
- Máxima eficacia en la obtención de embriones.
- Centralización del servicio.

Inconvenientes:

- Traslado de muestras al laboratorio.
- Necesaria inclusión en la oferta de los costes generales de laboratorio.

7.3.2. Suministro de embriones y ejecución del test**7.3.2.1. Suministro de embriones a cargo de laboratorio externo****Material necesario:**

- 1 módulo mixto automático y semiautomático para alta densidad, destinado a reproductores, reserva y cuarentena.
- 311 peces reproductores.
- 311 peces en reserva y cuarentena.

Tiempo estimado de trabajo

- 8,85 horas por ensayo triplicado de 9 muestras al día y 2,1 horas diarias el resto de la semana (trabajos de mantenimiento).
- Total semanal: 17,25 horas.
- Personal necesario: 2 personas (el día del ensayo), 1 persona el resto.

7.3.2.2. Ejecución del test a cargo de Canal de Isabel II (en un único centro)**Tiempo estimado de trabajo**

- 17,15 horas por ensayo triplicado de 9 muestras el día del ensayo.
- Total semanal: 17,15 horas.
- Personal necesario: 4 personas (el día del ensayo).
- Tiempo estimado para la formación del personal (4 personas): 7 horas.

Ventajas:

- Experiencia de laboratorio en el proceso de obtención de embriones.
- Máxima eficacia en la obtención de embriones.

Inconvenientes:

- Traslado de muestras al laboratorio de Canal de Isabel II.
- Traslado de los embriones, que puede resultar problemático por los tiempos y el mantenimiento de la temperatura exacta.
- Menor centralización del servicio.
- Necesaria inclusión en la oferta de los costes generales de la parte concerniente a laboratorio.

El resumen de ventajas e inconvenientes se detalla en la tabla 27.

Tabla 27. Ventajas e inconvenientes del test semanal

	Instalación general (9 ETAP)	Servicio subcontratado a laboratorio externo	Servicio de envío de embriones
Ventajas	Centralización del servicio.	Experiencia en el desarrollo de todo el proceso. Máxima eficacia en la obtención de embriones. Centralización del servicio	Experiencia del laboratorio en el proceso de obtención de embriones. Máxima eficacia en la obtención de embriones.
Inconvenientes	Traslado de muestras al laboratorio central de Canal de Isabel II. Requerirá algunos meses hasta que el procedimiento esté puesto a punto.	Traslado de muestras al laboratorio desde laboratorio externo. Necesaria inclusión en la oferta de los costes generales de laboratorio.	Traslado de muestras al laboratorio de Canal de Isabel II. Traslado de los embriones: puede resultar problemático por los tiempos y mantenimiento de la temperatura exacta. Menor centralización del servicio. Necesaria inclusión en la oferta de los costes generales de la parte concerniente a laboratorio.

El instrumental necesario para realizar la labor es

- Equipo de filtración/malla de fitoplancton (2-3 para una instalación general, 1 en cada instalación a pequeña escala)
- Sonicador (1 por instalación)
- Microscopios ópticos (2-3 para una instalación general, 1 en cada instalación a pequeña escala)
- Incubador (1 por instalación)

El resumen de los servicios y las instalaciones se encuentra en la tabla 28.

Tabla 28. Tabla resumen de servicios e instalaciones para el test semanal

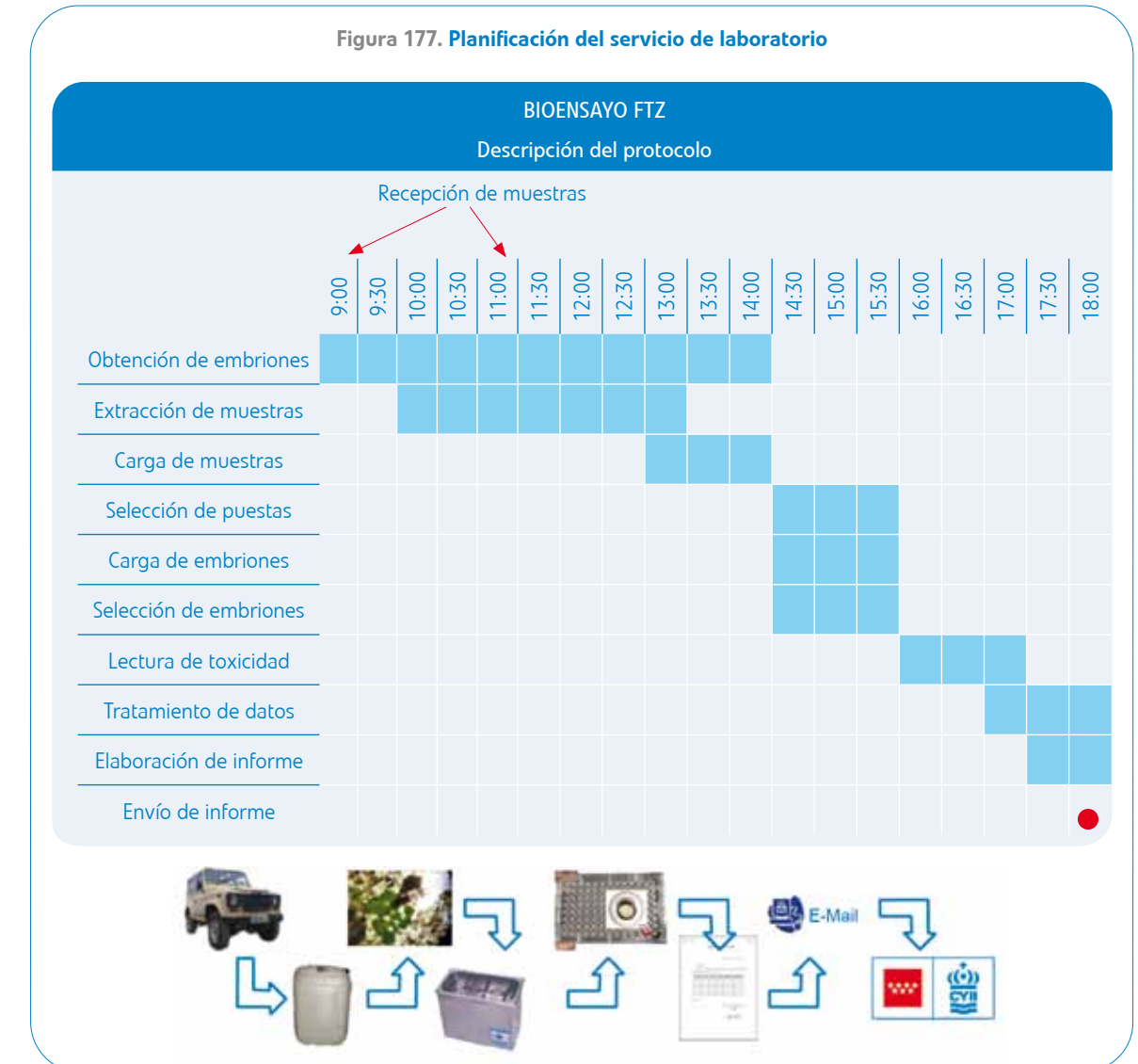
Concepto	Compañía	Instalación general para las 9 ETAP	Servicio subcontratado a laboratorio especializado	Envío de embriones de laboratorio
Material	Canal de Isabel II	1 módulo	-	-
	Laboratorio independiente	-	1 módulo	1 módulo
Peces	Canal de Isabel II	622	-	-
	Laboratorio independiente	-	622	622
Tiempo de trabajo (horas/día)	Canal de Isabel II	34,4	-	17,15
	Laboratorio independiente	-	34,4	17,25
Personal a tiempo completo	Canal de Isabel II	0,86	-	0,43
	Laboratorio independiente	-	0,86	0,43
Personal necesario	Canal de Isabel II	1-5	-	0-4
	Laboratorio independiente	-	1,5	1-2
Tiempo para formación (horas)	Canal de Isabel II	37	0	7
	Laboratorio independiente	-	-	-

7.3.3. Planificación teórica prevista

La planificación de las actuaciones, se recoge en la figura 178. Contempla la evaluación toxicológica rutinaria de muestras de agua a Canal de Isabel II. La recepción de las muestras se realizará entre las 9:00 y las 10:30 horas de la mañana y se emitirá un informe de toxicidad en el mismo día (aproximadamente 9 horas después de recibir las muestras).

El coste del servicio de evaluación rutinaria de muestras de 9 embalses, con periodicidad diaria (5 veces por semana), se cifró en 125 euros por muestra; el coste del servicio de evaluación semanal (1 vez por semana), se cifró en 175 euros; la valoración es la correspondiente al momento en el que se desarrolló el proyecto (año 2006-2007). Los precios no incluían el IVA.

Figura 177. Planificación del servicio de laboratorio



Los resultados de las investigaciones se han divulgado en distintos encuentros científicos de ámbito nacional e internacional cuyas publicaciones, con los epígrafes que aquí se indican, aparecen recogidos en las referencias bibliográficas del apartado *bibliografía*.

8.1. II Reunión española de cianotoxinas. Universidad Autónoma de Madrid, 12 y 13 de julio de 2007

Figura 179. Poster presentado



Definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones de pez cebra.

Autores: Urrutia, J.; Rodríguez, J.F.; Acebo, P.; Romero, B.; Guinea, J.; González, D.M^o.

El objetivo fundamental de este Proyecto de investigación de Canal de Isabel II es que la Empresa disponga de un ensayo rápido y eficaz para la detección temprana de fenómenos tóxicos generados por compuestos

o mezcla de compuestos raros y/o complejos, que actualmente es lento y difícil utilizando las técnicas analíticas clásicas, prestandose una especial atención a las cianotoxinas.

Las principales líneas del estudio son:

- Desarrollo de un bioensayo rápido de toxicidad en el que se trata de aunar la máxima fiabilidad con el mínimo coste en tiempo y recursos. Comprende la obtención regular y sincronizada de embriones utilizando técnicas novedosas como la inducción hormonal, la selección de puestas y embriones previos al test, el desarrollo de un protocolo de testado de muestras, en un tiempo inferior a 3 horas, mediante la observación de los efectos tóxicos sobre los embriones de pez cebra en las primeras divisiones celulares.
- Desarrollo de sendos test de neurotoxicidad y hepatotoxicidad que complementen los estudios del ensayo de biotoxicidad. En este sentido, se ha preparado un protocolo de neurotoxicidad que recoge el estudio de 7 *endpoints* a las 28 hpf de los embriones de pez cebra. En referencia al test de hepatotoxicidad, se está llevando a cabo la puesta a punto del protocolo, estudiando la definición de *endpoints* macroscópicos e histológicos en embriones de 3 - 6 dpf.
- Estudio preliminar para la construcción de un pez cebra transgénico, capaz de detectar compuestos hepatotóxicos en el agua. La expresión de diversos enzimas hepáticos en presencia y en ausencia de distintos compuestos tóxicos se cuantifica por qRT-PCR. El promotor del gen cuya expresión se vea incrementada por la presencia de dichos compuestos se clonaría delante del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) con el objetivo de obtener peces cebra que emitan fluorescencia al crecer en presencia de un compuesto hepatotóxico.

8.2. Society of toxicology annual meeting, Seattle, USA, 16 al 20 de marzo 2008

New neurotoxicity test with zebrafish embryos.

Authors: Urrutia, J.I.; Rodríguez, J.F.; Arias, A.; Martínez, M.; Guinea, J.

Key words: zebrafish, neurotoxicity, CNS, PNS.

Zebrafish embryo presents some advantages (fast development, transparency, small size, etc.) that allow a fast and effective visualization of the correct/incorrect development of those morphologic and functional details implied in acute or organ-specific toxicity.

Based in its previous experience in the development of acute toxicity and teratogenic tests, ZF Biolabs, in collaboration with the "Canal de Isabel II" (Madrid), has developed a new neurotoxicity test with zebrafish embryos in their early stages of development.

This test is based on morphological (CNS, PNS) and functional (spontaneous movement) endpoints (Kimmel et al., 1974; Nagel, 2002). Observation of neurotoxic effects in the embryo is carried out at 28 hpf (hours post-fertilization) by in vivo optical microscopy, after an immersion of 24 hours in the toxic solution to test. Embryos used for the test have to pass a double quality control selection at 3-4 hpf.

The test has been validated with the following compounds: Acetone, Caffeine, Colchicine, Hydroxyurea, Isoniazide, Valproic Acid, Methyl-Mercuric Chloride, Urethane, Diphenidramine and Aspirine, obtaining results of LC50, EC50 neurotoxicity and establishing the relation between both values in an index and a

graphical representation that define the presence/absence of neurotoxic potential, or the doubtful status of each compound.

Results obtained in the study of above cited compounds allow contemplating this test as a valid alternative to determinate the neurotoxic potential of a big group of chemical substances. Also, an "Atlas of Neurotoxicity" has been elaborated, which contains the experimental protocol and textual and graphical definitions of all endpoints for their correct interpretation by any qualified observer.

8.3. XXVIII Jornadas de AEAS, 2008

Sistemas de control de las poblaciones de cianofíceas y cianotoxinas en los embalses de abastecimiento de Canal de Isabel II.

Autores: J. Iñaki Urrutia Gutiérrez; Dulce M^a González Ramos.

El control de las cianotoxinas en el abastecimiento de una población, además de estar regulado por el Real Decreto 140/2003, constituye –cada día más– un objetivo de calidad y de preocupación para las empresas abastecedoras (Gordo et al., 2002), y la población científica dedicada al estudio de las cianofíceas (II Reunión Española de Cianotoxinas, 2007).

Canal de Isabel II es responsable del abastecimiento en la Comunidad de Madrid. Gestiona 12 embalses con variada tipología respecto a la presencia de cianofíceas y cargas de cianotoxinas y ha planteado diversas vías para afrontar este problema:

- Control rutinario de los grupos de algas, con muestras regulares a diferentes profundidades y frecuencias, mediante la evaluación por fluorescencia, análisis espectrofotométrico, y taxonomía por microscopio invertido.
- Mejora de las determinaciones analíticas de microcistinas en el abastecimiento, evitando falsos positivos y negativos, y evaluando las diferentes microcistinas:
 - Técnicas de inmunoensayo (ELISA)
 - Análisis de la fosfatasa alcalina
 - HPLC-MS
- Introducción de nuevas tecnologías. Sistema perfilador de control *in situ*, consistente en una plataforma de alerta remota (Urrutia et al., 2006) anclada en el embalse, y que permite el muestreo regular, programado y automático, de los parámetros físico-químicos y biológicos más significativos, así como el envío de esta información al Centro Principal de Control, para establecer el adecuado seguimiento y las alarmas pertinentes.
- Dinámica, distribución, degradación y resuspensión de cianotoxinas en los embalses. Mediante la instalación de trampas de sedimentación en profundidad del embalse, se puede evaluar la magnitud de los procesos sedimentarios de las cianotoxinas producidas, la relevancia de los fenómenos de degradación de la toxina así como la importancia de la resuspensión de ésta y su vuelta a la columna de agua.
- Aplicaciones biotecnológicas. El desarrollo del proyecto de investigación para la definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones de

pez cebra (*Danio rerio*), constituye una nueva línea de trabajo con vistas a sustituir los engorrosos ensayos con animales de laboratorio por embriones de este pez, mediante test rápidos y específicos de toxicidad, hepatotoxicidad, y neurotoxicidad. Queda abierta también la creación de un pez transgénico, sensible a la presencia de hepatotoxinas, (Urrutia et al., 2007).

Término científico	Descripción
Blástula	Estado temprano del desarrollo embrionario de los mamíferos
Cadena de termistores	Línea de termómetros
Complejos quelados	Compuestos dotados de una unión química de cierta complejidad
Corion	Estructura del embrión
Cromatina	Conjunto de ADN, histonas y proteínas que componen el cromosoma eucariótico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPF	Días post-fecundación
DTZ	Developmental toxicity test with zebrafish embryos
EC50	Effect concentration 50
Endpoints	Características morfológicas o funcionales del embrión, que se observan para ver resultados de toxicidad
EPA	Environmental Protection Agency
Epilimnion	En sistemas lóticos estratificados, el intervalo de profundidad de la masa de agua que se encuentra por encima del gradiente de temperatura
ETAP	Estación de tratamiento de agua potable
Eutrofia	Agua con alta concentración de nutrientes, que presenta un desequilibrio ecológico a favor de algunas especies, como algas y bacterias, frente a organismos más complejos
EW	Embryo water
FTZ	Fast toxicity test with zebrafish embryos
Hipolimnion	En sistemas lóticos estratificados, el intervalo de profundidad de la masa de agua que se encuentra por debajo del gradiente de temperatura
HPE	Horas post-exposición

Término científico	Descripción
HPF	Horas post-fecundación
LC5	Letal concentration 5
LC50	Letal concentration 50
Marcador genotóxico	Segmento de ADN identificable en un locus determinado, que se puede rastrear y que actúa como indicador de toxicidad
MC-LR	Microcistina-LR
Metalimnion	En sistemas lóticos estratificados, el intervalo de profundidad de la masa de agua que presenta un gradiente de temperatura de más de 1°C por metro
PCR	Polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
Secuencia diana	Segmento de ADN en el cual se une el indicador genético (en este caso de toxicidad) en el genoma de un individuo transgénico
SL	Standard length, Longitud estándar
Teleósteo	Orden a la que pertenecen los peces que cuentan con un esqueleto óseo
Teratogénia	Capacidad de algunos compuestos de producir malformaciones
Termoclina	Gradiente térmico superior a 1°C por metro de profundidad, que se produce en algunos sistemas lóticos
Transposón	Secuencia de ADN capaz de replicarse e insertar una copia de si mismo en otro lugar del genoma
Zona afótica	Zona de las masas de agua donde no llega a penetrar la luz
Zona fótica	Zona superior de las masas de agua donde penetra la luz
Zona trofогénica	Zona de la masa de agua en donde se genera la materia orgánica
Zona trofолítica	Zona de la masa de agua en donde se descompone la materia orgánica que se genera en la zona trofогénica

10

Índice de figuras

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Evolución hidromorfológica de El Atazar entre el 2003 y 2007	31
2	Diferenciación morfológica de pez cebra. Macho (arriba) y hembra (abajo)	35
3	Embriones "aptos" a las 1,5 horas post-fecundación	36
4	Embriones "no aptos" a las 1,5 horas post-fecundación: no fecundado (izquierda); coagulado (centro); y con número anormal de células 4 (derecha)	36
5	Embriones "no aptos" a las 1,5 horas post-fecundación	36
6	Embriones anómalos a las 3 horas post-fecundación	37
7	Corte histológico de hígado de embrión de pez cebra a los 5 días post-fecundación	39
8	Embriones en la placa molde de microinyección	41
9	Puler	41
10	Aguja de microinyección	42
11	Equipo de microinyección	43
12	Embrión microinyectado con rojo fenol	44
13	Estudios realizados y referidos al pez cebra	44
14	Aproximación a los estudios realizados sobre el pez cebra y sobre medaka	45
15	Pasos a seguir para el desarrollo de un bioensayo en pez cebra capaz de detectar microcistinas	48
16	Distribución de la población en la Comunidad de Madrid	52
17	Red de embalses de Canal de Isabel II	53
18	Embalse de Pinilla	54
19	Embalse El Atazar	55
20	Embalse de Pedrezuela	56
21	Embalse de Santillana	56
22	Embalse de Valmayor	57
23	Esquema del aceleramiento de ciclos bioquímicos	61
24	Dinámica de El Atazar, desde el año 2002 hasta 2007	62
25 y 26	Evolución térmica en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	63
27 y 28	Evolución térmica en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	63
29 y 30	Evolución térmica en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	64
31 y 32	Evolución térmica en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	64

Figura	Título	Página
33 y 34	Evolución térmica en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	65
35	Equilibrio carbónico-carbonato	66
36 y 37	Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	67
38 y 39	Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	67
40 y 41	Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	68
42 y 43	Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	68
44 y 45	Evolución del oxígeno disuelto en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	69
46 y 47	Evolución de los valores de pH en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	70
48 y 49	Evolución de los valores de pH en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	70
50 y 51	Evolución de los valores de pH en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	71
52 y 53	Evolución de los valores de pH en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	71
54 y 55	Evolución de los valores de pH en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	72
56 y 57	Evolución del potencial redox en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	73
58 y 59	Evolución del potencial redox en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	73
60 y 61	Evolución del potencial redox en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	74
62 y 63	Evolución del potencial redox en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	74
64 y 65	Evolución del potencial redox en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	75
66 y 67	Evolución de la conductividad del embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	77
68 y 69	Evolución de la conductividad del embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	77
70 y 71	Evolución de la conductividad del embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	78
72 y 73	Evolución de la conductividad del embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	78
74 y 75	Evolución de la conductividad del embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	79
76 y 77	Evolución del hierro total del embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	80
78 y 79	Evolución del hierro total del embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	80
80 y 81	Evolución del hierro total del embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	81
82 y 83	Evolución del hierro total del embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	81
84 y 85	Evolución del hierro total del embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	82
86 y 87	Evolución del manganeso en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	83
88 y 89	Evolución del manganeso en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	83
90 y 91	Evolución del manganeso en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	84
92 y 93	Evolución del manganeso en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	84
94 y 95	Evolución del manganeso en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	85
96 y 97	Evolución de la turbidez en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	86

Figura	Título	Página
98 y 99	Evolución de la turbidez en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	86
100 y 101	Evolución de la turbidez en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	87
102 y 103	Evolución de la turbidez en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	87
104 y 105	Evolución de la turbidez en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	88
106 y 107	Evolución del amonio en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	90
108 y 109	Evolución del amonio en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	91
110 y 111	Evolución del amonio en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	91
112 y 113	Evolución del amonio en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	92
114 y 115	Evolución del amonio en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	92
116 y 117	Evolución del ortofosfato en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	94
118 y 119	Evolución del ortofosfato en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	94
120 y 121	Evolución del ortofosfato en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	95
122 y 123	Evolución del ortofosfato en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	95
124 y 125	Evolución del ortofosfato en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	96
126 y 127	Evolución de la clorofila a en el embalse de El Atazar, durante 2006 y 2007	98
128 y 129	Evolución de la clorofila a en el embalse de Pedrezuela, durante 2006 y 2007	98
130 y 131	Evolución de la clorofila a en el embalse de Pinilla, durante 2006 y 2007	99
132 y 133	Evolución de la clorofila a en el embalse de Santillana, durante 2006 y 2007	99
134 y 135	Evolución de la clorofila a en el embalse de Valmayor, durante 2006 y 2007	100
136	Estructura general de una microcistina, en donde se muestran las posiciones donde se encuentran los aminoácidos variables (X y Z)	103
137	Microcistinas y organismos que la presentan	103
138	Detalle de cianofícea <i>Microcystis</i> (izquierda). Esquema del bloqueo de la microcistina sobre fosfatasa (derecha)	104
139	Embrión de pez cebra a las 28 hpf, (Kimmel et al. 1995)	111
140	Embrión normal (izquierda) y con anomalías en encéfalo y vesícula óptica (derecha) a las 28 hpf	112
141	Embrión normal de 6 dpf	116
142	Embrión con hígado normal (izquierda) y presentando síntomas de necrosis (derecha)	117
143	Embrión con hígado hipotrofiado	117
144	Viabilidad de las agujas con 10nL de rojo fenol	121
145	Viabilidad de las agujas con 150nL de rojo fenol	122
146	Viabilidad de las agujas con 52nL de rojo fenol a 96 embriones	122

Figura	Título	Página
147	Viabilidad de las agujas con 52nL de rojo fenol a 48 embriones	123
148	Microinyección de 53 embriones, aguja 13b	124
149	Microinyección de 38 embriones, aguja 7a	124
150	Microinyección de 46 embriones	125
151	Análisis electroforético de dos muestras de RNA total, obtenidas a partir de 25 y 50 embriones de pez cebra de 48 hpf, utilizando el kit Trizol Reagent (Invitrogen). Las muestras se cargaron por duplicado (A y B)	128
152	PCR sobre DNA genómico y RT-PCR sobre el cDNA sintetizado a partir de RNA total aislado de embriones de pez cebra de 48 hpf, utilizando los oligos que amplifican la proteína b-actina	129
153	PCR sobre DNA genómico y RT-PCR sobre el cDNA sintetizado a partir de RNA total aislado de embriones de pez cebra de 72 hpf, utilizando los oligos que amplifican las proteínas b-actina (b-actin), aspartato aminotransferasa (AsAT) y lactato deshidrogenada (LDH)	130
154	Aislamiento de RNA total de embriones de pez cebra incubados en presencia de los siguientes compuestos: metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano a las concentraciones que indican su LC50 y LC5	131
155	qRT-PCR sobre cDNA sintetizado a partir de RNA total aislado de embriones de pez cebra de 72 hpf	133
156	Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina aminotransferasa (Ala-AT), L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutation-S-transferasa (GST), en presencia o ausencia, de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, en embriones de 3,5 hpf	134
157	Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en presencia o en ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, en embriones de 3,5 hpf. Repetición del experimento anterior	135
158	Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en presencia o ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano en embriones de 3,5 hpf. Repetición del experimento anterior con nuevas muestras	135
159.	Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina aminotransferasa (Ala-AT), L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutation-S-transferasa (GST), en presencia o en ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano en embriones de 72 hpf	136
160	Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en presencia o en ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, en embriones de 72 hpf. Repetición del experimento anterior	136

Figura	Título	Página
161	Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en presencia o ausencia de la LC50 y LC5 de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano en embriones de 72 hpf. Repetición del experimento anterior, con nuevas muestras	137
162	Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina aminotransferasa (Ala-AT), L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutation-S-transferasa (GST), en presencia o en ausencia de la LC50 y LC5, de los compuestos metil-mercurio, isoniazida, ácido valproico y uretano, en embriones de 48 hpf	138
163	Porcentaje de viabilidad de embriones de pez cebra incubados con 1 mg/l de microcistina-LR (MC-LR), comparados con un control sin compuesto. Los datos proceden de la media de tres experimentos distintos	140
164	Embriones de 3,5 hpf, descorionizados, tratados con distintas concentraciones de MC-LR(8 mg/l y 25 mg/l) durante 15 minutos. Imágenes tomadas a las 24, 48 y 72 hpf	141
165	Lectura del fenotipo a 3,5 hpf	143
166	Lectura del fenotipo a 24 hpf	144
167	Lectura del fenotipo a 48 hpf	144
168	Determinación de la LC50 de la MC-LR microinyectada en embriones de pez cebra	145
169	Aislamiento de RNA total de embriones de pez cebra microinyectados con MC-LR correspondiente a una EC50 de 4mg/l. La muestra el RNA aislado de dos puestas distintas	146
170	Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT); aspartato aminotransferasa (Asp-AT), alanina aminotransferasa (Ala-AT); L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutation-S-transferasa (GST), en embriones de pez cebra no microinyectados (control puesta), microinyectados con el buffer de microinyección (control micro) y microinyectados con MC-LR a 4 mg/l	146
171	Comparación de la expresión de los genes anteriormente citados, en embriones de pez cebra, no microinyectados (control puesta), microinyectados con el buffer de microinyección (control micro) y microinyectados con MC-LR a 4 mg/l. A. Media de dos réplicas del ensayo 1. B. Media de dos réplicas del ensayo 2. Repetición del experimento anterior	147
172	Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT); aspartato aminotransferasa (Asp-AT); alanina aminotransferasa (Ala-AT); L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutation-S-transferasa (GST) en embriones de pez cebra sin tratar, tratados con el control de acetona o incubados con Warfarin a 129 mg/l.	148
173	Comparación de la expresión de γ -glutamyl transferasa (GGT); aspartato aminotransferasa (Asp-AT); alanina aminotransferasa (Ala-AT); L-lactato deshidrogenada (LDH) y glutation-S-transferasa (GST), en embriones de pez cebra sin tratar, con el control de acetona o incubados con Warfarin a 129 mg/l.	149

Figura	Título	Página
174	Esquema detallado de la construcción de un pez cebra transgénico: El primer paso del esquema incluye la construcción de los vectores que se microinyectarán en los embriones, en estado de 1-2 células	162
175	Moldes de agarosa empleados para la microinyección de embriones de pez cebra	164
176	Ejemplo de estanterías y acuarios para el desarrollo y la cría de peces cebra transgénicos	164
177	Protocolo aproximado para la detección de compuestos tóxicos en el agua, utilizando embriones de Pez cebra transgénicos	165
177	Planificación del servicio de laboratorio	175
179	Poster presentado	178

11

Índice de tablas

Índice de figuras

Tabla	Título	Página
1	Origen y toxicidad aguda en ratón (μg por kilogramo) y tipo de toxicidad de las principales cianotoxinas presentes en lagos y embalses	22
2	Estadios de desarrollo del embrión de Pezcebra	35
3	Muestras analizadas en 2006 y 2007 por la Subdirección de Calidad de Aguas	49
4	Embalses en explotación por Canal de Isabel II	53
5	Características morfométricas de los embalses de estudio	54
6	Valores del disco de Secchi en los embalses de estudio en 2006 y 2007	89
7	Microcistinas y organismos que la presentan	102
8	Lectura del Test rápido de Toxicidad de ZF Biolabs	106
9	Lectura de Neurotoxicidad	114
10	Lectura de hepatotoxicidad	119
11	Enzimas elegidas para el presente estudio	126
12	Proteínas elegidas para el presente estudio	126
13	Concentraciones letales en el 50% y 5% del número de individuos, de los compuestos tóxicos estudiados	127
14	Características de los oligonucleótidos a emplear en la RT-PCR. Nombre del gen a amplificar; secuencia, temperatura de hibridación y tamaño del fragmento que resulta de la amplificación	128
15	Programa de RT-PCR empleado en los embriones	132
16	Tipos de malformaciones que presentan los embriones expuestos a tóxicos	139
17	Experimentos de microinyección de MC-LR	143
18	Experimentos realizados para calcular la LC50 del Wafarin	148
19	Muestras con resultados positivos al 75 y 95% de potencial toxicológico y con suma de toxicidad según el test FTZ	153-154
20	Número de muestras de cada tipo que se ha sometido a ensayo. En el caso de que el extracto no fuera suficiente se concentra el número de veces indicado (1.000, 2.000, etc.) respecto al peso seco por volumen de la muestra original con el fin de homogeneizar el proceso	155
21	Resumen general de resultados	155
22	Muestras de control, enviadas para realizar el test FTZ	157
23	Resumen de resultados de muestras control del laboratorio	158
24	Programación del proyecto	166

25	Ventajas e inconvenientes de las diversas alternativas, para el test diario	169
26	Tabla resumen de servicios e instalaciones precisos para el test diario	170
27	Ventajas e inconvenientes del test semanal	173
28	Tabla resumen de servicios e instalaciones para el test semanal	174

12

Referencias bibliográficas

Bibliografía

- ANDERSON DC and KRUMMEN L. 2002.
Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* 13:117-123.
- ARMENGOL, J., 1982.
Ecología del zooplancton de los embalses. *Mundo Científico*, n. 11. Vol.2. 168 178 pp.
- ARMENGOL, J., 1982.
Ciclo anual y heterogeneidad espacial en el zooplancton de una cadena de embalses del río Guadiana. *Oecologia Aquatica*, 74: 43-72.
- ARMENGOL, J., F. SABATER, JL. RIERA, M.A. PUIG. 1988.
Longitudinal changes in the zooplankton communities along a series of reservoirs in the Guadiana river (W. Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 23: 1006-1010.
- ARMENGOL, J., J. CATALAN, N. GABELLONE, D. JAUME, E. MARTÍ, JA. MORGUI, J. NOLLA, J. PEÑUELAS, M. REAL, JL. RIERA, S. SABATER, F. SABATER, J. TOJA. 1990.
A comparative limnological study of the Guadalorce reservoirs system (Málaga, SE. Spain). *Scientia Gerundensis*, 16. 27-41 pp.
- ARMENGOL, J., JL. RIERA, JA. MORGUI. 1991.
Major ionic composition in the Spanish reservoirs. *Verh. Intrenat. Verein. Limnol.* 24, 1363-1366 pp.
- BALISTRERI, L.S., J.W. MURRAY, B. PAUL, 1992.
The cycling of iron and manganese in the water column of Lake Sammamish, Washington. *Limnol. Oceanogr.* 37(3): 510-528 pp.
- BLACK JJ, MACCUBBIN AE, SCHIFFERT M. (1985).
A reliable, efficient, microinjection apparatus and methodology for the in vivo exposure of rainbow trout and salmon embryos to chemical carcinogens. *J Natl Cancer Inst.*; 75(6):1123-8.
- BLECHINGER SR, WARREN JT, KUWADA JY, KRONE PH. 2002.
Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environmental Health Perspectives* 110(10):1041-1046.
- BOERS, P., J.V.DOES, M. QAAK, J.V. VLUGT, 1994.
Phosphorus fixation with iron (III) chloride: A new method to combat internal phosphorus loading in shallow lakes? *Arch. Hydrobiol.*, 129, 3, 339-351 pp.
- BOGERS R, MUTSAERDS E, DRUKE J, DE ROODE DF, MURK AJ, VAN DER BURG B, LEGLER J. 2006. Estrogenic endpoints in fish early life-stage tests: luciferase and vitellogenin induction in estrogen-responsive transgenic zebrafish. *Environ Toxicol Chem* 25(1): 241-7.
- BOLD, HC; M.J. WYNNE. 1985.
Introduction to the algae. Prentice-Hall. Inc, 720 pp.
- BOURRELLY, P. 1966.
Les algues de l'eau douce. I. Les algues vertes. Boubée & Cie. Paris. 572 pp.1968. Les algues de l'eau douce. II. Les algues jaunes et brunes. Boubée & Cie. Paris. 517 pp.1970. Les algues de l'eau douce. III. Les algues bleues et rouges. Boubée & cie. Paris. 512 pp.
- BRAGA, M.N. 2004.
Tóxicos de origen cianobacteriano – Microcistinas Internet. 13 pp.
- BROOKS, J.L., 1969.
Eutrophication and changes in the composition of zooplankton. In: *Eutrophication: causes, consequences, correctives*. Nat. Acad. Sci. Washington DC. 236-259.
- BURÝSKOVÁ B, HILSCHEOVÁ K, BABICA P, VRSKOVÁ D, MARSÁLEK B, BLÁHA L. (2006).
Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in *Xenopus laevis* embryos and the role of microcystins. *Aquat Toxicol.* 30;80(4):346-54. Epub 2006 Nov 7.
- CARVAN MJ 3RD, DALTON TP, STUART GW, NEBERT DW.
Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 919:133-47.
- CARVAN MJ, SOLIS WA, GEDAMU L, NEBERT DW. 2000.
Activation of transcription factors in zebrafish cell cultures by environmental pollutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 376(2):320-327.
- CATALAN, J. 1990.
Química del agua. Ed. Bellisco. 20 ed. 423 pp.
- COOKE G.D., E.B. WELCH, A.B. MARTIN, D.G. FULMER, J.B. HYDE, G.D. SCHRIEVE, 1993.
Effectiveness of Al, Ca, and Fe salts for control of internal phosphorus loading in shallow and deep lakes.
- DESIKACHARY, TV. 1959.
Cyanophyta. Indian Council of Agricultural research. New Dalh. 686 pp.
- DOOLEY K AND ZON LI (2000)
Zebrafish: A model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 10:252-256.
- FINLEY KR, DAVIDSON AE, EKKER SC. 2001.
Three-color imaging using fluorescent proteins in living zebrafish embryos. *Biotechniques* 31(1):66-70, 72.
- GALE, P.M., K.R. REDDY, D.A. GRAETZ. 1992.
Mineralization of Sediment Organic Matter under Anoxic Conditions. *Journal of Environ. Quality*, 21: 394-400 pp.
- GAMRASMI, M., 1986.
Le gout de l'eau, etude de synthese. 63 pp.
- GIBBS, RJ., 1970.
Mechanism controlling world water chemistry. *Science*, 172: 870-871

- GIBBS, R.J., 1992.
A reply to the comment of Eilers et al. *Limnol. Ocean.* 37 (6): 1338-1339 pp.
- GILLE M (1999).
Microinjection into *Xenopus* oocytes and embryos. *Methods in Molecular Biology*. Vol, 127: Molecular Methods in Developmental biology: *Xenopus* and Zebrafish. 111-123.
Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- GILMOUR D, JESSEN J, LIN S. 2002.
Manipulating gene expression in the zebrafish. *PAS*. No. 261 Zebrafish, Oxford eds. pag 121-143.
- GOLDMAN D, HANKIN M, LI Z, DAI X and DING J (2001).
Transgenic zebrafish for studying nervous system development and regeneration. *Transgenic Res* 10:21-33.
- GONG ZY, WAN HY, TAY TL, WANG H, CHEN MR, YAN T. 2003.
Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308(1):58-63.
- GORDO M.C, GONZALEZ D.M, 2002.
Calidad del agua en los embalses. Eutrofización; el embalse de El Atazar. XXII Jornadas Técnicas de la Asociación de Abastecimientos de Agua y Saneamientos. *Torremolinos* pp 91–104.
- GRABHER C, JOLY JS, WITTBRODT J. 2004.
Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol.* 77:381-401.
- GRANF, G.G., R.L. OLIVER, 1982.
Vertical separation of light and available nutrients as a factor causing replacement of green algae by blue-green algae in the plankton of a stratified lake. *Journal Ecol.* 70: 829-844.
- GRIZZLE JM, PUTNAM MR, FOURNIE JW, COUCH JA. (1988).
Microinjection of chemical carcinogens into small fish embryos: exocrine pancreatic neoplasm in *Fundulus grandis* exposed to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Dis Aquat Org.*, 5:101-105.
- HAGSTROM RE, LÖNNING S. (1977).
The Teratogenic action of thalidomide on marine fish larvae. *Experientia* 33. 1227-1228.
- HERMANSON S, DAVIDSON AE, SIVASUBBU S, BALCIUNAS D, EKKER SC.
Sleeping Beauty transposon for efficient gene delivery. *Methods Cell Biol.* 2004; 77: 349-62.
- HUBER-PESTALOZZI, G. 1961.
Dasphytoplankton Des Süßwassers. Varios. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- HYATT TM, EKKER SC. (1999).
Vectors and techniques for ectopic gene expression in zebrafish. *Methods in cell biology*, vol. 59 (117-126).
- JACQUET C, THERMES V, DE LUZE A, PUISEUX-DAO S, BERNARD C, JOLY JS, BOURRAT F, EDERY M. (2004).
Effects of Microcystin-LR on development of Medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicol.*; 43(2): 141-7.
- JONES RW, HUFFMAN (1975).
Fish embryos as bioassay: material in testing chemicals for effects on cell division and differentiation. *Trnas. Am. Microsc. Soc.* 76:177-183.
- KAY BK (1991).
Injection of oocytes and embryos. *Methods in cell biology*, vol. 36, 663-669.
- KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R., ULLMANN, B. SCHILLING, T.F. (1995).
Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203: 253-310.
- KIMMEL, C.B., PATERSON, J., KIMMEL, R.O. (1974).
The Developmental and Behavioural Characteristics of the Startle Response in the Zebrafish. *Developmental Psychobiology*, 7(1): 47-60.
- LEVENTHAL JR, SUN J, ZHANG J, GALILI U, CHONG A, BAKER M, KAUFMAN DB and WRIGHT JR JR (2004).
Evidence that tilapia islets do not express alpha-(1,3)gal: Implications for islet xenotransplantation. *Xenotransplantation* 11:276-283.
- LIJKLEMA, L. 1994.
Nutrient dynamics in shallow lakes: effects of changes in loading and role of sediment-water interactions. *Hydrobiología*. 275/276: 335-348 pp.
- LIN S. 2000.
Transgenic zebrafish. *Methods Mol Biol* 136:375-83.
- LINNEY E, HARDISON NL, LONZE BE, LYONS S, DINAPOLI L. 1999.
Transgenic expression in zebrafish: A comparison of retroviral-vector and DNA-injection approaches. *Dev Biol* 213(1):207-16.
- LINNEY E, UDVADIA AJ. 2004. Construction and detection of fluorescent, germline transgenic zebrafish. *Methods Mol Biol* 254:271-88.
- LIVAK K.J. and SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using RT-quantitative PCR and the 2-Ct method (2001) *Methods* 25; 402-408.
- QUAAK, M., J.V. DOES, P. BOERS, J.V. VLUGT. 1993.
A new technique to reduce internal phosphorus loading by in-lake phosphate fixation in shallow lakes. *Hydrobiología*. 253: 337-344 pp.
- REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, BOE 21 octubre 2005, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- REDFIELD, A.C., 1934.
On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. *James Johnstone Memorial Volume*, Liverpool, U.K., 177-192.

- RIERA, J. L., y J.A. MORGUI. 1990.
Limnología regional de los embalses españoles. Mundo Científico, 104. 720-726 pp.
- RIERA, J.L., 1993.
Regional Limnology of Spanish Reservoirs. Relationships between nutrients, seston, and phytoplankton. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona. 263 pp.
- ROYLE, R.N., R.J. KING, 1992.
The phytoplankton of lake Liddell, New South Wales: Chlorophyll a concentrations, species, seasonal succession and covariation with nutrients. Hydrobiol. 245: 41-52.
- SEOK SH, PARK JH, BAEK MW, LEE HY, KIM DJ, UHM HM, HONG JJ, NA YR, JIN BH, RYU DY & OTHERS. 2006.
Specific activation of the human HSP70 promoter by copper sulfate in mosaic transgenic zebrafish. J Biotechnol. 126: 406-413.
- SMITS, J.G.C., 1991.
Water quality modelling of reservoirs in Brazil and Indonesia with WQ-ARM and STRATIF (*). Commission Internationale des Grades Barrages, Viena, 64.
- STREBLE, H. y D. KRAUTER. 1985.
Atlas de los microorganismos de agua dulce. Ed. Omega. Barcelona. 357 pp.
- STREISINGER G, WALKER C, DOWER N, KNAUBER D, SINGER F. 1981.
Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachy Danio rerio*). Nature 291(5813):293-6.
- STUART GW, VIELKIND JR, MCMURRAY JV, WESTERFIELD M. 1990.
Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. Development 109(3): 577-84.
- TAKECHI M, HAMAOKA T and KAWAMURA S (2003).
Fluorescence visualization of ultraviolet-sensitive cone photoreceptor development in living zebrafish. Febs Letters 553:90-94.
- TELLERÍA, L.J. 1984.
Estudio de la taxocenosis de rotíferos de los embalses de Lertutxe y Laukariz (Bizcaia): Dinámica de poblaciones y aspectos limnológicos. Tesis doctoral. Universidad de Bilbao. 378 pp.
- TRIFONOVA, I.S., 1989.
Changes in community structure and productivity of phytoplankton as indicators of lake and reservoir eutrophication. Arch. Hydrobiol. Beih. 33: 363-371.
- URRUTIA, J. I. 1994.
Estudio limnológico de los embalses de Aixola, Urkulu, Barrendiola, y Lareo. Guipúzcoa. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco.
- URRUTIA, J.I. and GONZÁLEZ, D.M. 2008.
Sistemas de control de las poblaciones de cianofíceas y cianotoxinas en los embalses de abastecimiento de Canal de Isabel II. XXVIII Jornadas de AEAS, 2008.
- URRUTIA, J.I, RODRIGUEZ, J.F., ACEBO, P., ROMERO, B., GUINEA, J. and GONZÁLEZ, D.M. 2007. Definición y evaluación de la aplicabilidad de un bioensayo para la determinación de la toxicidad del agua utilizando embriones de pez cebra. II Reunión española de cianotoxinas, 12 y 13 de Julio de 2007, Universidad Autónoma de Madrid.
- URRUTIA, J.I, RODRIGUEZ, J.F., ARIAS. A., MARTINEZ, M. and GUINEA, J. 2008.
New neurotoxicity test with zebrafish embryos. Society of toxicology annual meeting 2008. 16-20 de marzo de 2008. Seattle, USA.
- UTERMÖHL, H. 1931.
Über das umgekehrte Mikroskop. Arch. Hydrobiol., 22: 643 645.
- UTERMÖHL, H. 1958.
Zur vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton Methodik. Mitt Int Ver LIMNOL. N 9. 38 pp.
- VIDAL, A., J. OMTUBAN. (Sin editar).
The eutrophication process in Sau Reservoir (NE Spain). A long Term Study. 12 pp.
- WANG PJ, CHIEN MS, WU FJ, CHOU HN, LEE SJ. (2005).
Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, *Danio rerio*. Toxicol. 1; 45 (3):303-8.
- WARD AC and LIESCHKE GJ (2002) The zebrafish as a model system for human disease. Front Biosci 7:D827-D833.
- WETZEL, R.G. 1981.
Limnología. Ed. Omega. Barcelona. 679 pp.
- WETZEL, R.G., 1983.
Limnology. 2nd Ed. Saunders College Publishing. Philadelphia 767 pp.
- WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.; OBEREMM, A.; MEEMS, N.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A.; STEINBERG, C. (1999).
Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). Environ.Toxicol. Vol 14, No.1, pp 89-96.
- XU Q. (1999).
Microinjection into zebrafish embryos. Methods in Molecular Biology. Vol, 127: Molecular Methods in Developmental biology: Xenopus and Zebrafish.125-132. Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- ZAKOVA, Z., 1989.
Phytoplankton of reservoirs in relation to the trophic potential of inflow water. Arch. Hydrobiol. Beih., 33: 373-376. Zebrafish. Toxicol Sci. 84(2):368-377.
- ZHU ZY and SHU YH (2000).
Embryonic and genetic manipulation in fish. Cell Res 10.

Canal de  Isabel II

Canal de  Isabel II

www.cyii.es

Canal de Isabel II
Santa Engracia, 125. 28003 Madrid