

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Producción Animal**



**CINOBACTERIAS TÓXICAS Y MORTANDADES EN  
MASA DE FAUNA SALVAJE EN LAS MARISMAS DE  
DOÑANA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**M<sup>a</sup> del Pilar Lanzarot Freudenthal**

Bajo la dirección de los doctores:

Eduardo Costas Costas

Victoria López Rodas

Fernando Hiraldo Cano

**Madrid, 2007**

- **ISBN: 978-84-669-3042-0**



**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Producción Animal**

***Cianobacterias Tóxicas y Mortandades en Masa  
de Fauna Salvaje en las Marismas de Doñana***



**Memoria presentada por**

**M. Pilar Lanzarot Freudenthal**

**para optar al grado de**

**Doctora en Ciencias Veterinarias**

*Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro.*

Santiago Ramón y Cajal

Quiero dedicar esta tesis a mi marido:

Manolito, gracias por tu amor y coherencia en la vida.

Contigo siempre tengo ganas de afrontar nuevos retos.

Eres lo mejor que me ha ocurrido.



El Dr. Eduardo Costas Catedrático de Genética de la Facultad de Veterinaria en la Universidad Complutense de Madrid, la Dra. Victoria López Rodas, Profesora Titular de Genética de la Facultad de Veterinaria en la Universidad Complutense de Madrid y el Dr. Fernando Hiraldo Cano, Profesor de Investigación y Director de la Estación Biológica de Doñana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

**Informan que:**

El trabajo de tesis *Cianobacterias Tóxicas y Mortandades en Masa de Fauna Salvaje en Las Marismas de Doñana* ha sido realizada en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y en la Reserva Biológica de Doñana bajo nuestra dirección.

Y para que así conste firmamos en Madrid a uno de mayo de dos mil siete.

**Dr. Eduardo Costas Costas**

**Dra. Victoria López Rodas**

**Dr. Fernando Hiraldo Cano**

Catedrático de Genética

Profesora Titular de Genética

Director Estación Biológica de Doñana

Universidad Complutense de Madrid

Universidad Complutense de Madrid

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal

Estación Biológica de Doñana



**Cianobacterias Tóxicas y Mortandades en Masa de Fauna Salvaje en Las  
Marismas de Doñana**

**Memoria presentada por**

**M. Pilar Lanzarot Freudenthal**

**para optar al grado de**

**Doctora en Ciencias Veterinarias**

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta Tesis ha sido parcialmente financiada por los Proyectos Doñana 2005, CAM-S-505-AMB-374, CGL-2004-2701/HID y CGL-2005-01938/BOS.

Sin duda, la parte de mayor carga emotiva en una tesis es tener la oportunidad de poder agradecer a todas las personas que me han ayudado a lo largo de este viaje.

Primero, por motivos evidentes, quiero agradecer a mis directores de tesis la oportunidad que me han dado de trabajar en un lugar que para todos los conservacionistas y amantes de la naturaleza es como un paraíso: Eduardo, Victoria, Fernando, muchas gracias por permitir que esta “pajarera” haya realizado su tesis sobre Doñana y en Doñana. Eduardo Costas, quiero agradecerte, además, la ocasión que me ofreciste para conocer el trabajo en las expediciones científicas; no lo olvidaré nunca. Victoria López, gracias por tus pacientes correcciones y ayuda. Fernando Hiraldo, muchas gracias por dirigir mi tesis; ha sido un honor para mí.

Para continuar, ya por orden cronológico, empezaré por los agradecimientos a mi familia:

Mamá, muchas gracias por estar siempre ahí, animándome a conseguir lo que quiero en la vida. Con tu amor y ayuda en mi vida todo ha sido más fácil y, desde luego, sin tus cariñosos cuidados culinarios y de jardinería, mi cerebro no habría aguantado el tirón.

Papá, el amor a tus hijos, tu visión de la vida, la capacidad de trabajo, la forma tan admirable que tuviste de enfrentarte a las peores adversidades, permanentemente me han alentado en estos años para ser capaz de disfrutar de “todo”.

Trini, sin tus maravillosas comidas caseras mis neuronas no habrían ido muy lejos. Natacha y Tatiana, mis abogadas: gracias por esos momentos tan divertidos que tienen los hermanos. J.J., ya sé que si me pierdo en el desierto aparecerás al rescate. Alberto Alías, no he olvidado esa tarde entera viendo la estadística de los datos de hematología de los halcones (mis primeros inicios científicos) y tampoco he olvidado ese maravilloso puesto de trabajo de jardinera-regadora de

cultivos hidropónicos que me prometiste en aquellos días de “incierto futuro”. David Villar, qué buenos están los “crunchis”; sin duda, el chocolate es alimento de neuronas, gracias por tu apoyo en la toma de decisiones. Juli, Emiliano, Irene, Jesús: gracias por todas las reuniones familiares celebradas siempre en vuestra casa y por no desmayaros cuando Runa se comió en un segundo la lubina a la sal al abrir el horno. Runa, ya ves que no me olvido de ti: volver a casa y encontrarte en la estación, siempre esperándome, era uno de los alicientes de cada viaje. José Javier Fernández, mi sobrinito, tu esfuerzo e ilusión también me han animado a seguir siempre en la brecha. Alejandra y Carlota (mi ahijada) lleváis muy poco tiempo pero, sin duda, también habéis ayudado con vuestra pequeña huella en mi estado de ánimo. Mis tíos Carlos y Mari Cruz, con su cariño, me han permitido seguir adelante.

Carlos Doñamayor, Isabel Alonso, Silvia, Nuria; sois mi familia, a vosotros también os debo el haber conseguido acabar la tesis. Nos queda otra celebración, Isabel pone el Tokai y nosotros ¡la comida!

Iciar Martínez, como sé que siempre estás y estarás, también te agradezco de corazón tu apoyo.

Mar López: no sé dónde colocarte, si en el apartado de familia o en el de amigos. Sin duda, eres y serás la mejor amiga que he tenido en la vida. Sin tu ayuda no habría acabado la carrera, ni abordado mi trabajo en la clínica, ni me habría reído tanto. Gracias por todo pero, en estos años de tesis, gracias por echarme una mano siempre desinteresada y no me olvido de ese bonito ordenador nuevecito que, se puede decir, estrené cuando me robaron el mío y con el que he podido acabar esta tesis. Jose Maga, gracias por ayudarme en esas selecciones en las que me meto y por todos esos brindis que nos damos y que nos vamos a dar.

En el ámbito universitario, mi primera experiencia con la burocracia no ha sido un desastre gracias a Javier Torres, que trata a los becarios con el mismo respeto y prestándoles la misma atención que a un catedrático. Javier, además de tu ayuda profesional quiero agradecerte de corazón tu amistad y por supuesto esas sensacionales lentejas que cocinas. Espero conservar tu amistad y la de Cristina siempre.

En la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid siempre me he sentido

como en casa, muchas gracias a todos. Sin embargo, en el Departamento de Farmacología me han acogido de forma especial y me han ayudado en todo lo que he necesitado: Manolo, Mariló... a todos, muchísimas gracias. Además, Casilda Rodríguez me ayudó a realizar el tratamiento estadístico de esta tesis. Casilda, muchísimas gracias por tu ayuda, paciencia y ganas de hacer bien las cosas del trabajo y de la vida. Sin duda, gracias a ti me inicié en la investigación y creo que no la dejaré nunca. Eres una magnífica docente pero, además, una magnífica persona; gracias, muchísimas gracias por brindarme tu ayuda y amistad; espero poder corresponderte algún día. Mariví Barahona, también a tu buen hacer en momentos muy complicados debo la existencia de esta tesis. Ojalá pudiera expresarme mejor con las palabras: sé que estaré en deuda también contigo. En algunas situaciones de la vida uno ve lo peor, pero también lo mejor, de las personas; muchísimas gracias, Mariví.

José Luis Blanco y Marta Eulalia García me ayudaron mucho a lo largo de todo este periodo de tesis: con vuestro buen trabajo de investigación me he sentido orgullosa de pertenecer al grupo de investigación COVEMI. Con vuestro apoyo cariñoso y sabios consejos profesionales y personales he superado grandes baches. Os considero magníficos investigadores y buenos amigos; muchísimas gracias.

Sebastián Sánchez, Sebas, también estoy en deuda contigo: creo que tienes mucho que enseñar y nosotros mucho que aprender, dentro y fuera de COVEMI.

En una tesis uno comparte muchas cosas con sus iguales: mis compañeros “becarios”, con y sin beca. Nieves Perdigones, gracias por tu ayuda; Sergio Álvarez, no olvidaré tus buenas intenciones al intentar ayudarme a enfrentar la estadística; sin duda fue un gesto que siempre os agradeceré; Mónica Rouco, aunque hemos trabajado poco tiempo juntas, te considero una buena compañera y te agradezco tu sincero interés y ganas de echar siempre una mano. Fernando Marvá (Fernandito): muchísimas gracias por estar siempre ahí; por los cafés, por los ánimos, por ser uno de los mejores compañeros que he tenido. También tengo palabras de agradecimiento para todos los becarios del Departamento de Producción Animal, que se mostraron preocupados y atentos en mis momentos de crisis ofreciéndome siempre su apoyo y ánimo. Raquel Pérez, me alegro de haberte conocido. ¡A todos os deseo lo mejor!

Mili Maneiro: ¡ánimo! lo mejor está por venir... ¡no lo dudes nunca!

Quiero agradecer también al Departamento de Producción Animal su buena acogida, en especial a nuestro Director, Pedro Rouco, que siempre está animando y... ¡ayudando!

El servicio de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, con su excelente trabajo, siempre me ha facilitado las cosas. Gracias a todos.

En Doñana todo han sido facilidades gracias a la magnífica labor de José Juan Chans, que siempre ha estado pendiente de nuestro trabajo: muchas gracias por tu apoyo, preocupación y ayuda. El trabajo científico no se habría podido completar sin la ayuda de todo el Equipo de Seguimiento de la Estación Biológica de Doñana, especialmente de Hugo Le Franc, que conseguía completar en un tiempo récord todos los recorridos, ayudándonos y animando el viaje con sus geniales frases. A Manuel Máñez le tengo que agradecer toda la ayuda recibida para conseguir los censos y bibliografía; sin su ayuda no hubiera podido disponer de muchísimos datos. Isidro y Ana Andreu, gracias por prestarme vuestra eficaz colaboración en esas situaciones de prisas que surgen en todo trabajo científico.

También quisiera agradecer de manera muy especial a Manuel Fernández su inestimable labor de revisión y corrección de las distintas versiones de la tesis y en el uso de programas GIS para la elaboración y edición de los mapas.

Asimismo me gustaría agradecer al Hospital Centro Médico Veterinario, particularmente a Tomás Fernández, Lucía Gómez y Ana Ríos porque, desde mis comienzos como estudiante y a lo largo de toda mi carrera profesional, me han sabido inculcar las ganas de aprender y mejorar como meta permanente en la profesión veterinaria. Ellos saben valorar el esfuerzo de concluir una tesis.

Por último, quiero agradecer a Santiago Rubio y a Emilio Rivas el apoyo moral y todas las facilidades que me han ofrecido durante la última fase de esta tesis.

**ÍNDICE**

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>- 16 -</b>
1.1 BIOLÓGIA CELULAR DE LAS CIANOBACTERIAS .....	- 18 -
1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS CIANOTOXINAS .....	- 22 -
1.2.1 Péptidos cíclicos.....	- 23 -
1.2.2 Alcaloides.....	- 25 -
1.2.3 Lipopolisacáridos (LPS) .....	- 29 -
1.3 ECOESTRATEGIA DE LAS CIANOBACTERIAS .....	- 30 -
1.4 MORTANDEDES PROVOCADAS POR CIANOTOXINAS .....	- 39 -
1.5 EL MEDIO NATURAL DEL ENTORNO DE DOÑANA .....	- 40 -
1.5.1 Aspectos climáticos e hidrogeológicos .....	- 41 -
1.5.2 Ecosistemas del entorno de Doñana .....	- 44 -
1.5.3 Apuntes sobre la fauna de Doñana .....	- 48 -
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>- 51 -</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>- 53 -</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDIO Y CARTOGRAFÍA .....	- 53 -
3.1 DATOS HISTÓRICOS .....	- 53 -
3.1.1 Periodo que abarcan los datos históricos.....	- 53 -
3.1.2 Mortandades surgidas en el periodo histórico .....	- 54 -
3.1.3 Datos históricos sobre presencia de cianobacterias tóxicas en Doñana.....	- 54 -
3.2 DATOS ACTUALES .....	- 54 -
3.2.1 Periodo de estudio.....	- 54 -
3.2.2 Selección de lugares de muestreo de agua.....	- 54 -
3.2.3 Frecuencia y toma de muestras de agua.....	- 57 -
3.2.4 Identificación y recuentos de cianobacterias.....	- 58 -
3.2.5 Determinación de clorofila a .....	- 59 -
3.2.6 Análisis de nitratos y fosfatos.....	- 60 -
3.2.7 Extracción de toxinas .....	- 60 -

3.2.8	<i>Análisis para la medición de microcistina</i> .....	- 61 -
3.2.9	<i>Análisis para la medición de la toxina PSP</i> .....	- 61 -
3.2.10	<i>Bioensayo en ratón</i> .....	- 61 -
3.2.11	<i>Descripción de los sucesos de mortandad y necropsias</i> .....	- 62 -
3.2.12	<i>Estimación de la repetibilidad, reproducibilidad y precisión en la detección de las toxinas</i> - 63 -	
3.3	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	- 63 -
3.3.1	<i>Análisis estadístico de datos históricos</i> .....	- 64 -
3.3.2	<i>Análisis estadístico básico de datos actuales</i> .....	- 64 -
3.3.3	<i>Análisis estadístico detallado de datos actuales</i> .....	- 65 -
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>- 66 -</b>
4.1	<b>DATOS HISTÓRICOS</b> .....	- 66 -
4.1.1	<i>Mortandades surgidas en el periodo histórico</i> .....	- 66 -
4.2	<b>DATOS ACTUALES</b> .....	- 72 -
4.2.1	<i>Identificación y recuentos de cianobacterias</i> .....	- 72 -
4.2.2	<i>Resultados de la determinación de clorofila a</i> .....	- 79 -
4.2.3	<i>Resultados de los análisis de nitratos y fosfatos</i> .....	- 80 -
4.2.4	<i>Resultados de los análisis para la medición de microcistina</i> .....	- 82 -
4.2.5	<i>Resultados de los análisis para la medición de la toxina PSP</i> .....	- 85 -
4.2.6	<i>Resultado del bioensayo en ratón</i> .....	- 85 -
4.2.7	<i>Mortandades surgidas en el periodo actual</i> .....	- 88 -
4.3	<b>RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	- 90 -
4.3.1	<i>Análisis de datos históricos</i> .....	- 90 -
4.3.2	<i>Análisis de datos actuales</i> .....	- 93 -
4.3.3	<i>Análisis detallado de datos actuales</i> .....	- 96 -
4.3.4	<i>Estudio de los datos estadísticos obtenidos</i> .....	- 98 -
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>- 105 -</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>- 136 -</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>- 137 -</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Censos de Ciconiformes y Phoenicopteriformes (Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales, Estación Biológica de Doñana, CSIC).....	- 49 -
Tabla 2. Puntos de muestreo, coordenadas UTM de localización de referencia en el mapa1 .....	- 55 -
Tabla 3. Años y puntos de aparición de mortandades (datos históricos) junto con las coordenadas UTM y sus correspondencias con las cuadrículas del mapa 3. ....	- 68 -
Tabla 4. Número de animales muertos, fechas de inicio y final de las mortandades históricas. ...	- 71 -
Tabla 5. Cianobacterias tóxicas encontradas en las localidades de muestreo .....	- 72 -
Tabla 6. Abundancia de las distintas especies de cianobacterias identificadas en los lugares de muestreo. ....	- 74 -
Tabla 7. Fechas de aparición de especies de cianobacterias tóxicas presentes en las localidades de muestreo en el Periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).....	- 75 -
Tabla 8. Abundancia de las cianobacterias tóxicas (colonias/ml) presentes en los lugares de muestreo y cianobacterias tóxicas más abundantes. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje). ....	- 77 -
Tabla 9. Abundancia (colonias/mL) y concentración de clorofila ( $\mu\text{g/L}$ ) de las cianobacterias tóxicas presentes en los lugares de muestreo en el Periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).....	- 79 -
Tabla 10. Concentración de nitratos ( $\text{mg/L}$ ) y fosfatos ( $\text{mg/L}$ ) obtenidos del agua en los lugares de muestreo en el periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que	

correspondieron con mortandad de fauna salvaje).....	- 81 -
Tabla 11. Concentraciones de microcistina-LR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de las cianobacterias recogidas durante los muestreos realizados en el periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).....	- 82 -
Tabla 12. Concentración de microcistina-LR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el contenido ventricular de los cadáveres recogidos durante la mortandad de junio de 2004.....	- 83 -
Tabla 13. Concentración de toxina medida en los hígados de las aves y peces muertos muestreados de la mortandad de julio de 2004. ....	- 84 -
Tabla 14. Bioensayos en ratón realizados con las muestras recogidas en los puntos de muestreo (3+ tres ratones muertos en 24 horas; 2+ dos ratones muertos en 24 horas; 1+ un ratón muerto en 24 horas; y 0 cuando los tres ratones estaban vivos a las 24 horas postinyección) (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).....	- 85 -
Tabla 15. Resultados de los bioensayos en ratón realizados con el contenido de los ventrículos de los cadáveres de aves necropsiadas.....	- 87 -
Tabla 16. Contenidos de los ventrículos de los cadáveres recogidos durante las mortandades de aves de 2004. ....	- 89 -
Tabla 17. Comparación estadística (U de Mann-Whitney) entre los meses en los que han aparecido mortandades en datos históricos y actuales (en negrilla los valores significativos, $p < 0,05$ ). ....	- 101 -
Tabla 18. Comparación estadística (test de Spearman) entre los parámetros presencia de mortandad, número de colonias, concentración de nitratos, concentración de fosfatos, concentración de clorofila y cuadrícula en la que se produce (en negrilla los valores significativos, $p < 0,05$ ). ....	- 103 -

Figura 1. Estructuras de las microcistinas y nodularinas	- 24 -
Figura 2. Estructura general de las saxitoxinas (Wiegand y Pflugmacher 2005)	..... - 28 -
Figura 3. Estructura de la cilindrospermopsina (Wiegand y Pflugmacher, 2005)	..... - 29 -
Figura 4. Estructura del componente tóxico de los lipopolisacáridos (Wiegand y Pflugmacher, 2005)	..... - 30 -
Figura 5. Comportamiento del agua embalsada a latitudes templadas durante un ciclo anual	..... - 34 -
Figura 6. Representación de las cuadrículas en las que surgieron mortandades (en porcentaje) en el periodo histórico	..... - 91 -
Figura 7. Representación del número de cuadrículas que se vieron afectadas por la aparición de alguna mortandad en cada año	..... - 92 -
Figura 8. Representación del número de mortandades que surgieron en cada mes a lo largo del periodo de estudio (datos históricos)	..... - 93 -
Figura 9. Representación de las cuadrículas en las que surgieron mortandades (en porcentaje) en el periodo de datos actuales	..... - 94 -
Figura 10. Representación del número de cuadrículas que se vieron afectadas por la aparición de alguna mortandad en cada año	..... - 95 -
Figura 11. Representación del número de mortandades que surgieron en cada mes a lo largo del periodo de estudio (datos actuales)	..... - 95 -
Figura 12. Logaritmo de la concentración de colonias de cianotoxinas surgidas en los años de estudio representados en las cuadrículas de aparición (datos actuales)	..... - 96 -

Figura 13. Concentración de cianotoxinas por cuadrícula de aparición (datos actuales) .....	- 97 -
Figura 14. Porcentaje de aparición de mortandades (datos históricos y actuales) en cada cuadrícula a lo largo de todo el periodo de estudio .....	- 99 -
Figura 15. Número de cuadrículas afectadas por una mortandad a lo largo del periodo de estudio (datos históricos y actuales) .....	- 100 -
Figura 16. Número de mortandades que surgieron en cada mes a lo largo del periodo de estudio (datos históricos y actuales) .....	- 101 -
Figura 17. Árbol de decisiones que establece que parámetro (número de colonias, concentración de nitratos, concentración de fosfatos, concentración de clorofila, cuadrícula, mes, año y concentración de toxina) afecta más para la aparición de mortandades. ....	- 104 -
Figura 18. Niveles de alerta en relación con los recuentos de colonias, clorofila <i>a</i> y niveles de toxinas. ....	- 133 -
Figura 19. Pasos que se han de tomar a lo largo de la necropsia .....	- 134 -

## **ANEXO DE MAPAS**

Mapa 1: Distribución de los puntos de muestreo de los datos actuales.

Mapa 2: Distribución de los puntos con presencia y ausencia de cianobacterias de los datos actuales.

Mapa 3: Distribución de las mortandades (datos históricos).

## **RESUMEN**

Las Marismas de Doñana, desde 1969, han disfrutado del grado máximo de protección mediante su declaración como Parque Nacional. Posteriormente, se han ido ampliando los modelos de protección y el área protegida en un cinturón amplio alrededor del núcleo del Parque Nacional. A pesar de todo, desde su declaración como Parque Nacional, hace ya 37 años, se han registrado un total de 18 sucesos de mortandad en masa de fauna salvaje, cuyas causas no han podido ser precisadas con rigor científico hasta el momento. Teniendo en cuenta la extraordinaria importancia ecológica de Doñana, la realización de estudios que permitan conocer el origen de tales mortandades, no sólo estaría plenamente justificada, sino que se revela como un instrumento totalmente imprescindible y de urgente concreción. Los resultados de esta tesis sugieren que las proliferaciones de cianobacterias son fenómenos frecuentes en Doñana, claramente relacionados con, al menos, buena parte de las mortandades de fauna salvaje ocurridas allí en los últimos años y que, además, pueden ser, en muchos aspectos, predecibles.

**Palabras clave:** Cianobacterias, Cianotoxinas, Doñana, Mortandades de Fauna Salvaje.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Las cianobacterias, también conocidas como cloroxibacterias, algas verde-azuladas y cianofíceas (Margulis y Schwartz 1999; Graham y Wilcox, 2000; Briand *et al.*, 2003) pertenecen al Phylum Cyanobacteria y, con unas 2.000 especies aproximadamente, están difundidas por todo el mundo ocupando, prácticamente, todos los ecosistemas incluidos los ambientes extremos (Crispin y Gaylarde, 2005). No obstante, los medios límnicos y marino son los más importantes para las cianobacterias (Whitton, 1992; Mur *et al.*, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Sitte *et al.*, 2004).

Una característica muy significativa es su capacidad para proliferar de forma masiva bajo determinadas circunstancias ambientales. Estas proliferaciones provocan alteraciones en las condiciones físico-químicas del agua, modificando el valor del pH, la cantidad de oxígeno disuelto y llegan a producir olor y sabor indeseables, así como una alteración estética de las masas de agua. Además, son capaces de producir toxinas (Azevedo *et al.*, 2002) que llegan a provocar cuadros de intoxicación agudos o crónicos en animales y plantas (Sivonen y Jones, 1999; Roset *et al.*, 2001).

Otro aspecto importante es su asociación simbiótica con plantas y animales (Rai, 1990; Graham y Wilcox, 2000). En este sentido, se considera actualmente que los cloroplastos de las células vegetales fueron originariamente cianobacterias englobadas por fagocitosis en un hospedador, evolucionando a partir de ese momento de forma conjunta (Berry, 2003). Esta teoría, denominada endosimbiosis, fue formulada por Lynn Sagan en 1967.

Las cianobacterias constituyen uno de los grupos de procariotas más antiguos, pudiendo haber existido desde hace 3.300 o 3.500 millones de años (Des Marais, 2000; Briand *et al.*, 2003). De hecho, el registro más antiguo de microfósiles de cianobacterias bien datado y preservado es el del yacimiento de Apex Chert, en Marble Bar, Oeste de Australia, descrito por J. W. Schopf, cuya edad se estima en unos 3.465 millones de años. Estos procariotas fueron las formas dominantes durante, al menos, mil millones de años (Graham y Wilcox, 2000).

La actividad de las antiguas cianobacterias queda de manifiesto en los sedimentos mineralizados y laminados denominados estromatolitos, análogos a los que, todavía hoy, se siguen formando en

condiciones apropiadas en aguas dulces, termales y marinas (Margalef, 1983). El registro de microfósiles de cianobacterias del Proterozoico es muy importante ya que, en esta Era, los estromatolitos estaban ampliamente distribuidos a lo largo de los bordes de las placas continentales (Des Marais, 2000). La aparición en el tiempo de las primeras cianobacterias tóxicas es difícil de precisar pero existen registros paleontológicos que han llevado a plantear directamente una relación entre ciertas mortandades de vertebrados y proliferaciones de cianobacterias tóxicas en el Pleistoceno (Braun y Pfeiffer, 2002).

El oxígeno actualmente constituye cerca del 20% del gas contenido en la atmósfera, pero hace 3.000 millones de años existían sólo trazas y aquella atmósfera estaba integrada, fundamentalmente, por metano, amonio y otros compuestos reductores (Sleep, 2001; Lee, 1999). Las cianobacterias han tenido una enorme influencia en el avance evolutivo y en la diversidad biológica del planeta al propiciar cambios ambientales esenciales, generando oxígeno y contribuyendo de forma decisiva a la evolución de la atmósfera primitiva. El oxígeno atmosférico, del que dependemos, fue generado por las cianobacterias fotosintetizadoras durante la Era del Arcaico y Proterozoico, y el desarrollo de los organismos aerobios sólo fue posible después de que se acumularan en la atmósfera apreciables cantidades de O<sub>2</sub>, generado mediante la fotosíntesis oxigénica de las cianobacterias y, posteriormente, también por algas y plantas (Schopf, 1993; Graham y Wilcox, 2000; Sleep, 2001).

Históricamente, la taxonomía de las cianobacterias se ha realizado bajo la nomenclatura del International Code of Botanical Nomenclature, basándose en los caracteres fenotípicos de las mismas. Sin embargo, dichos caracteres varían como respuesta a las condiciones medioambientales y la organización de las cianobacterias es, además, claramente procariota, por lo cual el abordaje taxonómico más apropiado es el bacteriológico. De hecho, el Manual of Systematic Bacteriology (Bergey) las incluye como una rama de las bacterias oxigénicas fotosintéticas (Suda *et al.*, 2002).

El problema taxonómico de las cianobacterias viene originado por ser microorganismos procariotas pero capaces de realizar una fotosíntesis oxigénica similar a la de plantas superiores. Esto ha propiciado que, incluso actualmente, sigan un sistema de nomenclatura doble ya que, por ser procariotas, están incluidas en el International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)/International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB) y, por otra parte, al estar consideradas algas verde-azuladas, también han sido incluidas en el International Code of

Botanical Nomenclature (ICBN). No obstante, en la actualidad ya se está avanzando en la unificación de criterios para evitar las confusiones que este doble sistema de nomenclatura provoca: así, Oren (2004) aboga por la unificación de las reglas taxonómicas de las cianobacterias/algas verde-azuladas, ya que opina que la estabilidad de la nomenclatura es la primera condición para progresar en su estudio. Actualmente son consideradas cianobacterias.

## **1.1 BIOLOGÍA CELULAR DE LAS CIANOBACTERIAS**

Las cianobacterias son organismos procariotas de gran tamaño. Se caracterizan por contener carotenoides, clorofila *a* y ficobiliproteínas y son capaces de utilizar el glucógeno como sustancia de reserva (Margalef, 1983; Graham y Wilcox, 2000).

La pared de las cianobacterias es bastante complicada y varía considerablemente según el taxón. En general, la estructura de la pared celular de las cianobacterias es básicamente la misma que las de las bacterias Gram negativas pero rodeada por cubiertas orgánicas mucilaginosas, siendo su principal componente el peptidoglicano, que constituye el 50% del peso seco (Lee, 1999). Se han descrito de tres a seis capas integrantes de la pared celular pero sólo las dos más internas (LI y LII) son iguales en todas las cianobacterias. La estructura de la pared o cubierta exterior de la LII depende de las condiciones medioambientales y de la cantidad de mucílago secretado (Margalef, 1983; Lee, 1999; Smarda *et al.*, 2002). Esta capa de mucílago exterior es fibrilar y su función es proteger las células de la sequedad, aunque también está relacionada con la capacidad de realizar movimientos, ya que se ha visto que algunas cianobacterias realizan movimientos fotocinéticos, de importancia ecológica, secretando mucílago o bien realizando ondulaciones con la superficie de la célula (Lee, 1999; Mur *et al.*, 1999; Smarda *et al.*, 2002). Por otra parte, estas capas de mucílago las protegen del zooplancton herbívoro (Briand *et al.*, 2003).

El ADN no está confinado en ningún núcleo, y forma un cromosoma organizado en secuencias únicas no asociado a histonas. El ARN está contenido en ribosomas 70S que se encuentran dispersos en el protoplasma. Presentan tilacoides que contienen a la clorofila *a*, las ficobiliproteínas y los gránulos de glucógeno. Los tilacoides van asociados a los ficobilisomas que, a su vez, contienen a los carotenoides y las ficobilinas (ficocianina y ficoeritrina) (Lee, 1999; Sitte *et al.*, 2004). Son la ficocianinas las que les confieren el color azulado a las cianobacterias.

Las cianobacterias tienen una gran capacidad de almacenamiento de nutrientes esenciales, que son acumulados bajo condiciones de abundancia (Mur *et al.*, 1999). Como sustancias de reserva presentan las siguientes:

- Gránulos de cianoficina que son sustancias de reserva nitrogenada consistentes en grandes compuestos de proteínas en forma de polipéptidos, que usualmente contienen ácido aspártico y arginina. La cantidad de gránulos de cianoficina varía con el ciclo de crecimiento, siendo bajo en crecimiento exponencial y alto en la fase estacionaria del cultivo.
- Los carboxisomas o cuerpos poliédricos, que aparecen en la parte central de las células y contienen la enzima fijadora de dióxido de carbono (ribulosa-1,5-difosfato carboxylasa/oxygenasa). La cantidad de célula ocupada por los carboxisomas se incrementa conforme el carbono inorgánico disminuye en el medio.
- Cuerpos de polifosfato o gránulos de volutina, que contienen fosfato almacenado. En las células jóvenes en crecimiento no están desarrollados y tampoco en células que crecen en un medio carente de fosfato.
- Gránulos de poliglucano, que se distribuyen entre los tilacoides y son abundantes en las células que realizan activamente la fotosíntesis (Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Sitte *et al.*, 2004).

Vemos, pues, que como resultado de la fotosíntesis aparecen muchas sustancias que, además de actuar como sustancias de reserva, en las cianobacterias que presentan vesículas de gas, actúan como lastre colapsando estas vesículas, dando lugar a una disminución de su flotabilidad (Mur *et al.*, 1999; Graham y Wilcox, 2000).

Algunas cianobacterias presentan vesículas o vacuolas de gas, que constituyen unas estructuras de gran interés e importancia. En realidad, los términos vesícula y vacuola son imprecisos porque estas estructuras no están delimitadas por membranas sino que son cámaras huecas con forma cilíndrica formadas, exclusivamente, por una proteína integrada por 33 residuos aminoacídicos repetidos que tiene un peso molecular de 0,6 kD con un exterior hidrofílico y un interior hidrofóbico (Walsby y Hayes, 1989; Mur *et al.*, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Dunton y Walsby, 2005) y que es

totalmente permeable al gas, de forma que los gases que contienen dependen del ambiente atmosférico y difunden rápidamente dentro y fuera de la célula (Cohen-Bazire *et al.*, 1969; Walsby y Hayes, 1989). Estas vesículas de gas tienen un tamaño que varía entre 62 -110  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,3 – 1  $\mu\text{m}$  de ancho, dándoles la apariencia de cilindros. La longitud de estos cilindros no está relacionada con la resistencia de las vesículas pero la anchura sí, siendo las vesículas de gas estrechas mas fuertes que las anchas (Graham y Wilcox, 2000).

Una de las características que presentan estas vesículas es su capacidad para refractar la luz haciendo que, al microscopio óptico, las células se aprecien de color oscuro o parezca que contienen en el interior gránulos negros (Graham y Wilcox, 2000). Cuando se producen proliferaciones, las vesículas son, en parte, las responsables de la turbidez del agua debido, principalmente, a la refracción que provocan. Por esta razón, el colapso de las vesículas de gas en una suspensión de cianobacterias causa una disminución en la turbidez, debido a la desaparición de los espacios llenos de gas, que tienen un índice de refracción menor que el medio acuoso que los rodea (Porat *et al.*, 1999).

El Manual Bergey divide a las cianobacterias en cinco grupos morfológicos: unicelulares con división por fisión binaria; unicelulares con división por fisión múltiple (dando lugar a pequeñas células hijas o baeocitos); filamentosas (compuestas por un tricoma o cadena de células que crece por división de células intercalares) con células diferenciadas llamadas heterocistes y los acinetos y que se reproducen por formación de hormogonios (segmento corto del tricoma con función reproductora), por rotura al azar del tricoma y por germinación de acinetos.; filamentosas sin formar heterocistes; y filamentosas ramificadas (Castenholz y Waterbury, 1989; Madigan *et al.*, 1999; Graham y Wilcox, 2000).

Los heterocistes son células de mayor tamaño que las células vegetativas, con una pared gruesa que impide el paso de los gases, carentes de gránulos de almacenamiento, fotosintéticamente inactivas y capaces de fijar dinitrógeno ( $\text{N}_2$ ). Gracias a la enzima nitrogenasa que contienen convierten el  $\text{N}_2$  en amonio ( $\text{NH}_4$ ). La fijación del  $\text{N}_2$  es un proceso metabólico fundamental en las cianobacterias y en el ecosistema, ya que esta es una forma de incorporar el nitrógeno a la cadena trófica (Mur *et al.*, 1999). El desarrollo de heterocistes se produce cuando la cantidad de nitrógeno en la cianobacteria disminuye. Los heterocistes tienen un tiempo de vida limitado y cuando se deshacen se fragmenta el

filamento de la cianobacteria (Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Sitte *et al.*, 2004). Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno están ampliamente distribuidas entre las filamentosas y son los géneros formadores de heterocistes. Sin embargo, hay también varios ejemplos bien documentados de fijación del dinitrógeno entre las cianobacterias no formadoras de heterocistes, como es el caso del género *Trichodesmium* (Carpenter *et al.*, 1992).

Los acinetos son células vegetativas especializadas presentes únicamente en cianobacterias capaces de producir heterocistes (órdenes Nostocales y Stigonematales). Presentan una pared muy fina y abundantes reservas de alimento en forma de gránulos. Aparecen con frecuencia al lado de los heterocistes, bloqueando el paso de compuestos de nitrógeno desde estos a otras células vegetativas. Existe una correlación positiva entre la presencia de heterocistes y la producción de acinetos que, aunque también son formas de reproducción, se considera que tienen un papel relevante como formas de resistencia en condiciones medioambientales desfavorables. En esas situaciones aumentan de tamaño, incrementan las sustancias de reserva y pierden, por tanto, la capacidad de flotación, lo que les permite hundirse en los sedimentos para pasar el invierno y germinar cuando las condiciones son adecuadas. En ese momento, los gránulos de almacenamiento de cianoficina y glucógeno están prácticamente metabolizados y van apareciendo las vesículas de gas que permiten a estas cianobacterias subir de nuevo a la superficie. Los estímulos medioambientales que provocan el desarrollo de los acinetos todavía dan lugar a controversia, siendo descritos como tales la deficiencia de fosfato, la baja temperatura, la limitación de carbono y la reducción en la disponibilidad de energía lumínica (Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Sitte *et al.*, 2004).

Los pigmentos fotosintéticos son las moléculas que absorben longitudes de onda en la región visible del espectro de luz y transforman esa energía lumínica en energía química mediante la fotosíntesis (Douglas, 1994). Se clasifican en primarios y accesorios. La clorofila *a* es el pigmento primario de las cianobacterias y, como tal, su finalidad principal es la captación de la energía lumínica. Como pigmentos accesorios se encuentran las ficobiliproteínas, que incluyen la aloficocianina, ficocianina, y, algunas veces, ficoeritrina (Cohen-Bazire y Bryant, 1969). En las cianobacterias los pigmentos accesorios permiten ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios, pudiendo utilizar de forma muy efectiva la región del espectro de luz entre los picos de absorción de la clorofila *a* y los carotenoides.

La biosfera recibe radiación solar comprendida entre los 290 nm y los 3.000 nm de longitud de onda, pero básicamente la mayor proporción de la energía (45%) está concentrada entre los 380 nm y los 710 nm, que constituye el rango de absorción de las clorofilas y los pigmentos accesorios de las cianobacterias (Larcher, 1995). Las cianobacterias son capaces de producir pigmentos accesorios, necesarios para absorber la luz de la forma más eficiente según el hábitat en el que está presente (Mur *et al.*, 1999; Samsonoff y MacColl, 2001; Sitte *et al.*, 2004). Gracias a la eficacia y propiedades absorbentes de los ficobiliproteidos, las cianobacterias pueden realizar la fotosíntesis tanto en profundidades a las que no llegue bien la luz como en medio de una alfombra de algas verdes que les estén haciendo sombra (Sitte *et al.*, 2004). La síntesis de ficobiliproteínas es particularmente susceptible a las influencias medioambientales, especialmente de calidad de luz. La adaptación a la cantidad de luz recibida se cree debida a la distinta actividad de transcripción de los genes para las diferentes ficobilinas.

Las cianobacterias son fotoautótrofas oxigénicas, con dos centros de reacción: el fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII). Se sabe que cuando un organismo que realiza la fotosíntesis oxigénica es expuesto a radiación solar o radiación UV muy fuerte se produce la inactivación del PSII produciendo la muerte de las células (Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Sitte *et al.*, 2004; Zsiros *et al.*, 2006). Sin embargo, las cianobacterias tienen las ficobiliproteínas, que actúan, por un lado, como sistema de protección frente a la luz excesiva y, además, son capaces de reparar rápidamente el fotoinactivado PSII. El fenómeno de fotoinactivación y reparación es lo que se conoce como fotoinhibición (Zsiros *et al.*, 2006).

## **1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS CIANOTOXINAS**

Skulbertg *et al.* (1993) consideran que existen unos 150 géneros de cianobacterias con unas 2.000 especies de las cuales, al menos, 80 son productoras de toxinas, también llamadas cianotoxinas.

Se considera que entre el 50% y el 75% de las proliferaciones que se producen son tóxicas (Graham y Wilcox, 2000). Además, una misma especie puede tener cepas productoras y no productoras de toxinas. Esto podría deberse a que, en muchos casos, las toxinas son metabolitos secundarios en la formación de los fotopigmentos, que se acumulan en determinadas situaciones (Roset *et al.*, 2001). Por otro lado, se han encontrado variaciones en la toxicidad, no sólo entre distintas cepas de

diferentes lugares de muestreo, sino también distintos niveles de toxicidad en cepas aisladas de una misma proliferación, demostrando así que, no sólo el factor ambiental, sino también las diferencias genéticas están relacionadas con las concentraciones de toxinas que se producen (Carrillo *et al.*, 2003; Zurawell *et al.*, 2005).

Las cianotoxinas se han clasificado, según su mecanismo de acción, en neurotóxicas, hepatotóxicas y dermatotóxicas (Sivonen y Jones, 1999; Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Roset *et al.*, 2001). Otra clasificación las divide en hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas irritantes (lipopolisacáridos) (Wiegand y Pflugmacher, 2005). También se han clasificado en función de su capacidad letal (Carmichael *et al.*, 1990). Sin embargo, consideramos que Sivonen y Jones (1999) establecen una clasificación de acuerdo con las características químicas de los compuestos tóxicos que permite, de forma muy clara, entender los mecanismos de acción. Estos autores, clasifican a las cianobacterias en péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos (LPS).

### 1.2.1 Péptidos cíclicos

El primer compuesto encontrado en el agua producido por las cianobacterias fue un heptapéptido cíclico. Las toxinas con la estructura de péptidos cíclicos son las microcistinas y nodularinas, moléculas largas de gran peso molecular que contienen siete y cinco aminoácidos, respectivamente, con los dos aminoácidos terminales de la línea de péptidos condensados, formando un compuesto cíclico (revisado por Sivonen y Jones, 1999)

Estos compuestos fueron aislados por primera vez de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* y, por lo tanto, recibieron el nombre de microcistinas. Hasta ahora se han caracterizado cerca de 65 variaciones estructurales de microcistinas (revisado por Codd, 2000; Wiegand y Pflugmacher, 2005) siendo las cianotoxinas más frecuentemente aisladas en las proliferaciones de cianobacterias en aguas continentales (Huynh-Delermec *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005).

Las nodularinas son toxinas con idéntica acción y estructura muy similar (Sivonen y Jones, 1999). En las nodularinas se han caracterizado seis variaciones estructurales (revisado por Codd, 2000).

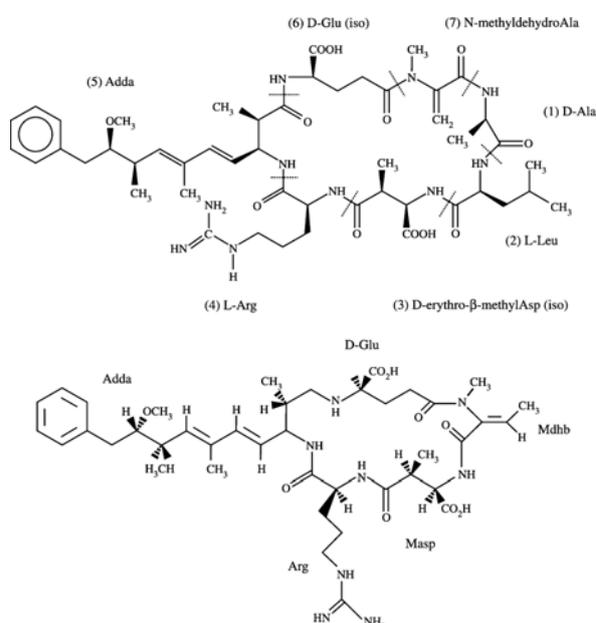


Figura 1. Estructuras de las microcistinas y nodularinas

Las microcistinas se han identificado en las cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, *Anabaenopsis* y *Hapalosiphon* (revisado por Wiegand y Pflugmacher, 2005). Las toxinas nodularinas han sido sólo localizadas en la *Nodularia spumigena* (Sivonen y Jones, 1999).

La toxicidad de las microcistinas y nodularinas se debe a su acción inhibitoria sobre las proteinofosfatasa (revisado por Codd, 2000), lo que tiene grandes consecuencias, ya que estas enzimas intervienen en la regulación genética, así como en el desarrollo de procesos metabólicos y fisiológicos en bacterias, animales y plantas (revisado por Codd, 2000). La mayoría de las variantes estructurales de microcistinas y nodularinas son altamente tóxicas, presentando en el ratón una dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) por vía intraperitoneal, que varía entre 50 – 300 µg/kg de peso vivo (Sivonen y Jones, 1999).

Los péptidos cíclicos son solubles en agua (con la excepción de alguna microcistina hidrofóbica) y, por tanto, incapaces de atravesar directamente las membranas lipídicas de los animales, plantas y bacterias, para lo cual utilizan transportadores. Los transportadores más utilizados son los que se

encuentran en los ácidos biliares y, por ello, el hígado es el órgano diana de estas toxinas (Carmichael *et al.*, 1990; Sivonen y Jones, 1999; Codd, 2000). Aun así, las últimas investigaciones han demostrado que las microcistinas pueden afectar a las membranas celulares de los invertebrados y plantas sin utilizar, necesariamente, transportadores de ácidos biliares (revisado por Codd, 2000).

Las cianobacterias se lisan al llegar al estómago, liberando las toxinas y dañando a las células intestinales que es donde se absorben (Falconer, 1992; Ito *et al.*, 2000), concentrándose, posteriormente, en las células del sistema hepático gracias a los transportadores biliares (Carmichael *et al.*, 1990; Sivonen y Jones, 1999; Codd, 2000; Wiegand y Pflugmacher, 2005). En los hepatocitos actúan inhibiendo las proteínfosfatasas 1 y 2A induciendo, por tanto, la hiperfosforilación de las proteínas celulares y dando lugar a la desestructuración del citoesqueleto del hepatocito, desorganizando los microtúbulos en los filamentos de citoqueratina y los microfilamentos de actina. Por lo tanto, la muerte de los vertebrados se produce como consecuencia del daño hepático, que comienza con una desorganización del citoesqueleto, rotura celular, peroxidación de lípidos, pérdida de la integridad de la membrana, daño en el ADN, necrosis, hemorragia intrahepática y, finalmente, la muerte por shock hemorrágico (Sivonen y Jones, 1999; Codd, 2000; Malbrouck *et al.*, 2003; Gehringer, 2004; Wiegand y Pflugmacher, 2005; revisado por Huynh-Delermec *et al.*, 2005). Así, los síntomas clínicos de la intoxicación aguda son poco específicos, mostrando vómitos y diarreas y, como consecuencia de la hipovolemia, palidez, debilidad, extremidades frías y disnea. En los casos de intoxicación crónica se ha visto que las microcistinas actúan como promotores de tumores. Así, se han hecho asociaciones entre el cáncer de hígado y la exposición crónica a la toxina a través del agua de bebida en algunos pueblos de China (Ueno *et al.*, 1996; Codd, 2000; revisado por Gehringer, 2004).

### **1.2.2 Alcaloides**

Los alcaloides, en general, son sustancias tóxicas formadas por compuestos heterocíclicos nitrogenados, de bajo peso molecular, sintetizados por plantas y bacterias. Su estabilidad es muy variable y, en muchas ocasiones, se producen transformaciones espontáneas que dan lugar a productos con mayor o menor potencia tóxica que la que presentaban inicialmente. Las cianobacterias pueden producir alcaloides neurotóxicos, citotóxicos y dermatotóxicos (Sivonen y Jones, 1999).

### 1.2.2.1 Alcaloides neurotóxicos

Sivonen y Jones (1999) establecen tres familias de alcaloides neurotóxicos: 1) la Anatoxina-*a* y homoanatoxinas-*a*, que actúan mimetizando el efecto de la acetilcolina; 2) la Anatoxina-*a*(S), que actúa como anticolinesterásico y 3) Saxitoxinas que actúan bloqueando los canales del sodio en la placa neuromuscular.

#### 1.2.2.1.1 Anatoxina-*a* y homoanatoxina-*a*

La anatoxina-*a* es un alcaloide de bajo peso molecular producido por los géneros *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* y *Microcystis*. La homoanatoxina-*a* es un homólogo de la anatoxina-*a*, aislado de la cepa *Oscillatoria formosa* (revisado por Wiegand y Pflugmacher, 2005).

Estas neurotoxinas actúan en aves y mamíferos como potentes agonistas de la acetilcolina uniéndose, irreversiblemente, a los receptores nicotínicos bloqueando la placa neuromuscular postsinápticamente, es decir, mimetizan el efecto de la acetilcolina, los canales de sodio permanecen abiertos y se produce una sobrestimulación de las células musculares. Los síntomas clínicos de los animales afectados consisten en temblores musculares, incapacidad motora, opistótonos en aves y, cuando los músculos respiratorios se ven afectados, aparecen convulsiones como consecuencia de la bajada de oxígeno en el cerebro, provocando, finalmente, la muerte por parada respiratoria (Codd, 2000; revisado por Wiegand y Pflugmacher, 2005).

#### 1.2.2.1.2 Anatoxina -a(S)

Producida por las especies *Anabaena floss-aquae* y *Anabaena lemmermannii*, esta toxina tiene propiedades similares a los insecticidas organofosforados, actuando como un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa que es la enzima encargada de la hidrólisis fisiológica del neurotransmisor acetilcolina en las terminaciones colinérgicas, provocando, por tanto, una estimulación masiva de los receptores muscarínicos y nicotínicos y actuando sobre el sistema nervioso central. Por tanto, los signos clínicos visibles son ptialismo, diarrea, debilidad muscular, parálisis flácida, convulsiones, disnea y, finalmente, la muerte del animal por parada respiratoria (Ecobichon, 1996; Codd, 2000;

Wiegand y Pflugmacher, 2005).

### 1.2.2.1.3 Saxitoxinas o PSPs

Las saxitoxinas o PSPs son alcaloides neurotóxicos muy conocidos en el sector productivo marisquero al ser toxinas producidas por los dinoflagelados en las mareas rojas y acumuladas en los bivalvos, provocando el envenenamiento del marisco o síndrome “paralytic shellfish poisoning” (PSP). La misma familia de neurotoxinas puede ser producida por un amplio rango de cianobacterias filamentosas que incluyen a las especies *Aphanizomenon floss-aquae*, *Lyngbya wollei*, y *Cylindrospermopsis raciborski*. También se han detectado en cultivos de la bacteria *Moraxella* sp. y en el 40-60% de las bacterias aisladas de los cultivos de dinoflagelados (Humpage *et al.*, 1994; revisado por Beltran y Neilan, 2000). Se han descrito, al menos, 20 variantes de la saxitoxina (Codd, 2000).

En general, las PSPs son un grupo de alcaloides carbamatos neurotóxicos que pueden dividirse en tres grupos, de acuerdo con su estructura: sulfatadas sencillas (gonyautoxinas, GTX), doblemente sulfatadas (C-toxinas) y las no sulfatadas (saxitoxinas, STX) que son las que aportan su nombre genérico (Sivonen y Jones, 1999). Todas actúan de la misma forma: su absorción es muy rápida a través de la mucosa digestiva y provocan un bloqueo selectivo de los canales de sodio de las membranas celulares en las células nerviosas y musculares. Al bloquear la abertura del canal, la entrada de sodio se interrumpe, provocando la parálisis de los músculos y la muerte de los mamíferos por parada respiratoria. La actuación de la toxina es muy rápida; los síntomas comienzan con un ligero adormecimiento, mareos, hasta una parálisis total e, incluso, la muerte. Sin embargo, esta toxina es eliminada muy rápidamente y, si se puede mantener con vida a los afectados durante 24 horas, el pronóstico es muy bueno. Los invertebrados, especialmente los mejillones, son mucho menos sensibles a las PSPs (Beltran y Neilan, 2000; revisado por Wiegand y Pflugmacher, 2005).

La toxicidad de las PSPs varía, siendo las saxitoxinas no sulfatadas (STX) las más tóxicas, con una DL<sub>50</sub> en el ratón por vía intraperitoneal de 5 µg/kg de peso vivo. Las neosaxitoxinas (neoSTX) y sus derivados presentan también una toxicidad alta; las sulfatadas sencillas, gonyautoxinas (GTXs), son menos tóxicas y las doblemente sulfatadas, las toxinas-C, son medianamente tóxicas (Beltran y Neilan, 2000).

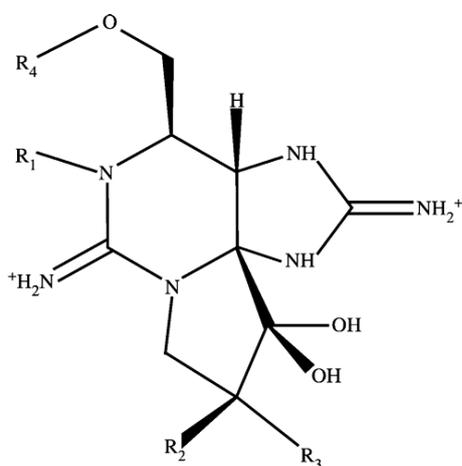


Figura 2. Estructura general de las saxitoxinas (Wiegand y Pflugmacher 2005)

#### 1.2.2.2 Alcaloides citotóxicos

La cylindrospermopsina es una cianotoxina, en concreto un alcaloide cíclico de guanidina, que es producida por las especies de cianobacterias *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani *et al.*, 1992), *Umezakia natans* (Harada *et al.*, 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker *et al.*, 1997), *Rhaphidiopsis curvata* (Li *et al.*, 2001), y *Anabaena bergii* (Schembri *et al.*, 2001). Esta toxina se ha encontrado en las aguas dulces tropicales y subtropicales de Australia (Sivonen y Jones, 1999).

La cylindrospermopsina es una hepatotoxina que produce daño hepático sin inhibir a las proteinfosfatasas, lo que produce una importante e irreversible inhibición de la síntesis de proteínas teniendo un mayor impacto en las células del hígado donde provoca vacuolización, proliferación en la membrana hepática y citotoxicidad. Además, se ha visto que el extracto puro administrado oralmente o inyectado provoca también lesiones en los riñones por necrosis epitelial en el túbulo proximal, afectando también al bazo, timo y corazón. Actualmente, se sospecha que está relacionada con lesiones mutagénicas y actividad carcinogénica (Sivonen y Jones, 1999; revisado por Wiegand y Pflugmacher, 2005)

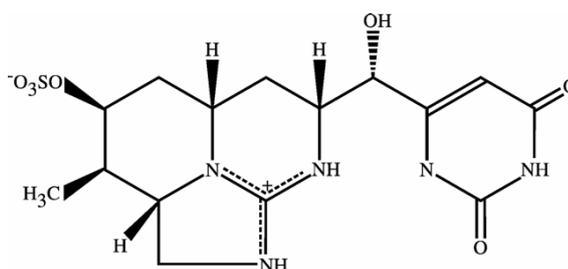


Figura 3. Estructura de la cilindrospermopsina (Wiegand y Pflugmacher, 2005)

### 1.2.2.3 Alcaloides dermatotóxicos, aplysiatoxinas y lyngbyatoxinas

Las cianobacterias bénticas *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Schizothrix* pueden producir toxinas dermatotóxicas: las lyngbyatoxinas y aplysiatoxinas (Ito y Nagai, 1998; Stielow y Ballantine, 2003). Estas toxinas causan severas dermatitis de contacto entre los deportistas nadadores (Ito y Nagai, 1998).

Las lyngbyatoxinas también son promotores de tumores y activadores de la proteinquinasa C (Ito y Nagai, 1998; Sivonen y Jones, 1999) y, tras su ingestión, provocan severas inflamaciones orales y gastrointestinales que dan lugar a una sintomatología de diarreas y fiebre (Ito y Nagai, 1998; Sivonen y Jones, 1999; Stielow y Ballantine, 2003).

### 1.2.3 Lipopolisacáridos (LPS)

Los lipopolisacáridos (LPS) se encuentran generalmente en el exterior de las membranas celulares de las bacterias Gram negativas, como las cianobacterias, donde forman complejos con las proteínas y los fosfolípidos. La diferencia está en que los LPS de las cianobacterias tienen una gran variedad de cadenas largas de ácidos grasos insaturados y ácidos grasos hidroxilados y carecen de fosfato (Sivonen y Jones, 1999; Wiegand y Pflugmacher, 2005). Al estar situados en la pared celular pueden provocar irritaciones y respuestas alérgicas en los tejidos animales que entran en contacto con estos compuestos. Los LPS de las cianobacterias son mucho menos potentes que los de otras bacterias Gram negativas patógenas como la salmonella (Sivonen y Jones, 1999).

La estructura de los lipopolisacáridos consiste en un azúcar, normalmente una hexosa, y un lípido,

normalmente un ácido graso. En concreto, el ácido graso de la molécula de LPS suele ser el responsable de la irritación de piel y de la respuesta alérgica en mamíferos. Las variaciones estructurales de los LPS son generalmente conservadas filogenéticamente (Sivonen y Jones, 1999; Wiegand y Pflugmacher, 2005).

La estabilidad de las LPS en la superficie del agua es desconocida (Sivonen y Jones, 1999).

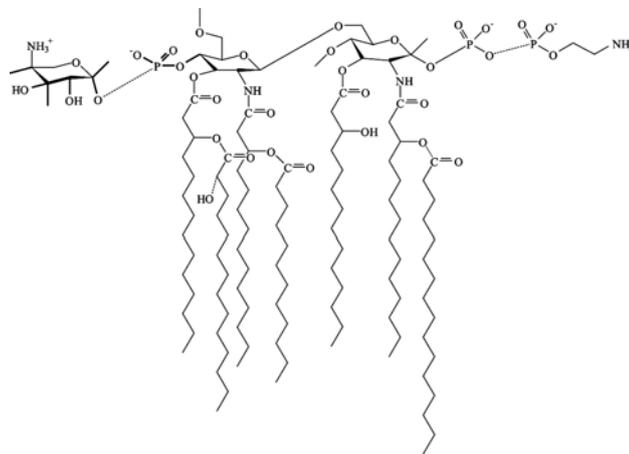


Figura 4. Estructura del componente tóxico de los lipopolisacáridos (Wiegand y Pflugmacher, 2005)

### 1.3 ECOESTRATEGIA DE LAS CIANOBACTERIAS

La distribución de las cianobacterias abarca desde latitudes polares hasta las ecuatoriales (Briand *et al.*, 2003), siendo capaces de prosperar en ambientes extremos (Mur *et al.*, 1999; Codd *et al.*, 2005). Sorprendentemente, el rango de crecimiento de las cianobacterias es normalmente mucho más bajo que el de muchas especies de algas con las que compite por el ecotopo (Mur *et al.*, 1999). No obstante, esta desventaja inicial la compensan, tanto con una alta persistencia de las poblaciones una vez establecidas, como con un balance energético favorable, ya que requieren muy poca energía para mantener la función celular. Además, las cianobacterias que poseen vesículas de gas son capaces de ajustar su flotabilidad de forma cíclica, mediante la sustitución de constituyentes celulares más pesados, como las sustancias de reserva, por las mencionadas vesículas, cuyo gas tiene una densidad de, aproximadamente, la décima parte de la del agua. Cuando están profundas en la columna de agua, consumen las partículas almacenadas que actuaban como lastre y las vesículas de gas se vuelven a formar y el ciclo de flotabilidad se cierra (Paerl, 1983; Porat *et al.*, 1999). Las

cianobacterias que presentan vesículas de gas usan estímulos medioambientales diferentes, como son la luz, la gravedad, la composición química del medio y la temperatura, disponiendo así de un mecanismo ecológico importante que les permite ajustar su posición en la columna de agua y, por tanto, colocándose en el nicho más favorable para su supervivencia y crecimiento, siendo este un importante factor de su dominancia en lagos estratificados (Cohen-Bazire *et al.*, 1969; Mur *et al.*, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Bonnet y Poulin, 2004; Jacquet *et al.*, 2005).

Por otro lado, a pesar de tener una tasa de crecimiento baja, son capaces de captar eficientemente la luz en una amplia banda de longitud de onda y, en condiciones de baja intensidad lumínica, su crecimiento se ve favorecido obteniendo, así, una ventaja competitiva en los lagos que presentan turbidez o cuando hay densas poblaciones de algas. Este fenómeno explica por qué las cianobacterias, que pueden mantenerse en ambientes oligotróficos, llegan a proliferar, por el contrario, en aguas muy ricas en nutrientes, con grandes cantidades de fitoplancton que provocan una disminución de la luz en niveles inferiores de las masas de agua (Mur *et al.*, 1999; Bonnet y Poulin, 2004).

Se ha constatado, por tanto, que la capacidad de las colonias de cianobacterias para regular su flotabilidad les permite mantenerse en las zonas con luz óptimas para su crecimiento pero, para ello, es necesario que el cuerpo de agua no presente una turbulencia excesiva. Durante la noche, las colonias de cianobacterias con vesículas de gas empiezan a flotar y alguna de estas poblaciones pueden acumularse en la superficie. La persistencia de las proliferaciones en superficie parece ser una estrategia ecológica desarrollada para optimizar la producción fotosintética (Paerl, 1983). Que las cianobacterias se mantengan en las capas superiores depende, no sólo de la flotabilidad, sino de la ausencia de viento, que reduciría la circulación vertical de las aguas de superficie y también de la lentitud de la corriente (Maier *et al.*, 1998; Graham y Wilcox, 2000). Cuando esta es poco intensa aumenta el tiempo de retención de las masas de agua fluviales, lo que da a las poblaciones de cianobacterias la posibilidad de crecer. Además, las corrientes lentas implican una disminución de las turbulencias y se incrementa la estabilidad de la columna de agua, facilitando a las cianobacterias mantener su posición óptima gracias a las vesículas de gas. Por otro lado, las turbulencias que generan las corrientes más fuertes antes de los momentos de calma favorecen también la aparición de cianobacterias, al transportar nutrientes a la columna de agua y resuspender esporas desde el sedimento (Maier *et al.*, 1998).

Sin embargo, cuando se producen proliferaciones puede ocurrir que, al formarse una capa muy gruesa de cianobacterias, no reciban luz con la intensidad necesaria, siendo entonces incapaces de obtener suficiente energía para producir los azúcares que actuarían como lastre, produciéndose grandes acúmulos de cianobacterias con las vesículas intactas que dan lugar a la aparición de espuma (Graham y Wilcox, 2000). Esta espuma es fácilmente transportable por el viento hasta las orillas de sotavento donde queda al alcance de los animales, aumentando las posibilidades de ingestión de cianotoxinas si se trata de cianobacterias productoras de toxinas y, por tanto, de provocar episodios de intoxicación (Falconer *et al.*, 1999). Además, la formación de espuma provoca un rápido deterioro de la calidad del agua ya que produce olor y da sabor al agua (Bartram *et al.*, 1999). Los géneros tóxicos más significativos capaces de formar espuma en agua dulce son *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Microcystis*, presentando todos ellos vesículas de gas (Paerl, 1983).

Muchas de las cianobacterias de agua dulce son halotolerantes (Margalef 1883; Mur *et al.*, 1999). En los estuarios se producen variaciones de salinidad en función de las cantidades de agua dulce que son tributadas. Así, los máximos valores de salinidad se producen en verano, que es cuando disminuye la cantidad de agua dulce aportada por el río al estuario, y por lo tanto en esta estación penetra el agua del mar río arriba ofreciendo a las cianobacterias una ventaja frente a otros competidores por el ecotopo (Domingues *et al.*, 2005).

La presencia de cianobacterias mantiene una correlación positiva con la temperatura del agua, siendo dominantes a 24°C en todas las proporciones de Nitrógeno: Fósforo (N: P) inferiores a 20µM/L. También se ha establecido que, en general, estos organismos consiguen una mayor tasa de crecimiento con temperaturas más altas que las diatomeas y clorofíceas, lo que explica por qué en muchas masas de agua templadas y boreales la proliferación de cianobacterias se produce durante el verano (Domingues *et al.*, 2005). Esto está cambiando mucho debido al calentamiento global (Lovelock, 2006).

Debido a que los factores físico-químicos en distintos tipos de cursos de agua, como la luz, temperatura, composición o nutrientes disueltos, cambian a lo largo del año, diferentes especies planctónicas se suceden en la dominancia de la comunidad durante distintos periodos intraanuales, cuando determinadas condiciones favorecen su crecimiento y reproducción. La secuencia de reemplazo de las especies dominantes de una comunidad planctónica a través del tiempo se conoce

con el nombre de “sucesión”. La sucesión es un fenómeno ecológico que se produce en todas las comunidades acuáticas y terrestres. La diversidad de especies de las sucesiones planctónicas es baja por estar en comunidades inestables pero, dentro de las mismas, es más alta en ecosistemas de agua dulce oligotróficos que en los eutróficos (Margalef, 1982).

Se ha observado que la sucesión de algas en los estuarios de las zonas climáticas templadas se inicia, en general, con una proliferación de diatomeas en primavera, seguido de un incremento en la abundancia de algas verdes (clorofíceas) para dar lugar a una proliferación de cianobacterias en verano (Rocha *et al.*, 2002; Domingues *et al.*, 2005) que, en ocasiones, viene precedida de una proliferación de dinoflagelados (Margalef, 1969). La explicación a este tipo de sucesiones se basa en los nutrientes que van quedando disponibles. Así, la proliferación de diatomeas en primavera está directamente relacionada con la abundancia de sílice en el agua (Roelke *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2005), debiéndose, en principio, a los aumentos de corriente y del arrastre de materiales en los ríos, característicos de esta época del año. Cuando el sílice disminuye pero se mantiene alta la proporción de N: P (por encima de 20  $\mu\text{M/L}$ ) las clorofíceas se ven favorecidas (Domíngues *et al.*, 2005). En la sucesión, las clorofíceas dominan a las cianobacterias cuando compiten por el fósforo (Sommer, 1989) pero, durante el verano, la proporción de N: P disminuye (Domíngues *et al.*, 2005). Según Sommer (1989), la transición de la dominancia de las clorofíceas hacia las cianobacterias se encuentra alrededor de un cociente de N: P de 15  $\mu\text{M/L}$ , lo que explica la sustitución de las clorofíceas por cianobacterias, que son las fijadoras de nitrógeno cuando hay un exceso de P sobre N (Domíngues *et al.*, 2005).

Los fenómenos de sucesión planctónica se producen, tanto por los cambios en el medio físico como por los determinados desde el interior de la propia comunidad planctónica. Hay que entender que la sucesión planctónica está relacionada también con los movimientos de temperatura en la columna de agua (Walsby *et al.*, 1998; Jacquet *et al.*, 2005). Como ejemplo de ello, en la figura 5 se expone el comportamiento de un sistema de agua embalsada en latitudes templadas pero con temperaturas inferiores a 4 °C en invierno.

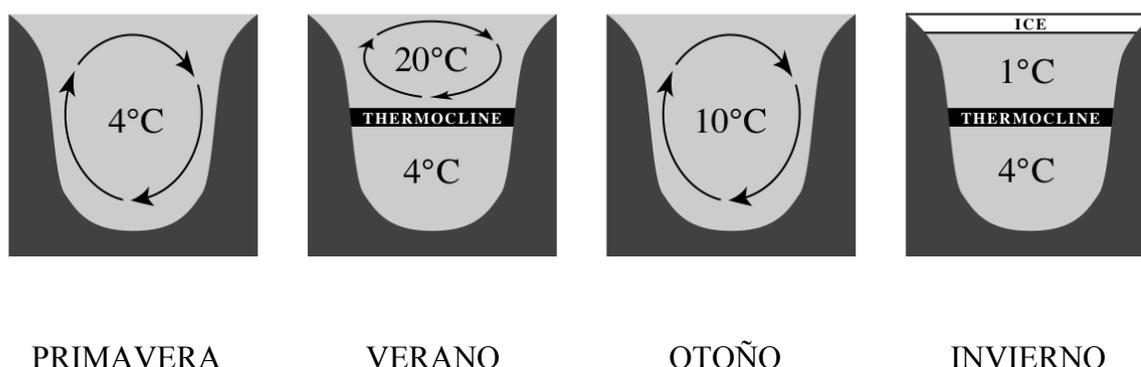


Figura 5. Comportamiento del agua embalsada a latitudes templadas durante un ciclo anual

En primavera, el aumento de temperaturas provoca un calentamiento de la superficie, que se mezcla con las turbulencias de aire y entradas de agua dejándola a unos 4 °C ,de forma uniforme, en toda la columna. Conforme avanza la estación, van aumentando las temperaturas y disminuyendo las turbulencias y la superficie de la columna de agua se calienta progresivamente, quedando en los niveles inferiores el agua más fría y, por tanto, más densa de forma que, en el verano, llegan a distinguirse tres zonas: la superficial y caliente (epilimnion), la profunda y fría (hipolimnion) y la zona de transición o termoclina (metalimnion). Al llegar el otoño, las aguas superficiales se enfrían y se mezclan con capas más profundas por su mayor densidad, permitiendo una temperatura uniforme de unos 10 °C. Durante el invierno se forma una capa de hielo en superficie y el agua se estratifica nuevamente pero en sentido inverso (termoclina inversa) ya que la capa en contacto con el hielo se mantiene a 1 °C, sucediéndola la termoclina y, a mayor profundidad, quedaría la columna a 4 °C (Rodríguez, 2004).

En primavera y otoño puede observarse que la columna de agua se mezcla en sentido vertical, lo que permite la existencia de elevadas concentraciones de nutrientes, al ser estos arrastrados por la circulación vertical del agua. Por el contrario, en verano e invierno la presencia de la termoclina provoca la ruptura de esa circulación vertical e impide la difusión de los nutrientes, que permanecen sedimentados en las capas inferiores.

En primavera, las diatomeas, que carecen de un mecanismo locomotor, adquieren ventaja competitiva debido a que las turbulencias les permiten mantenerse en los niveles iluminados y

almacenan, entonces, los nutrientes reduciendo su disponibilidad en el medio. Cuando disminuye la proporción de sílice, aparecen las clorofíceas pero, durante el verano, como consecuencia de la estratificación del agua, los nutrientes no circulan por toda la columna y acaban agotándose, provocando el colapso de las clorofíceas. Aquí es donde las cianobacterias, que son especies con una mayor afinidad por los ambientes oligotróficos y con capacidad para controlar su posición en la columna de agua, comienzan su crecimiento. Cuando llega el otoño, la fotosíntesis de las cianobacterias empieza a ser más rápida que la respiración y los carbohidratos “lastre” no son consumidos. Las colonias, por lo tanto, se hunden en el fondo donde sobreviven al invierno consumiendo, gradualmente, los carbohidratos almacenados por la respiración (Mur *et al.*, 1999). Las cianobacterias que ascienden desde el fondo durante la primavera son unicelulares, o bien colonias de número muy reducido que incrementaran su población durante el inicio del verano (Mur *et al.*, 1999).

Los cambios en la flotabilidad de las cianobacterias explican los fenómenos de estratificación vertical, las migraciones diarias verticales y la formación de proliferaciones en la superficie (Porat *et al.*, 1999). Reynolds *et al.* (2002) lo describe como una estrategia de la “R”. Las especies que siguen la estrategia de supervivencia de la “R” suelen ser microscópicas o de pequeño tamaño. Sus poblaciones mantienen un crecimiento exponencial hasta colapsar y desaparecer bruscamente cuando las condiciones ambientales se modifican. Siguen, por tanto, una dinámica de colonización de los ecosistemas en sus primeros estadios de desarrollo y, para ello, suelen ser organismos capaces de producir muchas unidades de dispersión (Margalef, 1982).

Otro efecto relacionado con la estratificación de la columna de agua es que durante el verano, en ausencia de viento o con baja turbulencia, se acelera el proceso de sedimentación de algas y el agotamiento de los nutrientes favoreciendo la acumulación en superficie de las cianobacterias. En algunos sistemas, los tiempos prolongados de residencia determinan la anoxia (ausencia de oxígeno) en los niveles más profundos y, con ello, la liberación de compuestos químicos reducidos desde el sedimento, aportando un incremento de la carga interna de nutrientes al sistema y favoreciendo todavía más las proliferaciones de cianobacterias. Sin embargo, en los sistemas fluviales o en los embalses con tasas de renovación altas y tiempos de residencia inferiores a 10 días, no se dan las condiciones adecuadas para la proliferación de cianobacterias.

De acuerdo con los procesos que integran el flujo de energía en la comunidad planctónica, las etapas iniciales de la sucesión se caracterizan por un incremento más o menos acusado de la producción y acumulación de biomasa, de forma que una parte importante de la producción neta se pierde por deposición en los sedimentos del lecho, lo que constituye un rasgo característico de los sistemas poco maduros.

Se han descrito las ventajas que tienen las cianobacterias en ciertas condiciones pero, además de estos factores, se pueden producir otros fenómenos que favorecen las proliferaciones de cianobacterias, como es el caso de la eutrofización de las aguas, tratándose de un aspecto de importancia global.

Teóricamente, aunque un sistema sea eutrófico no debería tener problemas para mineralizar la materia orgánica sintetizada, puesto que dispone del oxígeno necesario para este proceso. Sin embargo, la estratificación térmica disminuye la solubilidad del oxígeno, que entonces no podrá contribuir a la mineralización de la cuota que le correspondía y, en consecuencia, la materia orgánica se sedimenta. Durante el periodo en que se produce una circulación vertical en la columna de agua y una temperatura uniforme (ausencia de termoclina) la difusión turbulenta garantiza la oxigenación pero, conforme avanza la estratificación térmica, la difusión turbulenta queda restringida a la capa superior o epilimnion, llegando un momento en el que la termoclina actúa como barrera al transporte de oxígeno. El hipolimnion, en consecuencia, debe enfrentarse al capital de oxígeno acumulado. Por eso, con igualdad en otros factores, un lago somero con un hipolimnion de pequeño volumen y, por tanto, con poca cantidad de oxígeno disuelto, acusa más los efectos negativos de la eutrofización.

La manifestación más importante de este proceso es el rápido desarrollo de los productores primarios en la zona eufótica y concentraciones de oxígeno muy bajas en las capas profundas (hipolimnion). En lagos hipereutróficos, el fitoplancton dominante suele estar constituido por cianobacterias que, cuando forman proliferaciones en la superficie, reducen drásticamente la penetración de la luz en la columna de agua, evitando la competencia de otros organismos (Bonnet y Poulin, 2002). Bonnet y Poulin (2004) comprobaron que en las proliferaciones de *Microcystis aeruginosa* se produce una sobresaturación de oxígeno disuelto en las capas superficiales, que contrasta con la parte anóxica de la columna de agua, que puede alcanzar 15 m de grosor sobre un

total de 20 m de profundidad en el periodo estival.

Los nutrientes que más influyen en el proceso de eutrofización son los fosfatos y los nitratos. De hecho, para conocer el nivel de eutrofización se suele medir el contenido de clorofila en la columna de agua, combinándolo con otros parámetros, como el contenido de fósforo, de nitrógeno y la capacidad de penetración de la luz.

Se puede decir que existe una eutrofización de origen antrópico, originada por los vertidos urbanos, ganaderos y agrícolas, que aportan fertilizantes, desechos orgánicos y otros residuos ricos en fosfatos y nitratos. Pero también hay una eutrofización natural que se va produciendo lentamente en todos los lagos del mundo según van recibiendo nutrientes. En algunos ecosistemas acuáticos con una importante carga de aves no debe despreciarse el aporte de nutrientes que transfieren a través de las heces. Se sabe que las deyecciones de las aves tienen una proporción baja de nitrógeno/fósforo, lo cual favorece la aparición de cianobacterias (Mitchell y Wass, 1995).

En los lagos de latitudes templadas, las bajas proporciones de N: P o bien las altas concentraciones de fósforo (hay que considerar que si la concentración de fósforo es muy elevada proporcionalmente habrá muy poco nitrógeno y la proporción de N: P será muy baja) favorecen la dominancia de las cianobacterias (Havens *et al.*, 2003).

Las proliferaciones de cianobacterias que se producen en los lagos de latitudes templadas, profundos y eutróficos, son producidas por fijadoras de nitrógeno, ya que esta capacidad les otorga ventaja. Sin embargo, los lagos eutróficos poco profundos son típicamente dominados por cianobacterias no fijadoras de dinitrógeno (N<sub>2</sub>), en particular las integrantes de la familia *Oscillatoriaceae*, y esto se debe a que obtienen ventaja al ser capaces de seguir creciendo, incluso, cuando la biomasa y la atenuación de luz empiezan a ser muy altas (Havens *et al.*, 2003)

La composición de una comunidad planctónica y su variación a lo largo de las estaciones o sucesión está directamente relacionada con los valores netos de crecimiento de cada especie, es decir, por el cociente valor de crecimiento/valor de pérdida. El valor de pérdida de las poblaciones está directamente relacionada con pérdidas específicas como el pastoreo, lisis vírica y autólisis que en muchos ecosistemas podrían explicar la sucesión del fitoplancton y deberían estudiarse (Domingues

*et al.*, 2005). Mientras muchas algas planctónicas son pastadas por copépodos, daphnias y protozoos, las cianobacterias no son pastadas de forma tan intensa y el impacto del pastoreo por algunos ciliados y protozoos rizópodos es muy poco importante normalmente (Engström-Öst, 2002; Abrantes *et al.*, 2006). Las cianobacterias son atacadas por virus, bacterias y actinomicetes pero la incidencia de estos enemigos naturales en la disminución de sus poblaciones no se conoce muy bien, aunque tampoco parece muy importante (Mur *et al.*, 1999; Engström-Öst, 2002). Se puede decir, por tanto, que las cianobacterias tienen pocas pérdidas de población debidas a enemigos naturales y esto también contribuye a la dominancia de estos organismos durante el periodo de verano.

Las proliferaciones de cianobacterias pueden ser monoespecíficas o estar integradas por diversas especies, incluidas las inocuas. Hay que tener en cuenta que, incluso, en las proliferaciones monoespecíficas pueden detectarse cepas tóxicas y no tóxicas. La toxicidad, por tanto, puede ser muy variable, ocurriendo, incluso, que en una proliferación de cepas mayoritariamente no tóxicas se alcance un alto nivel de toxicidad (Bolch *et al.*, 1997; Vezie *et al.*, 1998; Carrillo *et al.*, 2003). Las cepas tóxicas y no tóxicas únicamente se diferencian genéticamente, ya que no presentan variaciones morfológicas (Carrillo *et al.*, 2003; Zurawell *et al.*, 2005). Carrillo *et al.* (2003) demostraron la gran variabilidad genética existente en las distintas cepas de *Microcystis aeruginosa* procedentes de aguas del Parque Nacional de Doñana comparadas con cepas procedentes de otras reservas de agua de la misma provincia. Además, demostraron que la variabilidad en la producción de toxina dentro de distintas cepas era muy alta y probablemente la causante de la heterogeneidad espacial y temporal observada en la producción de toxinas.

En los últimos años se está trabajando en la capacidad de adaptación de las cianobacterias y microalgas a los contaminantes antropogénicos, a los ambientes extremos y a los cambios bruscos en el medio (Costas *et al.*, 2001; López-Rodas *et al.*, 2001; Baos *et al.*, 2002; García-Villada *et al.*, 2002; García-Villada *et al.*, 2004; Altamirano *et al.*, 2004; Flores-Moya *et al.*, 2005). De forma simple se puede indicar que las cianobacterias y microalgas son capaces de sobrevivir en los ambientes estresados como resultado de dos procesos distintos: la adaptación fisiológica como resultado de la modificación de la expresión de los genes (adaptaciones) (Bradshaw & Hardwick, 1989; Belfiore & Anderson, 2001) y las mutaciones genéticas, que les confieren alguna ventaja adaptativa (Belfiore & Anderson, 2001). En este sentido Flores-Moya *et al.* (2005) han visto que la

supervivencia de las algas en ambientes extremos se pueden producir como consecuencia de raras mutaciones producidas antes de entrar en contacto con el agente selectivo.

López-Rodas *et al.* (2006) plantean de forma clara las dudas que actualmente surgen al estudiar como se produce la adaptación de las cianobacterias a los cambios del medio, exponiendo de forma sencilla los distintos puntos de vista científicos planteados en los trabajos sobre evolución de poblaciones bacterianas. Existe un planteamiento teórico neo-Darwinista que indica que la adaptación ocurre por selección de las variaciones genéticas preexistentes (teoría claramente aceptada en organismos pluricelulares). En este sentido, Flores-Moya *et al.* (2005) presentan un modelo de adaptación de las algas a los ambientes extremos naturales. Su resultado sugiere que las mutaciones preselectivas son suficientemente frecuentes en poblaciones de algas para permitir adaptarse a los ambientes extremos que existen de forma natural en el medio ambiente. Sin embargo, las mutaciones genéticas usualmente implican un coste que puede afectar a la supervivencia de las poblaciones adaptadas, por lo que también es muy interesante analizar la variabilidad genética de las especies de algas. En una serie de estudios preliminares que analizan la variabilidad genética para caracteres cuantitativos en poblaciones de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, se ha encontrado variabilidad genética para el tamaño y la forma de las colonias (Rico *et al.*, 2006).

#### 1.4 MORTANDADES PROVOCADAS POR CIANOTOXINAS

Las proliferaciones de cianobacterias pueden tener un gran impacto en el funcionamiento de los ecosistemas, provocando alteraciones en las relaciones tróficas entre los distintos organismos, en la biodiversidad, en la concentración de oxígeno, etc. Pero en los últimos años estas proliferaciones han centrado la atención de numerosas investigaciones debido a la descripción de envenenamientos por cianotoxinas en animales y humanos (Briand *et al.*, 2003). La primera descripción de un caso de muerte por cianotoxinas se describió en 1878 en Australia (Francis, 1878) pero, gracias al avance en los métodos analíticos, actualmente se ha podido comprobar la alta frecuencia de episodios tóxicos, incluso, sin alcanzar niveles letales.

En las proliferaciones de algas tóxicas en aguas continentales, son las toxinas hepáticas, en concreto las microcistinas, las que se producen con mayor frecuencia, habiéndose descrito eventos tóxicos en

todos los continentes y lugares donde se han muestreado. El primer caso mortal en humanos relacionado con cianobacterias productoras de microcistinas se produjo en un centro de diálisis en Caruru, Brasil, en 1996, donde 76 pacientes de diálisis murieron por la contaminación del agua utilizada en el proceso con estas toxinas (Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001). Además, estudios epidemiológicos indican que las microcistinas son un factor de riesgo en la aparición de cáncer primario de hígado (Yu, 1995; Ueno *et al.*, 1996). En los últimos veinte años, se ha investigado sobre los impactos de las microcistinas en la salud y el comportamiento de los animales, llevando a la Organización Mundial de la Salud, en 1998, a establecer un valor provisional de concentración máximo de 1 µg/L de microcistina LR en el agua para consumo directo, con el fin de evitar los efectos secundarios de las microcistinas (Briand *et al.*, 2003).

Las cianobacterias de aguas continentales productoras de neurotoxinas son menos habituales, aunque se consideran también frecuentes en algunos países, habiéndose descrito en América del Norte, Europa y Australia (Huynh-Deleme *et al.*, 2005; Pérez y Aga, 2005).

Las intoxicaciones en animales domésticos tras la ingesta de agua contaminada por cianotoxinas está muy bien documentada (McBarron *et al.*, 1975; Short y Edwards, 1990; Chorus y Bartram, 1999). Sin embargo, en los últimos años se está registrando un aumento de citas de intoxicaciones en fauna salvaje relacionadas con proliferaciones de cianobacterias, (Matsunaga *et al.*, 1999; Alonso-Andicoberry *et al.*, 2002; Krienitz *et al.*, 2003; Mwaura *et al.*, 2004; Arthur *et al.*, 2006).

El problema de la presencia de cianotoxinas en los reservorios de agua estriba en que posibilita la ingestión de agua tóxica tanto a poblaciones humanas, como a la fauna doméstica y salvaje que dependen de estas masas de agua. Cuando las cianotoxinas aparecen en zonas de alto valor ecológico, como es el caso de los espacios naturales protegidos, pueden generar sucesos graves de intoxicación en los que se ven afectadas especies amenazadas por su escasa población, lo que aumenta las consecuencias negativas de tales episodios y exponen a dichas especies a mortandades muy difíciles de controlar que agravan aún más su precario estado de conservación.

## **1.5 EL MEDIO NATURAL DEL ENTORNO DE DOÑANA**

El río Guadalquivir (560 km de largo) se localiza al sur de la Península Ibérica y discurre por cuatro

Comunidades Autónomas, siendo el tramo andaluz el más importante con más del 90% de la superficie total de la cuenca. En total drena una cuenca de unos 57,000 km<sup>2</sup>, compuesta por rocas sedimentarias del Terciario. El río se encuentra parcialmente bloqueado por barreras de arena formando un estuario enorme que se ha ido creando por la acumulación de los materiales arrastrados y que abarca unos 1,800 km<sup>2</sup>. Son las olas asociadas a la circulación atlántica, las que favorecen el desarrollo de grandes extensiones de terreno llano y bajo, donde la marisma salina y la marisma de agua dulce se extienden varios kilómetros tierra adentro (Ruiz *et al.*, 2005). Es en el banco derecho de este estuario donde se encuentra el territorio de Doñana (provincias de Huelva y Sevilla, Comunidad Autónoma de Andalucía, España), y se extiende a lo largo de la costa del Golfo de Cádiz (37°N, 6°W). Actualmente esta zona comprende unas 106.000 ha de terreno protegido que abarcan al Parque Natural, a la Reserva Biológica y al Parque Nacional (Grimalt *et al.*, 1999; Reina *et al.*, 2006; Tovar-Sánchez, *et al.*, 2006; C. H. G., 2006)

### **1.5.1 Aspectos climáticos e hidrogeológicos**

El clima del entorno de Doñana es Mediterráneo subhúmedo con fuerte influencia Atlántica, lo que produce una suavización de las temperaturas. (ITGE, 1992; Grimalt *et al.*, 1999; Carpintero *et al.*, 2004; Palomares *et al.*, 2005; IGME, 2006; Reina *et al.*, 2006).

La temperatura media anual es de 17 °C, siendo enero el mes más frío del año, con una temperatura media de 9,9 °C. El verano es seco y caluroso siendo la media de temperaturas en el mes de julio de 24,7 °C y de 24,4 °C en agosto (ITGE, 1992; Muñoz-Reinoso, 2001; IGME, 2006)

La época de lluvias tiene lugar entre los meses de octubre a marzo, periodo en el que se producen el 80% del total de las precipitaciones anuales, cuyos valores alcanzan los 550 - 600 mm al año, con importantes variaciones interanuales (219,5 mm en 1953 y 1.040 mm en 1963). Las precipitaciones, como corresponde a un clima mediterráneo, son casi nulas en los meses de julio y agosto lo que condiciona las aportaciones fluviales. Por otro lado, la evapotranspiración potencial estimada por el método de Thornthwaite es muy alta, con una media anual de 900 mm. El balance hídrico es claramente deficitario por lo que, en verano, las zonas que se mantienen húmedas, lo hacen gracias a los aportes del acuífero de Almonte-Marismas (ITGE, 1992; Grimalt *et al.*, 1999; Muñoz-Reinoso, 2001).

La insolación en la zona es elevada, con una media anual de 3.000 horas (ITGE, 1992), siendo los vientos dominantes de orientación sureste y oeste (ITGE, 1992).

Las Marismas ocupan todo el sector sudoriental del acuífero de Almonte-Marismas. Este acuífero, con una superficie de 2.400 km<sup>2</sup>, está formado por sedimentos continentales y marinos de relleno del estuario del Guadalquivir (arcillas y limos con intercalaciones arenosas, de gravas y de bioclastos), que se apoyan sobre las arenas basales del Pliocuatnario en el borde norte, sobre las arenas de la barra costera en el borde sur y occidental y sobre los materiales del olitostroma triásico en el este (margen izquierda del Guadalquivir). Localmente, también podrían estar apoyados directamente sobre los limos del Plioceno y las margas del Mioceno. El 75% de la superficie del acuífero corresponde a un acuífero libre (arenas) y el resto está confinado debajo de los sedimentos arcillosos de la marisma.

La zona de descarga del agua subterránea se produce en la zona de contacto entre el área de dunas (móviles o fósiles) y la marisma salina, en las charcas y ríos y también en el mar. Las diferencias en el comportamiento de los niveles de la tabla de agua en las charcas de Doñana se deben a su conexión a diferentes sistemas de surgencias de aguas subterráneas. Las dunas móviles son un lugar muy importante de recarga del acuífero y las aguas que fluyen debajo constituyen el acuífero dunar, que se extiende unos 100 km<sup>2</sup>, e incluye las dunas móviles y zonas adyacentes. El acuífero dunar está considerado como un subsistema incluido en el acuífero Almonte-Marismas pero posee unas características geológicas e hidrológicas que hacen de él una barrera de agua dulce que previene la intrusión de agua marina. Una sobreexplotación de este acuífero conllevaría el avance hacia el oeste de aguas con una elevada concentración salina (Muñoz-Reinoso, 2001; Plata y Rubio, 2003; Muñoz-Reinoso y Castro, 2005).

La recarga del acuífero se produce por infiltración de las precipitaciones y por las contribuciones superficiales que llegan del norte (arroyos de la Rocina y el Partido), este (río Guadiamar) y sur (Océano Atlántico) en el acuífero libre. El río Guadalquivir, por el contrario, es un sistema independiente del acuífero, ya que está separado de las formaciones permeables por el nivel semipermeable de las marismas. La cuenca del Guadiamar, usualmente, contribuye con la mitad de todo el aporte de agua fresca al entorno de Doñana, por presentar una cuenca de recepción mucho mayor que los arroyos (Grimalt *et al.*, 1999; Muñoz-Reinoso, 2001; IGME, 2006). Hay que tener en

cuenta que las aportaciones de los arroyos que nacen en la subunidad acuífera (La Rocina, Del Partido, etc.) presentan una gran variedad de caudales, que pasan, en tiempos relativamente cortos, de varios m<sup>3</sup> por segundo a unas decenas de litros por segundo, o incluso a caudales nulos (IGME, 2006).

El conjunto de aportaciones que originan la inundación de la marisma y la recarga natural del acuífero, se ha estimado en 200 hm<sup>3</sup> de media al año, mientras que el drenaje natural del acuífero se estima actualmente en unos 135 hm<sup>3</sup> (IGME, 2006). Los mayores niveles de agua en la región se producen entre noviembre y febrero mientras que en verano, durante la estación seca, el balance hídrico es claramente negativo quedando la marisma seca, salvo en los ojos y lucios, culminando así un ciclo de inundación/deseccación (Grimalt *et al.*, 1999; Muñoz-Reinoso, 2001; IGME, 2006).

Al alcanzar el agua subterránea la zona de las marismas, el funcionamiento hidrogeológico se hace muy complejo. Así, el acuífero pasa de ser libre a quedar semiconfinado; la formación permeable situada bajo las marismas no presenta ninguna zona de drenaje directo. Además, la formación semipermeable de las marismas contiene agua con alta concentración salina y, por tanto, más densa que el agua dulce situada por debajo, lo que dificulta grandemente el flujo ascendente (IGME, 2006). Los dos últimos factores condicionan y acotan el volumen de agua subterránea que puede pasar del acuífero libre al confinado, de modo que si el caudal subterráneo que procede del acuífero libre es mayor de un umbral determinado, el caudal excedente tiene que resurgir, formando manantiales, humedales, etc. Este comportamiento se produce en una estrecha franja que incluye el contacto de ambos tipos de acuíferos, y que coincide con el ecotono de La Vera La Retuerta (IGME, 2006).

Se tiene, en resumen, que una parte del agua subterránea que alcanza la zona de marismas debe de emerger en una banda subparalela al contacto acuífero libre/semiconfinado, y el resto circulará por el acuífero profundo del que emergerá, bien a través del semipermeable, bien al océano por una zona bajo el Guadalquivir o por una conjunción de ambos procesos.

Los ojos mantienen una lámina de agua durante todo el año que parece corresponder con el drenaje de los paleocauces que conectan con el acuífero libre. En el ecosistema de dunas el nivel piezométrico del acuífero está próximo a la superficie, pudiendo mantener los corrales una humedad

en el suelo que se conserva todo el año. En el ecotono de la Vera La Retuerta la superficie piezométrica se sitúa muy alta, por encima del nivel de marismas y, como consecuencia de ello, son normales las zonas húmedas y las lagunas. En parte de las marismas las aguas subterráneas ascienden lentamente a través de las arcillas semipermeables cargándose de sales, de forma que, al llegar a la superficie, estas aguas subterráneas se evaporan y salinizan las aguas superficiales (IGME, 2006).

Plata y Rubio (2003) establecen que hay dos zonas en la marisma caracterizadas por la diferencia en la calidad del agua: Por un lado, en el acuífero libre y en una porción del mismo, donde pasa a ser semiconfinado, las aguas son de buena calidad y facies bicarbonatada cálcica (conductividad inferior a 1 mS/cm); hacia el Sur y Sudeste, a medida que aumenta el espesor de sedimentos confinantes de marismas, las aguas evolucionan bruscamente hacia facies cloruradas sódicas (más de 20 mS/cm), evidenciando la existencia de una interfase o zona de tránsito de agua dulce-agua salada, con dirección aproximada NE-SW. Las aguas de los lucios son muy básicas, en especial en los momentos de conductividades más altas, esto indica que es un sistema sometido a procesos de evaporación intensísimos, que alcanza la saturación en algunos minerales, precipitándolos (IGME, 2006).

El Parque Nacional de Doñana es una de las más importantes áreas naturales de Europa debido a sus humedales, marismas salinas y charcas, que constituyen puntos fundamentales en las rutas migratorias e invernada de las aves. El mantenimiento de ambos ecosistemas, el acuático y el terrestre, dependen de la cantidad de precipitaciones y de la descarga del acuífero. La disponibilidad del agua es el factor que controla la composición de las comunidades vegetales, su biomasa, productividad y sucesión, siendo las especies higrofitas las más sensibles a los cambios del citado factor (Muñoz-Reinoso, 2001).

### **1.5.2 Ecosistemas del entorno de Doñana**

Se considera que en Doñana existen tres ecosistemas diferentes: las dunas móviles; los cotos (bosque sobre dunas fósiles) y la marisma. Además, se distingue la Vera que es considerada una zona de transición entre los cotos y la marisma (Grimalt *et al.*, 1999; Fabricio *et al.*, 2005).

### 1.5.2.1 Dunas móviles

El Parque Nacional de Doñana tiene uno de los pocos sistemas de dunas móviles existentes en la Península Ibérica. Las dunas móviles son arenas movidas por el viento que, al desplazarse, van cubriendo la vegetación que existe en su camino. En Doñana, abarcan 25 km de longitud y una anchura de 3,5 km, situándose en el suroeste del Parque Nacional, entre el océano Atlántico y la marisma (Muñoz-Reinoso y Castro, 2005). Una peculiaridad de las dunas móviles es que, con frecuencia, rodean bosquetes de pinos, los llamados corrales, y los acaban enterrando de forma que, cuando las dunas siguen su paso arrastradas por el viento, van dejando un paisaje de troncos secos y defoliados.

### 1.5.2.2 La Vera

La Vera constituye una franja de entre 200 a 1.500 m de anchura, siendo el límite entre las arcillas y las arenas y creando una zona de transición entre el coto (bosque mediterráneo asentado sobre dunas fósiles) y la marisma. Al constituir un ecotono (límite natural entre dos ecosistemas distintos) presenta una gran riqueza ecológica. La vegetación está formada, fundamentalmente, por pastos abiertos junto a zonas de matorral, confiriendo a este enclave características excepcionales, pues son las perchas donde se asientan habitualmente grandes colonias de aves, principalmente garzas, espátulas y garcillas (Grimalt *et al.*, 1999; Fabricio *et al.*, 2005; <http://www.mma.es/parques/lared/donana/visita/marisma.htm>).

### 1.5.2.3 Los Cotos

Están constituidos por bosque mediterráneo, fundamentalmente matorral, con diferentes especies florales en función de la disponibilidad de agua. Los cotos están asentados sobre dunas fósiles, razón por la cual muestran un paisaje ondulante. Así, la zona de cotos más húmeda (monte negro), está dominada por el brezo blanco (*Erica arborea*). Las áreas más áridas (monte blanco) tienen tomillo (*Thymus vulgaris*), lavanda (*Lavandula stoechas*), jaras (*Cistus* sp.) y romero (*Rosmarinus officinalis*) como especies características. Además de estos matorrales, tanto en el monte blanco como en el monte negro, se encuentran varias especies comunes a ambos, como son los madroños (*Arbutus unedo*), enebros sabina (*Juniperus* spp.), aligustres (*Forestiera durangensis*) y alcornoques

(*Quercus suber*). Los alcornoques constituyen los restos de bosques antiguos y son muy característicos del Parque porque constituyen el lugar preferido de anidamiento de diversas especies de aves coloniales, como las espátulas, cigüeñas, garzas, martinets y otras. La zona de cotos localizada cerca de la costa está dominada por pinos piñoneros (*Pinus pinea*) de más de 300 años de edad.

Especies muy abundantes en este ecosistema son el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y la perdiz roja (*Alectoris rufa*), que constituyen especies-presa con un alto índice de apetencia para los predadores. Además, los cotos también están habitados por el meloncillo (*Herpestres ichneumon*), tejón (*Meles meles*), jabalí (*Sus scrofa*), ciervo (*Cervus elaphus*), lirón careto (*Eliomys quercinus*), águila culebrera (*Circaetus gallicus*) y milano real (*Milvus milvus*), como exponentes interesantes. Además, se pueden encontrar varias especies en grave peligro de extinción, habitantes exclusivos de la Península Ibérica, como son el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) y el lince ibérico (*Lynx pardina*) (Grimalt *et al.*, 1999; Fabricio *et al.*, 2005).

#### 1.5.2.4 La Marisma

La marisma, de una extensión aproximada de 30.000 ha, constituye un cuerpo de agua somera en invierno que, progresivamente, se va secando en primavera-verano (Fabricio *et al.*, 2005). Dentro de este ecosistema se encuentran diversos biotopos:

- La **marisma baja** está formada por aquellos lugares ligeramente por debajo de la altitud media, que en años de lluvias normales concentran una importante cantidad de agua, lo que hace que disminuya su salinidad y pueda crecer una vegetación palustre basada en la castañuela (*Scirpus maritimus*) y el bayunco (*Scirpus littoralis*) (Ministerio de Medio Ambiente, 2006).
- La **marisma alta** permanece durante casi todo el año como una estepa arcillosa y compacta, encharcándose sólo durante el invierno (Ministerio de Medio Ambiente, 2006).
- **Los lucios** son el nombre local que se da a aquellos lugares más profundos que permanecen encharcados durante periodos más prolongados. En ellos, la alta salinidad impide casi por completo el crecimiento de la vegetación, a excepción de bayuncos, candilejo (*Juncus*

*subulatus*) y castañuelas en los bordes. Durante la sequía estival, estas láminas de agua quedan muy reducidas o completamente secas, mostrando un fondo cuarteado de limos arcillosos grises, cubiertos a veces de costras salinas blanquecinas (Ministerio de Medio Ambiente, 2006).

- Los **caños** son lo que antaño fueran cauces de arroyos, brazos y afluentes del río Guadiamar. Constituyen el mayor curso de agua salina, pudiendo estar comunicado directamente con el mar, siendo entonces un caño principal o caño madre; a su vez, puede estar abierto al mar por uno o varios puntos. Cuando un caño secundario es estrecho, de corto recorrido y tiene difícil comunicación con canales mayores, se le denomina **zumajo** (Ministerio de Medio Ambiente, 2006).
- Las **vetas** y **vetones** son terrenos que se elevan por encima del nivel medio, formando pequeñas islas que raramente se inundan. Son lugares de descanso y refugio para la fauna durante las grandes inundaciones, y también área de nidificación (Ministerio de Medio Ambiente, 2006).
- Los **ojos de la marisma** son pequeñas depresiones circulares que nunca se secan; fuentes naturales por las que aflora agua dulce. Aunque la procedencia de esta agua no está suficientemente estudiada, parece evidente que se corresponde con el drenaje de paleocauces localizados en la zona más superficial de las marismas y, que conectan los mencionados ojos con el sector del acuífero libre. Aparecen frecuentemente en zonas no muy interiores de la marisma y muchas veces en puntos cercanos a su borde (IGME, 2006; Ministerio de Medio Ambiente, 2006).

Todas estas áreas juntas son el lugar de descanso e invernada de aproximadamente 150 especies de aves que incluyen la Espátula (*Platalea leucorodia*), Garza Imperial (*Ardea purpurea*), Avetorillo (*Ixobrychus minutus*), Martinete (*Nycticorax nycticorax*), Cigüeña Blanca (*Ciconia ciconia*) y Ánsar Común (*Anser anser*). Otras especies, aproximadamente 125, eligen esta área para criar, por ejemplo las fochas (*Fulica cristata* y *F. atra*), Ánade Azulón (*Anas platyrhynchos*), Malvasía Cabeciblanca (*Oxyura leucocephala*) y Cerceta Pardilla (*Marmaronetta angustirostris*) (Grimalt *et al.*, 1999).

### 1.5.3 Apuntes sobre la fauna de Doñana

Doñana es una de las zonas húmedas más extensas de Europa y la más importante de España. Constituye, además, el área con mayor diversidad y abundancia de aves de toda la geografía española.

El Parque Nacional de Doñana alberga, al menos, 458 especies de vertebrados, cuya distribución es la siguiente: 361 especies de aves, 29 de mamíferos, 19 de reptiles, 12 de anfibios, 30 especies de peces de estuario y 7 especies de peces de agua dulce (Grimalt *et al.*, 1999; Formularios Oficiales de la Red Natura 2000, Ministerio de Medio Ambiente).

El gran número de especies de aves constituye, probablemente, la mayor riqueza del Parque Nacional y le confiere una alta relevancia internacional. Doñana es una de las reservas naturales más grandes de Europa y uno de los enclaves más importantes donde sobreviven especies en peligro de extinción, como el Águila Imperial Ibérica (*Aquila adalberti*), la Cerceta Pardilla (*Anas strepera*), la Malvasía Cabeciblanca (*Oxyura leucocephala*), la Gaviota de Audouin (*Larus audouinii*) o el Lince Ibérico (*Lynx pardina*), entre otras.

Aproximadamente, el 70% de todas las especies de aves de Europa están representadas en Doñana, que constituye, además, la principal área de invernada en el continente europeo de algunas especies migratorias, como el Ánsar Común, acogiendo concentraciones de docenas de miles de individuos procedentes de latitudes septentrionales (Grimalt *et al.*, 1999; Tovar-Sánchez, *et al.*, 2006; Formularios Oficiales de la Red Natura 2000, Ministerio de Medio Ambiente).

Las estimaciones sobre el número de individuos de algunas especies de aves ilustran sobre la extraordinaria importancia de este enclave, como queda reflejado en la Tabla 1, en la que se muestran los censos de las Ciconiformes y Phoenicopteriformes desde 1973 (Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales, Estación Biológica de Doñana, CSIC).

Tabla 1. Censos de Ciconiformes y Phoenicopteriformes (Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales, Estación Biológica de Doñana, CSIC).

AÑO	<i>Ciconia ciconia</i>	<i>Ardea cinerea</i>	<i>Ardea purpurea</i>	<i>Ardeola ralloides</i>	<i>Bulbulcus ibis</i>	<i>Egretta garzetta</i>	<i>Nycticorax nycticorax</i>	<i>Platalea leucorodia</i>	<i>Plegadis falcinellus</i>	<i>Phoenicopterus ruber</i>
1973	6	260	-	400	4000	4000	1600	706	0	-
1974	6	110	-	-	-	-	-	200	0	-
1975	6	260	-	4	2800	800	30	400	0	-
1976	12	70	1033	-	400	400	8	350	0	-
1977	24	80	2380	-	300	300	-	450	0	5615
1978	36		2114	-	-	292	100	343	0	11025
1979	44	150	438	-	-	80	300	248	0	7826
1980	68	224	1820	4	2432	734	88	578	0	7826
1981	74	140	-	200	1400	480	40	150	0	3230
1982	96	202	380	60	600	986	250	890	0	12100
1983	104	250	100	-	450	150	-	680	0	3530
1984	-	394	3215	-	1062	828	64	1342	0	26100
1985	-	400	410	20	1172	875	82	1760	0	22972
1986	-	496	720	8	2672	1679	44	1119	0	13300
1987	90	-	2210	170	-	400	110	361	0	13756
1988	134	250	3348	-	-	268	-	426	0	18060
1989	170	250	406	-	-	274	400	1066	0	16320
1990	192	400	5694	1150	1336	5716	1210	759	0	3950

1991	240	1194	516	120	608	386	280	1600	0	15407
1992	278	722	480	-	114	58	34	499	0	9932
1993	334	562	70	-	66	54	66	365	0	12060
1994	360	610	348	80	1958	842	410	765	0	13225
1995	392	476	652	10	568	400	154	242	0	13090
1996	-	938	1868	354	7660	968	454	1099	14	23790
1997	-	590	1344	234	3906	1614	460	2378	80	22979
1998	430	568	1042	166	8192	9934	2582	3446	172	19620
1999	556	1028	1228	194	8170	2190	1036	699	8	22782
2000	315	2176	754	272	15436	3686	1820	1282	146	25372
2001	664	1974	4974	250	8500	11574	5040	2020	398	23449
2002	634	1156	2592	630	13074	7330	4856	1426	800	23477
2003	648	-	-	-	-	-	-	-	-	48324

Se comprende, por tanto, perfectamente que cualquier episodio de mortandad masiva que suceda en este espacio natural puede tener consecuencias importantes en la comunidad de vertebrados existente y, de forma específica, sobre la población de algunos de los taxones más amenazados.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Aunque las mortandades de aves acuáticas en las marismas de Doñana se conocen desde antiguo (Bernis, 1974) no se empezaron a referenciar hasta 1969, año de la creación del Parque Nacional de Doñana. Estos sucesos han sido atribuidos a diversas causas pero las consideradas con mayor fundamento han sido aquellas relacionadas con intoxicaciones por botulismo y por pesticidas. Bernis, en 1974, ya comentaba que *“dentro de ciertos límites, la mortandad de aves en las Marismas del Guadalquivir es un hecho tan viejo como vulgar. En años secos siempre adquiere mayor intensidad e incluso dramatismo. Esto ha ocurrido siempre, mucho antes de existir los insecticidas y cuando ninguna agricultura se había desarrollado todavía en la zona”*.

Las Marismas de Doñana, desde 1969, han disfrutado del grado máximo de protección que ofrece la legislación española, mediante la declaración del Parque Nacional de Doñana. Posteriormente, se ha extendido la protección sobre las zonas periféricas mediante la declaración de espacios naturales de inferior categoría y bajo gestión exclusiva de la Junta de Andalucía, como es el caso del Parque Natural. Desde su declaración como Parque Nacional, hace ya 37 años, se han registrado un total de 13 sucesos de mortandad en masa de fauna salvaje, cuyas causas en muchos casos no han sido precisadas.

Teniendo en cuenta la extraordinaria importancia ecológica de Doñana, es necesario realizar estudios que permitan conocer la etiología de las mortandades en masa de fauna salvaje.

Para ello hemos realizado:

- Un análisis de datos históricos, desde 1969 hasta 2001, de la aparición de mortandades masivas así como su distribución espacial y temporal, valorando su estacionalidad y su asociación, cuando hay datos, con la presencia de cianobacterias tóxicas.
- Y un análisis de datos actuales recogidos por nosotros, desde 2002 hasta 2005, analizando la aparición de cianobacterias y cianotoxinas, su distribución espacial y temporal, su proliferación y su relación con los parámetros ambientales limnológicos. Por otro lado exponemos el estudio

de cianobacterias tóxicas realizado en Doñana durante el periodo de datos actuales (2002 – 2005) y su relación con las mortandades detectadas allí durante este tiempo, estudiándose tres episodios de mortandad: el ocurrido en julio de 2004, el registrado en octubre de 2004 y el que se produjo en junio de 2005. La discusión de este último ha sido planteada de forma separada en este capítulo por tratarse del primer caso conocido de intoxicación por saxitoxinas en aguas continentales registrado fuera de Australia.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 ÁREA DE ESTUDIO Y CARTOGRAFÍA**

En la delimitación del área de estudio se ha incluido la superficie suficiente como para englobar los puntos de muestreo del periodo de los datos actuales, así como las mortandades que se produjeron en el entorno de las marismas de Doñana (datos históricos).

Para representar geográficamente estos y otros datos incluidos en los análisis espaciales se ha utilizado un sistema de información geográfica (SIG) basado en ortofotos digitales del área de Doñana y su entorno con una resolución de 8 m. Sobre esta base cartográfica se han introducido capas digitales de información con las coordenadas conocidas en proyección UTM (Universal Transverse Mercator) de aquellos elementos o parámetros de los que se ha necesitado una representación geográfica.

Para facilitar posteriormente los análisis estadísticos sobre distribución espacial el área de estudio ha sido dividida mediante una red de cuadrículas UTM de 5 x 5 Km.

Finalmente, la cartografía resultante ha permitido elaborar un conjunto de mapas temáticos a escala 1:200.000 que han sido incluidos a tamaño DIN A3 en el Anexo 1.

#### **3.1 DATOS HISTÓRICOS**

##### **3.1.1 Periodo que abarcan los datos históricos**

Para la obtención de los datos considerados históricos se ha establecido un periodo de tiempo de 32 años, que abarca desde el año de la creación del Parque Nacional de Doñana (1969) hasta el año 2001.

### **3.1.2 Mortandades surgidas en el periodo histórico**

Los datos del estudio histórico de las mortandades de fauna salvaje que han surgido en Doñana se obtuvieron de los Cuadernos de Campo de la Estación Biológica de Doñana, de las Memorias del Parque Nacional de Doñana, de los trabajos del Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales de la EBD y de la Oficina de Coordinación de la Investigación de la EBD.

### **3.1.3 Datos históricos sobre presencia de cianobacterias tóxicas en Doñana**

No existe bibliografía científica en la que se encuentren los datos sobre presencia, abundancia y distribución de cianobacterias tóxicas en Doñana, ni tampoco sobre las características físico-químicas del agua de Doñana en cuanto a su adecuación a la proliferación de cianobacterias; por lo que se ha realizado una recopilación de información existente en actas de congresos y en la literatura científica para obtener datos que, al menos, orienten sobre este respecto. La información recogida es escasa y de poca relevancia por lo que no se presentan como resultados aunque sí se exponen en la discusión.

## **3.2 DATOS ACTUALES**

### **3.2.1 Periodo de estudio**

Los datos propios para la realización de esta tesis fueron obtenidos entre los años 2002 y 2005.

### **3.2.2 Selección de lugares de muestreo de agua**

La elección de los sitios de muestreo se llevó a cabo teniendo en cuenta las zonas de aguas continentales con mayor concentración de aves y representativas de diferentes ecosistemas. Asimismo, se realizaron muestreos también en aquellos lugares en los que se registró alguna mortandad de fauna salvaje (Codd *et al.*, 1999). Con estos criterios, se seleccionaron un total de 39 puntos de muestreo (Tabla 2). Para poder hacer estudios de distribución se ha utilizado el sistema de retículas dividiendo el área estudiada en cuadrículas de 5 x 5 Km (Tabla 2)

Tabla 2. Puntos de muestreo, coordenadas UTM de localización de referencia en el mapa1

Número	Nombre del lugar	UTM - X	UTM - Y	Cuadrícula
1	Arroyo de la Cigüeña	212295.37	4122291.61	I2
2	Brazo de la Torre (Bomba)	208601.73	4101121.36	H6
3	Brazo de la Torre (Canterita)	212201.00	4103833.12	I6
4	Brazo de la Torre (Mareal)	208401.00	4091563.32	H8
5	Canal del Cherry	207721.69	4097139.19	H7
6	Canal Desviación / Veta Hornitos	205532.74	4113379.51	G4
7	Caño del Guadiamar (Caño alto)	201698.43	4094879.77	G8
8	Caño del Guadiamar (Caño bajo)	209436.00	4118011.00	H3
9	Caño del Guadiamar (Caño medio)	204591.11	4113448.00	G4
10	Caño del Pescador	202372.39	4113994.10	G4
11	Caño Marín (cabecera)	191489.37	4120560.13	E3
12	Caño Marín (desembocadura)	192015.12	4114675.12	E4
13	Caño Marín (tramo medio)	191858.54	4117150.62	E3
14	Caño Travieso	204043.74	4098192.90	G7
15	Casa de las Nuevas	204387.87	4093859.57	G8
16	Casa de Leo Biaggi	205033.05	4098158.39	G7
17	Casa de los Corros	207625.98	4094364.61	H8
18	El Bolín	194195.12	4099777.68	E7

19	Entremuros (Bomba)	208697.33	4098192.90	H7
20	Entremuros (Simón)	215813.79	4120474.33	I3
21	Entremuros (Vaqueros)	216708	4116795.55	J3
22	Finca los Caracoles	205043.87	4105566.01	G5
23	La FAO	199459.12	4108541.07	F5
24	La Rocina	189538.00	4114702.00	D4
25	Laguna Gallega	204678.28	4095084.10	G8
26	Los Mimbrales 1	187491.48	4112680.58	D4
27	Los Mimbrales 2	187209	4109669	D4
28	Los Rompidos	201125.59	4085639.74	F9
29	Lucio de los Ánsares	204624.58	4093542.65	G8
30	Lucio de Mari López	203602.00	4103337.00	G6
31	Lucio del Cangrejo	207934.58	4103304.97	H6
32	Lucio del Lobo	202906.68	4108110.32	G5
33	Lucio del Membrillo	199887.10	4085683.36	F9
34	Marisma del Rocío	190522.60	4114421.10	D4
35	Puente de Ajolí	192048.95	4115600.04	E3
36	Santa Olalla	190935.22	4098661.22	D7
37	Soto Chico	191902.43	4111592.03	E4

38	Soto Grande	190420.69	4111646.31	D4
39	Veta de la Palma	216842.87	4103310.52	J6

La heterogeneidad y naturaleza dinámica de muchas poblaciones de cianobacterias dificultan la selección de los lugares de muestreo (Codd *et al.*, 1999). Con la selección que se ha realizado en este trabajo, se han incluido todos los ecosistemas de Doñana ligados a las aguas continentales y se ha mantenido una distribución espacial adecuada para que los resultados que se obtengan de los mismos sean representativos (mapa 1).

### 3.2.3 Frecuencia y toma de muestras de agua

La frecuencia de muestreo establecida fue, como norma, una vez por cada estación del año, incrementándose en los periodos en los que la aparición de cianobacterias es más probable, como es en verano y otoño (Utkilen *et al.*, 1999), si bien la dinámica hidrológica de la zona ha condicionado la toma de algunas muestras durante los periodos de sequía debido a la ausencia de agua. Adicionalmente a los muestreos programados, cuando se han producido mortandades de fauna salvaje, se ha procedido a llevar a cabo un muestreo completo en el lugar donde ocurrió cada suceso, siguiendo a Utkilen *et al.* (1999) y que, brevemente, se describen a continuación:

- Anotaciones sobre la fecha y lugar del muestreo.
- Inspección de la zona de muestreo, indicando si aparecía alguna coloración verde o azul verdosa, o bien espuma en las orillas.
- Para la identificación microscópica de las cianobacterias en vivo, se recogieron 100 mL de agua en cajas de cultivo de tejidos de tapa ventilada (Tissue Culture FlaskT75 CN Vent Cap, SARSTEDT, USA)
- Para la identificación microscópica y recuento, se recogieron 100 mL de muestra, a la que se

añadió inmediatamente formol al 1% tamponado con PBS (Phosphate Buffer Saline).

- Para medir la clorofila *a*, se recogieron 100 mL de muestra en cajas de cultivo de tapa ventilada (Tissue Culture Flask T75 CN Vent Cap, SARSTEDT, USA).
- Para recoger materia celular para los bioensayos en ratón, se filtraron de 100 a 500 mL de agua (en función de la cantidad de partículas disueltas en el agua) por un filtro de red.
- Para medir la cantidad de toxinas en el agua, se recogieron 50 mL en una caja de cultivo de tapa ventilada (Tissue Culture Flask T75 CN Vent Cap, SARSTEDT, USA).
- Por si fuera necesario repetir algún análisis, se recogieron dos litros de agua a una profundidad máxima de 25 cm.
- Todas las muestras de agua se transportaron en condiciones de oscuridad y bajo refrigeración (unos 4 °C) en una nevera portátil hasta el laboratorio, donde quedaron almacenadas para su estudio en una cámara frigorífica a 4 °C (Utkilen *et al.*, 1999).

#### **3.2.4 Identificación y recuentos de cianobacterias**

Las muestras empleadas para la identificación de las cianobacterias se analizaron en vivo y sin conservantes en un plazo inferior a 24 horas desde su recogida para evitar cualquier alteración (Utkilen *et al.*, 1999).

Antes de cualquier identificación o recuento, se mezclaba bien el bote de donde se iba a recoger la muestra (Utkilen *et al.*, 1999). Para proceder a la identificación se centrifugaban a 3.000 rpm (Rotofix 32, Hettich zentrifugen, Alemania), durante cinco minutos, para concentrar la muestra. La identificación de las especies de cianobacterias dominantes se realizó con un microscopio óptico invertido (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Alemania), teniendo en cuenta la morfología de las células y sus colonias según la taxonomía de Skulberg *et al.* (1993). La taxonomía de *Anabaena circinalis* se estableció teniendo en cuenta el tamaño, forma y localización de los heterocistes y acinetos a lo largo del tricoma (Baker *et al.*, 1992; Bowling, 1994).

Para el recuento celular se recogieron 100µL de muestra en un bote Eppendorf junto con 25µL de formaldehído (35-40% p/v) en PBS para conservar la muestra, realizándose el recuento en una cámara de Neubauer (hemocitómetro).

Se realizaron tres réplicas de cada muestreo. Los recuentos se efectuaron siguiendo un número de réplica que se ha calculado por la Técnica de Medias Progresivas de Williams (1977). De esta forma, el error estándar ha sido siempre menor del 5%. Posteriormente, se realizaron las correcciones oportunas para eliminar la dilución debida al formaldehído utilizado para conservar las muestras.

Se estableció la media de células que contenían las colonias y las cianobacterias filamentosas para indicar los resultados de recuento en colonias/mL.

### **3.2.5 Determinación de clorofila *a***

Se tomaron 1,5 mL de muestra. Con el fin de separar las células se centrifugó (Minispin, Eppendorf, Hamburg, Alemania) en oscuridad y frío (4 °C) a 3.000 rpm durante 10 min., se eliminó el sobrenadante y se congeló el “pellet” (-18°C) dentro de botes Eppendorf hasta que se realizó la extracción.

Se cubrieron con 1 mL de solución extractora (N,N-dimetilformanmida (DMF)) las muestras congeladas. Mediante un sonicador (Vibra cell™ Sonics&materials INC. Danbury CT, USA) se sometieron las muestras a tres pulsos de 5 segundos a 60 MHz en intervalos de 40 segundos. A continuación, se añadió el volumen necesario de solución extractora para alcanzar un mínimo de 1,5 mL de volumen de extracto.

La extracción de pigmentos se llevó a cabo en oscuridad y frío (4°C) mediante la adición de 1 mL de DMF a las muestras congeladas que se mantuvieron 12 horas para favorecer la extracción.

Para la medida de las absorbancias se utilizaron cubetas de espectrofotómetro de cuarzo, de 1,5 mL de volumen y de 1 cm de recorrido. El blanco se realizó rellenando la cubeta con DMF y se midió la absorbancia a diferentes longitudes de onda (750, 646,8 y 663,8 y 480 nm).

La absorbancia de 750 nm estima la turbidez de la muestra. Por ello, si dicha absorbancia era superior a 0,015 se volvía a centrifugar el extracto y se repetían las medidas de absorbancia.

El cálculo de la concentración de clorofila *a* se realizó aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 12 A_{663,8} - 3,11A_{646,8}$$

### **3.2.6 Análisis de nitratos y fosfatos**

Los nitratos y fosfatos se determinaron in situ con la sonda multiparamétrica YSI 6820-C-M (Yellow Springs, OH, USA).

### **3.2.7 Extracción de toxinas**

Para poder realizar la extracción de las toxinas se sometió la suspensión de células, obtenida en el lugar de muestreo mediante filtración, a la sonicación. Para ello, se tomaron 1,5 ml de muestra en un bote Eppendorf, donde fue sonicado (Vibra cell™ Sonics&materials INC. Danbury CT, USA), manteniendo en todo momento el Eppendorf dentro de una cubeta de hielo picado. La pauta de sonicación fue de 3 pulsos de 20 segundos a 60 MHz. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 15.000 rpm (Minispin, Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Para extraer las posibles toxinas de los ventrículos, cada uno de ellos se colocó encima de una placa de Petri y se añadieron en su interior 2 ml de PBS. De esta mezcla se recogió 1 ml que fue trasvasado a un bote eppendorf, donde se procedió a la sonicación (Vibra cell™ Sonics&materials INC. Danbury CT, USA) de la muestra con 3 pulsos de 20 segundos a 60 MHz, manteniendo el eppendorf dentro de una cubeta de hielo picado. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 15.000 rpm (Minispin, Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Para la extracción de las posibles toxinas de los hígados, se homogenizaron 2,5g de muestra con 2,5 mL de PBS, homogenizándose todo el contenido. Del homogenizado, se tomaron 1,5 ml y se trasvasaron a un bote eppendorf, donde se sonicó (Vibra cell™ Sonics&materials INC. Danbury CT, USA) la muestra con 3 pulsos de 20 segundos a 60 MHz, manteniendo el Eppendorf dentro de

una cubeta de hielo picado. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 15.000 rpm (Minispin, Eppendorf, Hamburg, Alemania).

### **3.2.8 Análisis para la medición de microcistina**

Para los análisis cuantitativos de microcistina-LR en agua, hígado y contenido ventricular de los animales afectados, se utilizó un kit comercial: el enzimoimmunoanálisis EnviroGard<sup>®</sup> Microcystin quantitative (Strategic Diagnostics, Inc.), siguiendo las recomendaciones de uso especificadas por la casa comercial. La lectura se realizó en el espectrofotómetro (Spectrofotometric Boeco, Germany). Este test tiene un rango de detección que oscila entre 0.16 ppb y 2.5 ppb, por lo que los resultados que salieron del rango de detección se diluyeron o concentraron hasta conocer la concentración de toxina.

Cada muestra se midió tres veces para estimar el error estándar. Además, se realizaron las correcciones matemáticas oportunas para eliminar las distintas diluciones realizadas.

### **3.2.9 Análisis para la medición de la toxina PSP**

Para el análisis cuantitativo de saxitoxina y derivados en el agua y en los hígados de los animales afectados, se utilizó un kit comercial, el enzimoimmunoanálisis RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Saxitoxin (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania), siguiendo las recomendaciones de uso especificadas por la casa comercial. La lectura se realizó en el espectrofotómetro (Spectrofotometric Boeco, Germany). El rango mínimo de detección de este test oscila entre 2.5 ppb y 50 ppb.

El kit RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Saxitoxin (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania) no es capaz de distinguir entre las distintas toxinas productoras de PSP (como son Saxitoxina, Decarbamoil saxitoxina y Neosaxitoxina). Sin embargo, debido a que el objetivo consiste en detectar toxinas neurotóxicas productoras del síndrome PSP, esta reacción cruzada resulta de gran interés.

### **3.2.10 Bioensayo en ratón**

La técnica empleada para el bioensayo en ratón se basa en la inyección intraperitoneal de un

extracto de muestra. Esta técnica esta sustentada en el método empleado por la AOAC (Método 959.08) para PSP (Cunniff, 1995) y en las optimizaciones realizadas para las distintas toxinas de Fernández y Cembella (1995). Se utilizaron machos de ratón sanos con un peso de 20 g. Los grupos de machos se dividieron aleatoriamente en grupos de tres y fueron inyectados intraperitonealmente con 0,5 ml de la muestra problema. Después de la inyección, los ratones fueron observados de forma continua. Los síntomas y tiempos de supervivencia fueron anotados en todos los experimentos.

En los bioensayos de ratón para detección de microcistinas se consideró que cuando el ratón moría en las primeras 24 horas el bioensayo era positivo. El índice establecido para determinar los resultados del bioensayo en ratón fue el siguiente: 3+ tres ratones muertos en las primeras 24 horas; 2+ dos ratones muertos en las primeras 24 horas; 1+ un ratón muerto en las primeras 24 horas y 0 cuando los tres ratones se encontraban con vida 24 horas después de la inyección. Así como, un grupo control al que se le inyectó suero fisiológico.

Se realizaron bioensayos en ratón con las muestras de cianobacterias tóxicas y con los contenidos ventriculares de los animales muertos en los distintos casos de mortandad estudiados.

Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las normas de bienestar animal (Comunidad Autónoma de Madrid)

### **3.2.11 Descripción de los sucesos de mortandad y necropsias**

Los sucesos de mortandad que surgieron en el periodo de estudio de datos actuales se describieron por separado para su posterior análisis.

Parte de los cadáveres recogidos durante las mortandades fueron necropsiados siguiendo la metodología descrita por Lanzarot *et al.* (2005), rellenándose sistemáticamente la ficha de necropsia creada para tal efecto. De todos los cadáveres se recogieron los ventrículos y los hígados para su posterior análisis.

Los cadáveres de animales fueron mantenidos en refrigeración hasta la realización de la necropsia. Las muestras de hígado y contenido ventricular fueron congeladas hasta su análisis.

### **3.2.12 Estimación de la repetibilidad, reproducibilidad y precisión en la detección de las toxinas**

La repetibilidad y reproducibilidad de las cianobacterias y toxinas medidas se realizaron de acuerdo con las medidas establecidas por el British Standard Institute (1979) y Thrusfield (1995).

La repetibilidad fue determinada mediante la concordancia de medir tres veces las medidas de la misma muestra de cianobacterias, de los controles de microcistina-LR (Sigma–Aldrich Química) entre 0.8 y 4 ppb y los controles de saxitoxinas (R-Biopharm AG) entre 2.5 ppb y 50 ppb.

La reproducibilidad fue determinada mediante la concordancia entre tres baterías de observaciones realizadas por tres observadores distintos, utilizando tres alícuotas de muestras de cianobacterias, tres lotes de reactivos de microcistina-LR controles a 0.8 y 4 ppb.

La precisión fue determinada como la mínima variación de toxinas que pudo ser detectada.

## **3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para poder evaluar y analizar estadísticamente los datos de aparición de mortandades masivas de fauna salvaje en Doñana hemos realizado, por un lado, un análisis estadístico de los datos históricos con todas las referencias bibliográficas que se han podido recopilar y, por otra parte, un análisis estadístico de datos actuales equivalentes, con el fin de realizar una comparación directa entre ambos periodos temporales. Adicionalmente, se ha realizado un análisis estadístico detallado de los datos actuales en el que se han incluido otros parámetros complementarios obtenidos, como la presencia de cianobacterias, cianotoxinas, niveles de nitratos, niveles de fosfatos y valores de clorofila..

El análisis estadístico se ha realizado con el software SPSS 12.0, para Windows.

Los resultados fueron sometidos a un estudio estadístico descriptivo de presentación de frecuencias. Se analizó la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnof. Para las comparaciones entre los datos históricos y los actuales que se realizan se utilizan test no paramétricos: la U de Mann-Whitney para datos no apareados que permite comparar las medianas de dos muestras, aunque estas sean muy reducidas (Fowler y Cohen, 1999).

Para valorar si existen correlaciones entre los distintos parámetros estudiados realizamos el test de Spearman para las variables mortandad, colonias, toxinas, nitratos, fosfatos, clorofila, cuadrícula, año y mes.

### **3.3.1 Análisis estadístico de datos históricos**

El cálculo de la probabilidad de aparición de mortandades masivas en Doñana se establece a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ mortandades} / \text{N}^\circ \text{ años estudiados} \times 100$$

Para la evaluación de la distribución espacial y temporal (anual y mensual) se realiza un análisis de frecuencias de las mortandades masivas en relación a su distribución en cuadrículas o a su distribución en el periodo anual o mensual.

### **3.3.2 Análisis estadístico básico de datos actuales**

El cálculo de la probabilidad de aparición de mortandades masivas en Doñana se establece a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ mortandades} / \text{N}^\circ \text{ años estudiados} \times 100$$

Para la evaluación de la distribución espacial y temporal (anual y mensual) se realiza un análisis de frecuencias de las mortandades masivas en relación a su distribución en cuadrículas o a su distribución en el periodo anual o mensual.

### **3.3.3 Análisis estadístico detallado de datos actuales**

La probabilidad de aparición de cianobacterias tóxicas y de cianotoxinas en Doñanase se calculan a partir de las siguientes fórmulas:

Nº años con presencia de cianobacterias tóxicas /Nº años estudiados x 100

Nº meses con presencia de cianobacterias tóxicas /Nº meses estudiados x 100

Nº años con presencia de cianotoxinas tóxicas /Nº años estudiados x 100

Nº meses con presencia de cianotoxinas tóxicas /Nº meses estudiados x 100

Para la evaluación de la distribución espacial y temporal (anual y mensual) tanto de las cianobacterias tóxicas como de las cianotoxinas, se realiza un análisis de frecuencias de aparición en relación a su distribución en cuadrículas o a su distribución en el periodo anual o mensual.

Para poder discriminar qué parámetro estudiado tiene mayor influencia en la aparición de mortandades se emplea un árbol de decisiones, realizado con el programa Answer Tree 12.0 (software SPSS 12.0, para Windows), que permite realizar un algoritmo completo de un árbol estadístico con múltiples variables, lo que facilita una exploración exhaustiva de los datos.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 DATOS HISTÓRICOS**

#### **4.1.1 Mortandades surgidas en el periodo histórico**

Las mortandades más importantes de las que se tienen registros y que han sucedido en el entorno de Doñana desde la creación del Parque Nacional son brevemente descritas a continuación:

1973. Se estimaron 50.000 aves acuáticas muertas de 44 especies distintas. Los principales focos estuvieron en plena Marisma Virgen (Lucio de Las Nuevas y los Ánsares) y a lo largo del Brazo de la Torre. La mortandad se prolongó desde la primera quincena de julio hasta el 15 de noviembre.

1974. Se estimaron 15.000 aves muertas. Los principales focos surgieron en los límites y zonas exteriores del PND. Las fechas de mortandad fueron desde el primero de junio al 15 de agosto.

1977. Se estimaron unas 500 aves muertas. La mayoría eran de la especie Ánade Azulón pero también se recogieron muertos Ánade Friso, Pato Cuchara, Cerceta Pardilla (5), Pato Colorado y Focha Cornuda (4). Las fechas de mortandad fueron desde el primero de junio al 15 de agosto.

1978. Se estimaron unas 70.000 aves muertas. El foco principal surgió en el PND. Las fechas de mortandad fueron desde el 15 de agosto al 10 de septiembre.

1979. Se estimaron unas 1.515 aves muertas y 327 enfermas que luego murieron, así como 271 aves recuperadas de 31 especies distintas. El foco principal surgió en Las Nuevas (Lucio de los Ánsares y Caño Travieso). La fecha de inicio de la recogida de animales fue el 31 de julio y se consideró acabada el 27 de agosto.

1985. Se estimaron unas 2.426 aves muertas y 1.040 aves enfermas de las que se recuperaron 691. Se vieron afectadas 32 especies. El foco apareció en el Lucio de Veta Lengua y posteriormente apareció en el Lucio de los Ánsares y en el Lucio de Aguas Rubias. La fecha de inicio de la

mortandad fue el 27 de julio y se consideró acabada el 9 de septiembre.

1986. Se estimaron unas 15.000 – 20.000 aves muertas. Las especies afectadas fueron 29. El foco de la mortandad apareció en los arrozales de Villafranco del Guadalquivir y los Lucios del Cangrejo Grande y del Italiano. Las fechas de mortandad fueron de junio a noviembre.

1987. Se estimaron unas 2.702 aves muertas y 1.573 enfermas. Las especies afectadas fueron 34. El foco de la mortandad apareció en el Lucio de la FAO y Caño Guadamar, pero luego se vieron afectados también los Lucios de los Ánsares, Buen Tiro, Sevilla, el Rey, Membrillo, Figuerola, el Molinillo, Caño Travieso y el Desierto, Aguas Rubias, Veta Lengua y Cantaritas. La fecha de inicio fue el 19 de junio y se consideró acabada en uno de agosto.

1988. Se estimaron unas 5.394 afectadas de las que murieron 3.794 y solo se recuperaron 1.605. Las especies afectadas fueron 34. El foco de la mortandad apareció en la FAO, Lucio Redondo, del Aro, Las Nuevas, Sanlúcar y Sevilla y las localidades afectadas fueron los Lucios de Los Ánsares, Buen Tiro, Travieso, Veta Lengua, Aguas Rubias y sur de la Marisma de Hinojos.

1990. Se estimaron unas 2.139 aves muertas. La mortandad afectó al Lucio del Cangrejo Grande, al Lucio del Cangrejo Chico y al entorno del Parque Natural. Las fechas de mortandad fueron desde el 15 de agosto al 15 de septiembre.

1991. Se estimaron unas 1.327 aves muertas, 192 enfermos que murieron y 463 recuperados. Las especies afectadas fueron 30. El foco de la mortandad apareció en el Lucio de los Ánsares y el Rey y las localidades afectadas fueron Buen Tiro, Sevilla, Sanlúcar, Travieso, Veta Lengua. La mortandad surgió en la primera quincena de junio.

1997. Se estimaron unas 500 aves muertas. El foco de mortandad apareció en Veta la Palma. La fecha de inicio fue el 22 de septiembre y se consideró acabada el 28 de octubre.

2001. Aparecieron unos 579 pollos de flamenco y varias especies de anátidas muertas. El foco se produjo en el Lucio de las Piedras. Las fechas de mortandad fueron desde 18 de julio al 31 de julio.

Desde 1969, año de la creación del Parque Nacional de Doñana, se han registrado 13 sucesos de mortandad de fauna salvaje (Tabla 3) que han quedado distribuidos en cuadrículas UTM de 5 x 5 km (mapa 3).

Tabla 3. Años y puntos de aparición de mortandades (datos históricos) junto con las coordenadas UTM y sus correspondencias con las cuadrículas del mapa 3.

Año	Paraje	Número en mapa	UTM-X	UTM-Y	Cuadrícula
1973	Lucio del Sapillo	3	213334	4111770	I4
1973	Brazo de la Torre	18	208602	4101121	H6
1973	Casa de las Nuevas	16	204388	4093860	G8
1973	Lucio de los Ánsares	17	204625	4093543	G8
1974	Límites y zonas exteriores del PND	-	-----	-----	-----
1977	-----	-	-----	-----	-----
1978	Dentro del PND	-	-----	-----	-----
1979	Casa de las Nuevas	16	204388	4093860	G8
1979	Lucio de los Ánsares	17	204625	4093543	G8
1979	Caño Travieso	26	204044	4098193	G7
1985	Lucio de Vetallengua	4	198438	4090158	F8
1985	Lucio de Aguas Rubias	5	196630	4093279	F8
1985	Lucio de los Ánsares	17	204625	4093543	G8
1986	Lucio del Cangrejo Grande	20	207935	41033005	H6

1986	Lucio del Cangrejo Chico	22	206650	4101167	H6
1986	Casa de Leo Biaggi	21	205033	4098158	G7
1986	Canal del Cherry	23	207722	4097139	H7
1986	Lucio del Hondón	7	195163	4093873	E8
1986	Lucio de los Ánsares	17	204625	4093543	G8
1987	Caño del Guadiamar		204591	4113448	G4
1987	La FAO	24	199459	4108541	F5
1987	Cantaritas	15	211395	4104877	I6
1987	Caño Travieso	26	204044	4098193	G7
1987	Lucio de Vetalengua	4	198438	4090158	F8
1987	Lucio de Aguas Rubias	5	196630	4093279	F8
1987	Lucio del Molinillo	2	204491	4090779	G8
1987	Lucio del Rey	8	202557	4091903	G8
1987	Lucio del Buentiro	1	205211	4094242	G8
1987	Lucio de los Ánsares	17	204625	4093543	G8
1987	Lucio Sevilla	6	207082	4092119	H8
1987	Lucio del Membrillo	27	199887	4085683	F9
1988	La FAO	24	199459	4108541	F5
1988	Marisma de Hinojos	12	198878	4097147	F7

1988	Caño Travieso	26	204044	4098193	G7
1988	Lucio de Aro	11	206556	4099670	H7
1988	Lucio Redondo	10	196099	4092811	E8
1988	Lucio de Vetallengua	4	198438	4090158	F8
1988	Lucio de Aguas Rubias	5	196630	4093279	F8
1988	Lucio del Buentiro	1	205211	4094242	G8
1988	Lucio Sanlucar	13	205053	4091746	G8
1988	Casa de las Nuevas	16	204388	4093860	G8
1988	Lucio de los Ánsares	17	204625	4093543	G8
1988	Lucio Sevilla	6	207082	4092119	H8
1990	Lucio del Cangrejo Grande	20	207935	41033005	H6
1990	Lucio del Cangrejo Chico	22	206650	4101167	H6
1991	Caño Travieso	26	204044	4098193	G7
1991	Lucio de Vetallengua	4	198438	4090158	F8
1991	Lucio del Rey	8	202557	4091903	G8
1991	Lucio del Buentiro	1	205211	4094242	G8
1991	Lucio Sanlucar	13	205053	4091746	G8
1991	Lucio de los Ánsares	17	204625	4093543	G8
1991	Lucio Sevilla	6	207082	4092119	H8

1997	Veta de la Palma	28	216843	4103311	J6
2001	Lucio de la Piedra	14	202247	4094930	G8

En la mortandad del año 1977 no se registró el nombre del lugar donde se produjo y en los años 1974 y 1978 los lugares registrados son muy amplios y poco precisos.

Por otro lado, en la mortandad de 1988 no se han encontrado los registros de las fechas de inicio y final de la misma (Tabla 4).

Tabla 4. Número de animales muertos, fechas de inicio y final de las mortandades históricas.

Año	Nº animales muertos	Fecha de inicio	Fecha de final
1973	50.000	1-jul	15-nov
1974	15.000	1-jun	15-ago
1977	500	1-jun	15-ago
1978	70.000	15-ago	10-sep
1979	1.515	31-jul	27-ago
1985	2.426	27-jul	09-sep
1986	20.000	1-jul	01-nov
1987	4.074	19-jun	01-ago
1988	2.749	-----	-----
1990	2.139	15-ago	15-sep

1991	1.327	15-jun	01-jul
1997	594	22-sep	28-oct
2001	579	18-jul	31-jul

## 4.2 DATOS ACTUALES

### 4.2.1 Identificación y recuentos de cianobacterias

Los resultados obtenidos en la identificación de cianobacterias se han representado en los siguientes mapas (Anexo 1):

Mapa 1: Distribución de los puntos de muestreo de los datos actuales.

Mapa 2: Distribución de los puntos con presencia y ausencia de cianobacterias de los datos actuales.

Mapa 3: Distribución de las mortandades (datos históricos).

Los resultados obtenidos en la identificación de cianobacterias tóxicas en los puntos de muestreo se presentan a continuación (Tabla 5).

Tabla 5. Cianobacterias tóxicas encontradas en las localidades de muestreo

Localidad	Cianobacterias tóxicas
Canal del Cherry	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i> <i>Anabaena floss-aquae</i>
Caño del Guadiamar	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena circinalis</i>

Caño del Pescador	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Casa de Las Nuevas	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
Casa de Leo Biaggi	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i> <i>Anabaena floss-aquae</i>
Casa de Los Corros	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i> <i>Anabaena floss-aquae</i>
El Bolín	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena circinalis</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
La Rocina	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena floss-aquae</i>
Los Mimbrales	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Lucio de Los Ánsares	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
Marisma del Rocío	<i>Gomphosphaeria sp.</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena floss-aquae</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
Santa Olalla	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>

Presentamos en la Tabla 6 la abundancia de cianobacterias tóxicas en los puntos de muestreo, expresada como el recuento de colonias de cianobacterias tóxicas por mililitro.

Tabla 6. Abundancia de las distintas especies de cianobacterias identificadas en los lugares de muestreo.

Localidad	Abundancia (colonias/mL)				
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Anabaena circinalis</i>	<i>Pseudanabaena catenata</i>	<i>Anabaena floss-aquae</i>	<i>Gomphosphaeria sp.</i>
Santa Olalla	469	0	178	0	0
Canal del Cherry	62220	0	5100	2200	0
Caño del Guadiamar	493	88880	0	0	0
Caño del Pescador	296	0	0	0	0
Casa de Las Nuevas	13200	0	15660	0	0
Casa de Leo Biaggi	10770	0	5100	3000	0
Casa de Los Corros	8000	0	4220	550	0
El Bolín	177	0	422	0	0
El Bolín	373	0	0	0	0
La Rocina	727	337	0	337	0
Los Mimbrales	383	0	0	0	0
Lucio de Los Ánsares	3890	0	18300	0	0

Lucio de Los Ánsares	3300	0	12780	0	0
Lucio de Los Ánsares	13800	0	6660	0	0
Marisma del Rocío	0	0	0	0	978
Marisma del Rocío	157	0	0	0	0
Marisma del Rocío	586	0	0	88	0
Marisma del Rocío	397	0	168	0	0
Santa Olalla	469	0	178	0	0

En la siguiente tabla (Tabla 7) presentamos las fechas en las que surgieron cianobacterias tóxicas en las localidades de muestreo en el Periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).

Tabla 7. Fechas de aparición de especies de cianobacterias tóxicas presentes en las localidades de muestreo en el Periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).

Localidad	Fecha	Especies tóxicas más abundantes
La Rocina	Julio 2002	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena floss-aquae</i>
El Bolín	Junio 2002	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
El Bolín	Mayo 2002	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena circinalis</i>

Santa Olalla	Mayo 2002	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
Marisma del Rocío	Septiembre 2002	<i>Gomphosphaeria sp.</i>
Marisma del Rocío	Agosto 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena floss-aquae</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
Caño del Pescador	Agosto 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Caño del Guadiamar	Agosto 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena circinalis</i>
Los Mimbrales	Junio 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>
El Bolín	Mayo 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Marisma del Rocío	Mayo 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Marisma del Rocío	Septiembre 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>20 Junio 2004</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
<b>Canal del Cherry</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i> <i>Anabaena floss-aquae</i>
<b>Casa de Las Nuevas</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
<b>Casa de Los Corros</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i> <i>Anabaena floss-aquae</i>
<b>Casa de Leo Biaggi</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i> <i>Anabaena floss-aquae</i>

Lucio de Los Ánsares	5 Julio 2004	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>
Caño de Guadiamar	Junio 2005	<i>Anabaena circinalis</i>

Los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de las cianobacterias tóxicas identificadas en Doñana se presentan en la Tabla 8, resaltamos en negrilla los datos que coincidieron con periodos de mortandad.

Tabla 8. Abundancia de las cianobacterias tóxicas (colonias/ml) presentes en los lugares de muestreo y cianobacterias tóxicas más abundantes. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).

Localidad	Fecha	Especies tóxicas más abundantes	Abundancia (colonias/ml)
El Bolín	Mayo 2002	<i>Microcystis aeruginosa</i>	194
		<i>Anabaena circinalis</i>	356
Santa Olalla	Mayo 2002	<i>Microcystis aeruginosa</i>	469
		<i>Pseudanabaena catenata</i>	178
El Bolín	Junio 2002	<i>Microcystis aeruginosa</i>	177
		<i>Pseudanabaena catenata</i>	422
La Rocina	Julio 2002	<i>Microcystis aeruginosa</i>	727
		<i>Anabaena floss-aquae</i>	337
Marisma del Rocío	Sep 2002	<i>Gomphosphaeria sp.</i>	978
El Bolín	Mayo 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>	373

Marisma del Rocío	Mayo 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>	157
Los Mimbrales	Junio 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>	383
Caño del Pescador	Agosto 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>	296
Caño del Guadamar	Agosto 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>	493
		<i>Anabaena circinalis</i>	128
Marisma del Rocío	Agosto 2003	<i>Microcystis aeruginosa</i>	586
		<i>Anabaena floss-aquae</i>	88
Marisma del Rocío	Agosto 2003	<i>Pseudanabaena catenata</i>	168
		<i>Microcystis aeruginosa</i>	397
Lucio de Los Ánsares	20 Junio 2004	<i>Microcystis aeruginosa</i>	3890
		<i>Pseudanabaena catenata</i>	18300
Lucio de Los Ánsares	29 Junio 2004	<i>Microcystis aeruginosa</i>	3300
		<i>Pseudanabaena catenata</i>	12780
Canal del Cherry	29 Junio 2004	<i>Microcystis aeruginosa</i>	62220
		<i>Pseudanabaena catenata</i>	5100
Canal del Cherry	29 Junio 2004	<i>Anabaena floss-aquae</i>	2200
		<i>Microcystis aeruginosa</i>	13200
Casa de Las Nuevas	29 Junio 2004	<i>Pseudanabaena catenata</i>	15660
		<i>Microcystis aeruginosa</i>	8000
Casa de Los Corros	29 Junio 2004	<i>Microcystis aeruginosa</i>	8000

		<i>Pseudanabaena catenata</i>	<b>4220</b>
		<i>Anabaena floss-aquae</i>	<b>550</b>
		<i>Microcystis aeruginosa</i>	<b>10770</b>
<b>Casa de Leo Biaggi</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<i>Pseudanabaena catenata</i>	<b>5100</b>
		<i>Anabaena floss-aquae</i>	<b>3000</b>
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>5 Julio 2004</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<b>13800</b>
		<i>Pseudanabaena catenata</i>	<b>6660</b>
<b>Caño de Guadamar</b>	<b>Junio 2005</b>	<i>Anabaena circinalis</i>	<b>88880</b>

En todos los recuentos realizados se obtuvieron unos valores de reproducibilidad del 87% y una repetibilidad del 84%, que aseguran que estos se han ajustado bien a los valores reales.

#### 4.2.2 Resultados de la determinación de clorofila a

En la Tabla 9 se presenta la concentración de clorofila ( $\mu\text{g/L}$ ) medida en los lugares de muestreo junto con la medida de abundancia de cianobacterias tóxicas expresada en colonias/mL.

Tabla 9. Abundancia (colonias/mL) y concentración de clorofila ( $\mu\text{g/L}$ ) de las cianobacterias tóxicas presentes en los lugares de muestreo en el Periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).

Localidad	Fecha	Abundancia (colonias/mL)	Clorofila ( $\mu\text{g/L}$ )
El Bolín	Mayo 2002	550	147
Santa Olalla	Mayo 2002	647	293

El Bolín	Junio 2002	599	99
La Rocina	Julio 2002	1064	693
Marisma del Rocío	Septiembre 2002	978	560
El Bolín	Mayo 2003	373	156
Marisma del Rocío	Mayo 2003	157	102
Los Mimbrales	Junio 2003	383	187
Caño del Pescador	Agosto 2003	296	104
Caño de Guadiamar	Agosto 2003	621	335
Marisma del Rocío	Agosto 2003	842	416
Marisma del Rocío	Septiembre 2003	397	163
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>20 Junio 2004</b>	<b>22190</b>	<b>738</b>
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>16080</b>	<b>534</b>
<b>Canal del Cherry</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>69520</b>	<b>3755</b>
<b>Casa de Las Nuevas</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>28860</b>	<b>2118</b>
<b>Casa de Los Corros</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>12770</b>	<b>2534</b>
<b>Casa de Leo Biaggi</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>18870</b>	<b>1930</b>

#### 4.2.3 Resultados de los análisis de nitratos y fosfatos

En la Tabla 10 se muestran los valores de nitratos y fosfatos obtenidos en los lugares de muestreo de Doñana que presentaron cianobacterias tóxicas.

Tabla 10. Concentración de nitratos (mg/L) y fosfatos (mg/L) obtenidos del agua en los lugares de muestreo en el periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).

Localidad	Fecha	Nitratos mg/L	Fosfatos mg/L
El Bolín	Mayo 2002	3.5	0.8
Santa Olalla	Mayo 2002	3.5	0.4
El Bolín	Junio 2002	3.1	0.7
La Rocina	Julio 2002	2.9	0.8
Marisma del Rocío	Sep 2002	4.0	0.7
El Bolín	Mayo 2003	3.6	0.5
Marisma del Rocío	Mayo 2003	3.1	0.8
Los Mimbrales	Junio 2003	2.8	0.3
Caño del Pescador	Agosto 2003	2.1	0.3
Caño del Guadamar	Agosto 2003	3.1	0.4
Marisma del Rocío	Agosto 2003	3.8	0.5
Marisma del Rocío	Septiembre 2003	2.7	0.3
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>20 Junio 2004</b>	<b>11.3</b>	<b>2.1</b>
<b>Canal del Cherry</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>16.4</b>	<b>3.1</b>
<b>Casa de Las Nuevas</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>15.3</b>	<b>2.2</b>
<b>Casa de Los Corros</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>12.8</b>	<b>2.8</b>
<b>Casa de Leo Biaggi</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>16.2</b>	<b>2.7</b>

#### 4.2.4 Resultados de los análisis para la medición de microcistina

Las mediciones de la concentración de microcistina-LR en todos los lugares de muestreo que presentaron cianobacterias tóxicas se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11. Concentraciones de microcistina-LR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de las cianobacterias recogidas durante los muestreos realizados en el periodo 2002-2005. (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).

Localidad	Fecha	Microcistina-LR( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
El Bolín	Mayo 2002	0.06
Santa Olalla	Mayo 2002	0.02
El Bolín	Junio 2002	0.02
La Rocina	Julio 2002	0.04
Marisma del Rocío	Septiembre 2002	0.01
Marisma del Rocío	Septiembre 2002	0.01
El Bolín	Mayo 2003	0.01
Marisma del Rocío	Mayo 2003	0.01
Los Mimbrales	Junio 2003	0.04
Caño del Pescador	Agosto 2003	0.06
Caño de Guadamar	Agosto 2003	0.14
Marisma del Rocío	Agosto 2003	0.26

Marisma del Rocío	Septiembre. 2003	0.05
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>20 Junio 2004</b>	<b>&gt; 10</b>
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>&gt; 10</b>
<b>Canal del Cherry</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>&gt; 15</b>
<b>Casa de Las Nuevas</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>&gt; 10</b>
<b>Casa de Los Corros</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>&gt; 10</b>
<b>Casa de Leo Biaggi</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>&gt; 10</b>

La medida de la concentración de microcistina-LR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) contenida en el ventrículo de los animales muertos en el curso de la mortandad producida en junio de 2004 se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración de microcistina-LR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el contenido ventricular de los cadáveres recogidos durante la mortandad de junio de 2004

Especies	Fecha de muestreo	Microcistina-LR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<i>Anas platyrhynchos</i>	29 junio 2004	393
<i>Anas platyrhynchos</i>	29 junio 2004	501
<i>Fulica atra</i>	29 junio 2004	269
<i>Himantopus himantopus</i>	29 junio 2004	367
<i>Larus ridibundus</i>	29 junio 2004	292
<i>Larus ridibundus</i>	29 junio 2004	340

<i>Philomachus pugnax</i>	29 junio 2004	105
<i>Platalea leucorodia</i>	29 junio 2004	170
<i>Podiceps cristatus</i>	29 junio 2004	132
<i>Tringa totanus</i>	29 junio 2004	712

La medida de la concentración de microcistina-LR ( $\mu\text{g/mL}$ ) contenida en el hígado de los animales afectados, incluidos los hígados de los peces muertos hallados en el curso de esta misma mortandad, en junio de 2004 se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentración de toxina medida en los hígados de las aves y peces muertos muestreados de la mortandad de julio de 2004.

Especies	Microcistina-LR en hígado ( $\mu\text{g/g}$ )
<i>Anas platyrhynchos</i>	34,3
<i>Anas platyrhynchos</i>	32,5
<i>Anas platyrhynchos</i>	26,6
<i>Fulica atra</i>	75,9
<i>Larus ridibundus</i>	37,4
<i>Larus ridibundus</i>	31,5
<i>Podiceps cristatus</i>	53,2
<i>Tringa totanus</i>	25,7
<i>Himantopus himantopus</i>	28,4

<i>Philomachus pugnax</i>	72,4
<i>Mugil cephalus</i>	48,7
<i>Ciprinus carpio</i>	39,1

En todas las detecciones de microcistina los valores de repetibilidad fueron del  $97,82 \% \pm 0,48$ ; , los de reproducibilidad del  $96,73 \%$  y la precisión fue de  $0,012$  ppm.

#### 4.2.5 Resultados de los análisis para la medición de la toxina PSP

En la mortandad sucedida en junio de 2005 se procedió a analizar las concentraciones de saxitoxina en estas cianobacterias.

Las concentraciones de saxitoxina obtenidas fueron de  $6,38$  ppb en el agua y de  $2,2$  ppb en el hígado de los peces.

#### 4.2.6 Resultado del bioensayo en ratón

Los resultados obtenidos en los bioensayos en ratón, realizados unicamente en los puntos de muestreo en los que se encontraron cianobacterias tóxicas, se exponen en la Tabla 14.

Tabla 14. Bioensayos en ratón realizados con las muestras recogidas en los puntos de muestreo (3+ tres ratones muertos en 24 horas; 2+ dos ratones muertos en 24 horas; 1+ un ratón muerto en 24 horas; y 0 cuando los tres ratones estaban vivos a las 24 horas postinyección) (Resaltado en negrilla aparecen los datos que correspondieron con mortandad de fauna salvaje).

Localidad	Fecha	Resultado
El Bolín	Mayo 2002	0+
Santa Olalla	Mayo 2002	0+

El Bolín	Junio 2002	0+
La Rocina	Julio 2002	0+
Marisma del Rocío	Septiembre 2002	0+
El Bolín	Mayo 2003	0+
Marisma del Rocío	Mayo 2003	0+
Los Mimbrales	Junio 2003	0+
Caño del Pescador	Agosto 2003	0+
Caño de Guadiamar	Agosto 2003	0+
Marisma del Rocío	Agosto 2003	0+
Marisma del Rocío	Septiembre 2003	1+
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>20 Junio 2004</b>	<b>3+</b>
<b>Lucio de Los Ánsares</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>3+</b>
<b>Canal del Cherry</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>3+</b>
<b>Casa de Las Nuevas</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>3+</b>
<b>Casa de Los Corros</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>3+</b>
<b>Casa de Leo Biaggi</b>	<b>29 Junio 2004</b>	<b>3+</b>
<b>Caño de Guadiamar</b>	<b>Junio de 2005</b>	<b>3+</b>

Los resultados de los bioensayos en ratón con los contenidos ventriculares de los animales muertos en los distintos casos de mortandad estudiados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados de los bioensayos en ratón realizados con el contenido de los ventrículos de los cadáveres de aves necropsiadas.

Especies	Fecha de muestreo	Resultados
<i>Anas platyrhynchos</i>	29 junio 2004	3+
<i>Anas platyrhynchos</i>	29 junio 2004	3+
<i>Platalea leucorodia</i>	29 junio 2004	3+
<i>Fulica atra</i>	29 junio 2004	3+
<i>Larus ridibundus</i>	29 junio 2004	3+
<i>Larus ridibundus</i>	29 junio 2004	3+
<i>Podiceps cristatus</i>	29 junio 2004	3+
<i>Himantopus himantopus</i>	29 junio 2004	3+
<i>Philomachus pugnax</i>	29 junio 2004	3+
<i>Tringa totanus</i>	29 junio 2004	3+
<i>Anser anser</i>	29 octubre 2004	0+
<i>Anas platyrhynchos</i>	29 octubre 2004	0+
<i>Anas clypeata</i>	4 noviembre 2004	0+
<i>Anas platyrhynchos</i>	4 noviembre 2004	0+
<i>Anas platyrhynchos</i>	4 noviembre 2004	0+
<i>Anas platyrhynchos</i>	4 noviembre 2004	0+

#### 4.2.7 Mortandades surgidas en el periodo actual

##### Mortandad de junio de 2004:

Una gran proliferación de cianobacterias surgió en el Canal del Cherry, en la laguna de Los Ánsares y en las charcas aledañas de Los Corros, Las Nuevas y Leo Biaggi (Doñana). Esta proliferación formó una capa opaca en la superficie del agua y espuma en las orillas protegidas del viento. En poco tiempo aparecieron en la misma zona cientos de peces (fundamentalmente carpas y lisas de todos los tamaños) y miles de aves muertas. Esta mortandad en masa acabó a principios de septiembre y se calcula que afectó a más de 5.500 aves de 47 especies distintas (Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales, Estación Biológica de Doñana, CSIC).

En la mortandad de junio de 2004 los hallazgos de necropsia generales consistieron en la presencia de equimosis hepáticas, pulmones congestivos y, en ocasiones, hemorrágicos y el intestino y la cloaca llenos de contenido fecal. La mayoría de los animales necropsiados mostraban una buena condición corporal, a excepción de las limícolas que presentaron todos distintos grados de caquexia.

##### Mortandad de octubre de 2004:

En octubre de 2004 comenzó una mortandad de aves acuáticas en el Lucio del Lobo y en Veta de la Palma. La aparición de cadáveres se produjo fundamentalmente del 18-10-04 al 10-11-04 (Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales, Estación Biológica de Doñana, CSIC). En el agua de estas localidades no se apreció, a simple vista, la existencia de proliferaciones de microorganismos fotosintéticos. Esta mortandad afectó a unas 160 aves de 19 especies distintas. En Veta de la Palma la especie más afectada fue el Pato Cuchara (*Anas clypeata*).

En la mortandad de octubre de 2004 los hallazgos de necropsia más significativos siguieron dos patrones. Por un lado, los animales procedentes de Veta de la Palma mostraban petequias en el epicardio, lesiones blanquecinas multifocales en el hígado, enteritis con un contenido espeso y amarillento y un coágulo lardáceo en el corazón, presentando todos ellos, no obstante, una buena condición corporal. Por el contrario, los animales procedentes del Lucio del Lobo mostraban una mala condición corporal, careciendo, incluso, de grasa subdérmica; además, en algunas de las

placas radiográficas, se vieron imágenes radiodensas sugestivas de ser plomo, aspecto que fue confirmado al examinar el contenido del ventrículo.

### Mortandad de junio de 2005

En Junio de 2005 se produjo la aparición de una proliferación monoespecífica de *Anabaena circinalis*, así como unas 30 Tm de peces muertos en el Caño del Guadiamar, Parque Natural de Doñana. Durante la inspección de la zona se apreció una coloración azul verdosa del agua, que sugería que la proliferación estaba formada por cianobacterias. La mortandad en masa de peces acabó en tres días.

En este caso no realizó el estudio de las necropsias porque la velocidad de autólisis que se produce en los órganos de los peces es muy rápida y no los permite valorar (Noga, 2000).

Como ya se ha indicado, durante las necropsias se procedió a la inspección del contenido de los ventrículos. Los resultados se reflejan en la Tabla 16.

Tabla 16. Contenidos de los ventrículos de los cadáveres recogidos durante las mortandades de aves de 2004.

Especies	Fecha de necropsia	Contenido de ventrículos
<i>Anas platyrhynchos</i>	29 Junio 2004	<i>M. aeruginosa</i> (> 105 col/mL), semillas , fragmentos vegetales, algas verdes filamentosas
<i>Anas platyrhynchos</i>	29 Junio 2004	<i>M. aeruginosa</i> (> 105 col/mL), semillas , fragmentos vegetales
<i>Platalea leucorodia</i>	29 Junio 2004	<i>M. aeruginosa</i> (> 105 col/mL), algas, zooplancton, insectos
<i>Fulica atra</i>	29 Junio 2004	<i>M. aeruginosa</i> (> 105 col/mL), semillas, fragmentos vegetales

<i>Larus ridibundus</i>	29 Junio 2004	Restos peces, crustáceos
<i>Larus ridibundus</i>	29 Junio 2004	Restos peces
<i>Podiceps cristatus</i>	29 Junio 2004	Restos peces
<i>Himantopus himantopus</i>	29 Junio 2004	Restos peces, insectos y zooplancton
<i>Philomachus pugnax</i>	29 Junio 2004	<i>M. aeruginosa</i> ( $\approx 103$ col/mL) Zooplancton, peces,
<i>Tringa totanus</i>	29 Junio 2004	Restos zooplancton
<i>Anser anser</i>	29 octubre 2004	Porción plomo, fragmentos vegetales
<i>Anas platyrhynchos</i>	29 octubre 2004	Fragmentos vegetales
<i>Anas clypeata</i>	4 noviembre 2004	Fragmentos vegetales
<i>Anas platyrhynchos</i>	4 noviembre 2004	Fragmentos vegetales
<i>Anas platyrhynchos</i>	4 noviembre 2004	Fragmentos vegetales
<i>Anas platyrhynchos</i>	4 noviembre 2004	Fragmentos vegetales

### 4.3 RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 4.3.1 Análisis de datos históricos

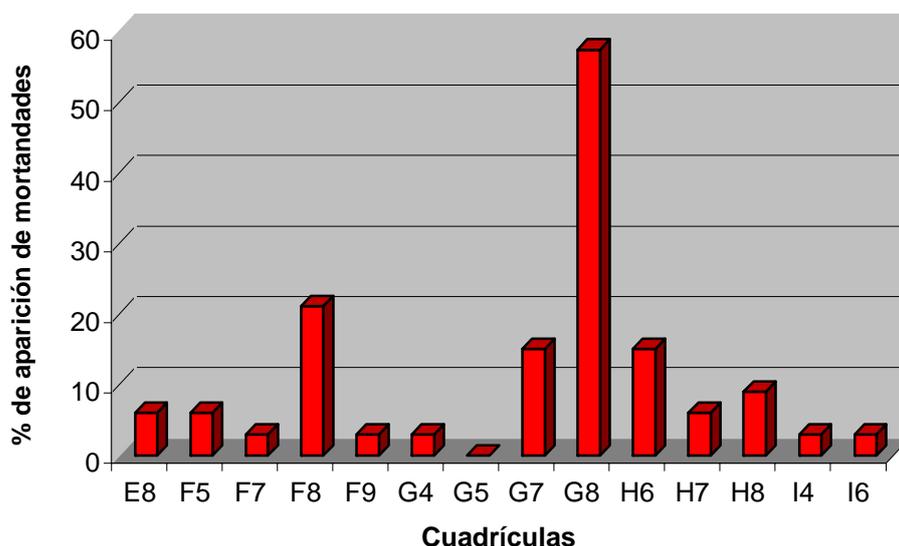
##### 4.3.1.1 Estudio de la probabilidad de aparición de mortandades masivas en Doñana

La probabilidad de aparición de una mortandad masiva, es de 0,4545 (45,45 % anual).

## 4.3.1.2 Estudio de la distribución espacial de las mortandades masivas ocurridas en Doñana

La localización de los resultados obtenidos de la distribución espacial de las mortandades masivas del rango de años que se va de 1969 a 2001 se puede ver en el mapa 3 y la distribución de frecuencias en la Figura 6.

Figura 6. Representación de las cuadrículas en las que surgieron mortandades (en porcentaje) en el periodo histórico.

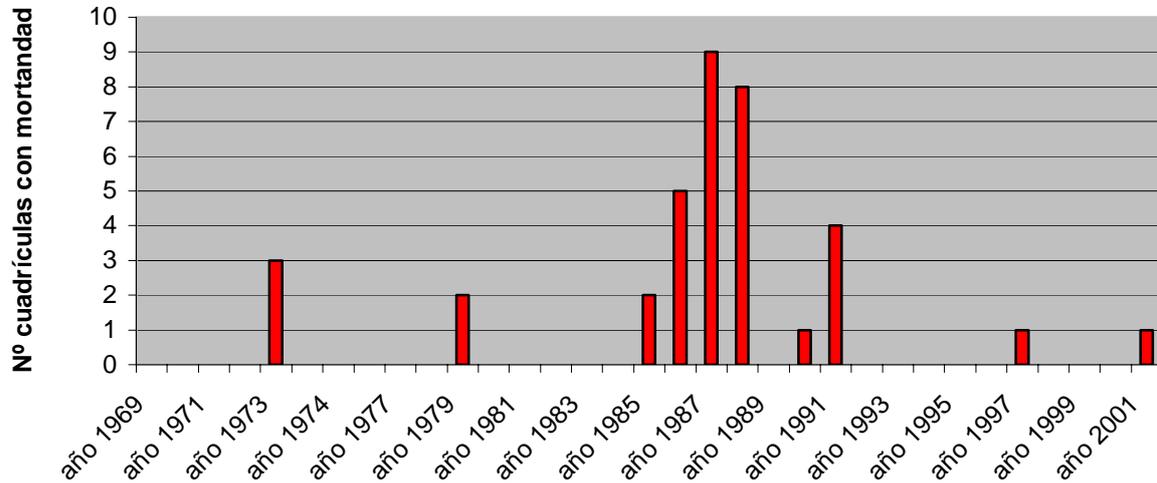


La distribución de las mortandades en las cuadrículas se produjo, claramente, de forma agregada. La mayor mortalidad se observó en la zona G8, estando afectadas en menor medida las cuadrículas E8, F5, F7, F8, F9, G4, G7, H6, H7, H8, I4 e I6.

## 4.3.1.3 Estudio de la distribución temporal de las mortandades masivas ocurridas en Doñana

En la Figura 7 representamos la distribución a lo largo de los años de estudio del número de cuadrículas donde se produjeron mortandades, que se vieron afectadas por alguna de las mortandades.

Figura 7. Representación del número de cuadrículas que se vieron afectadas por la aparición de alguna mortandad en cada año.

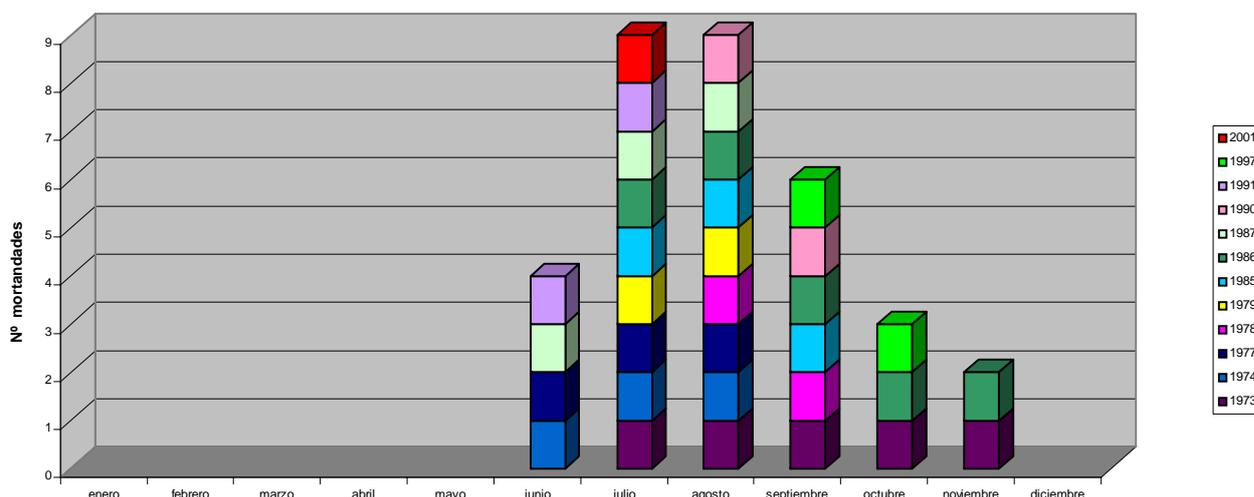


El periodo de tiempo entre 1985 y 1991 resultó ser el de mayor número de sucesos y en el que, además, se vieron afectadas un mayor número de cuadrículas.

#### 4.3.1.4 Estudio de la serie temporal de aparición de las mortandades masivas en Doñana valorando su estacionalidad.

En la Figura 8 se muestra el número de mortandades a lo largo de los meses, se indican en distintos colores los años en los que ocurrió el proceso. Se puede apreciar estadísticamente que existe una estacionalidad bastante marcada siendo los meses de junio, julio, agosto, septiembre y octubre los meses en los que se produjeron mortandades durante más de tres años.

Figura 8. Representación del número de mortandades que surgieron en cada mes a lo largo del periodo de estudio (datos históricos)



#### 4.3.2 Análisis de datos actuales

##### 4.3.2.1 Estudio de la probabilidad de aparición de mortandades masivas en Doñana

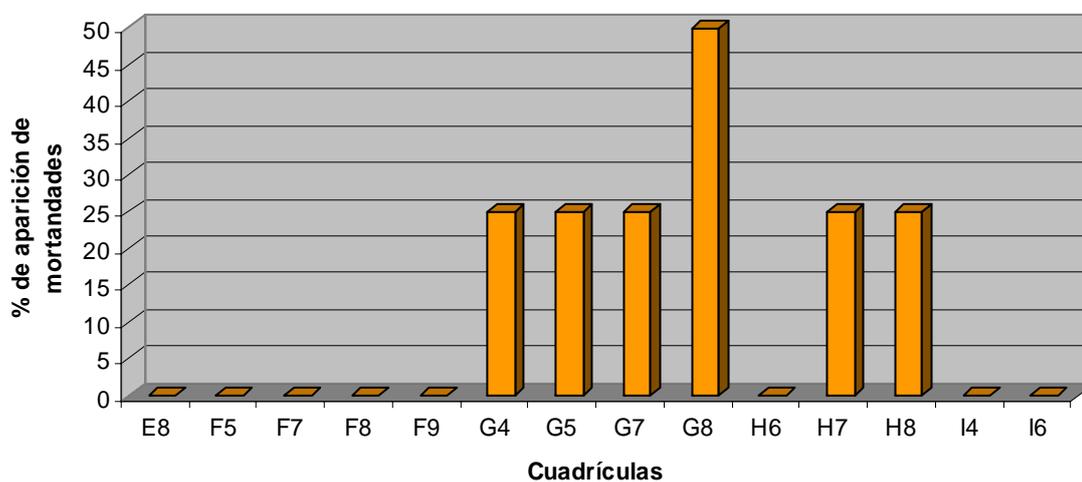
La probabilidad de aparición de una mortandad masiva, en este periodo, es de 0.75 (75% anual).

Puesto que se ha confirmado que dos de las tres mortandades aparecidas han sido provocadas por cianotoxinas calculamos también la probabilidad de aparición de mortandades masivas en Doñana provocadas por cianotoxinas que resultó ser de 0.5 (50% anual).

##### 4.3.2.2 Estudio de la distribución espacial de las mortandades masivas ocurridas en Doñana

Para poder valorar la distribución espacial de las mortandades masivas ocurridas en Doñana con los datos actuales, representamos las frecuencias de aparición de las mortandades (%), que se distribuyen en las cuadrículas (Figura 9)

Figura 9. Representación de las cuadrículas en las que surgieron mortandades (en porcentaje) en el periodo de datos actuales.

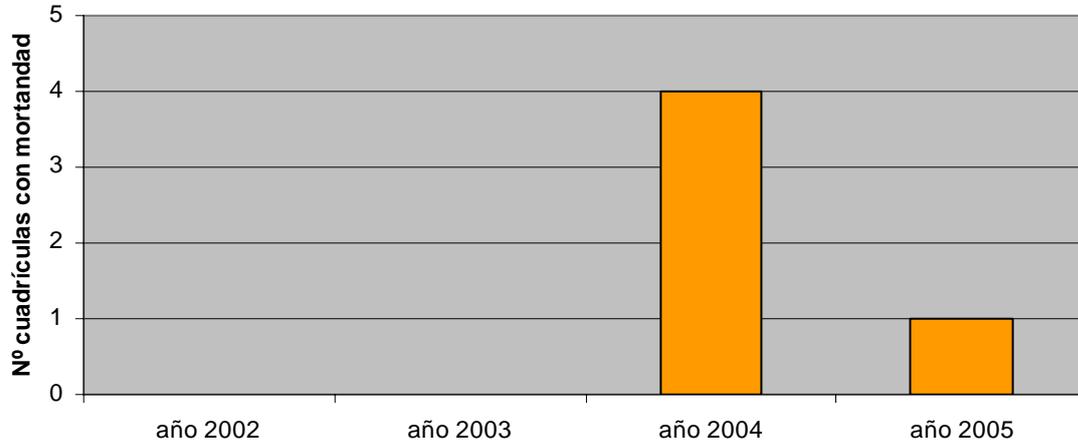


La distribución de las mortandades en las cuadrículas se produjo claramente de forma agregada.

#### 4.3.2.3 Estudio de la distribución temporal de las mortandades masivas ocurridas en Doñana.

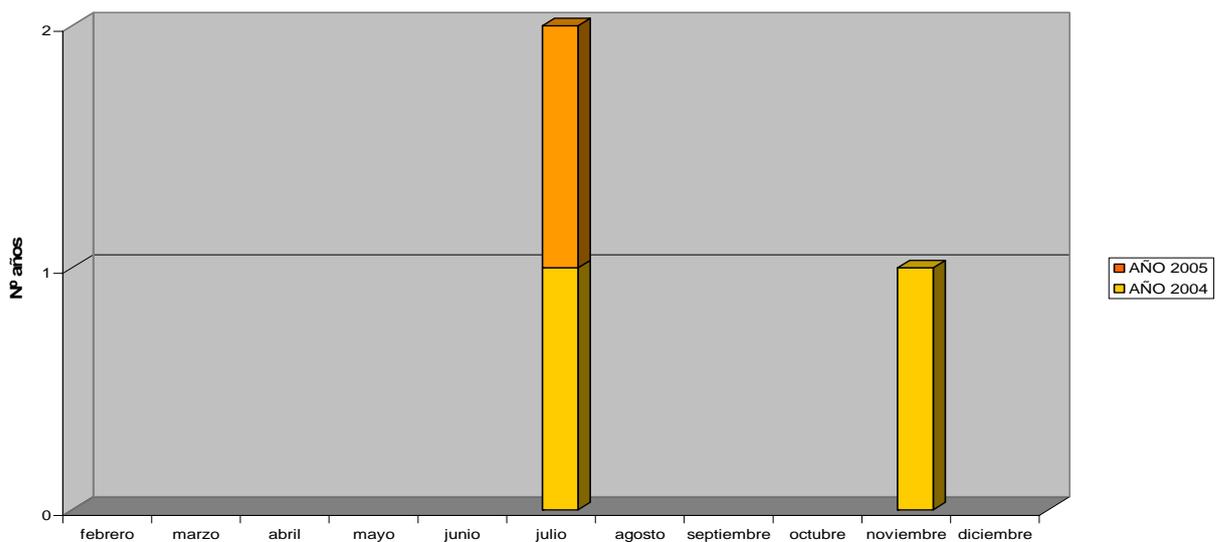
En la Figura 10 se recoge la distribución de las mortandades (número de cuadrículas) a lo largo de los años de estudio.

Figura 10. Representación del número de cuadrículas que se vieron afectadas por la aparición de alguna mortandad en cada año.



#### 4.3.2.4 Estudio de la serie temporal de aparición de las mortandades masivas en Doñana valorando su estacionalidad.

Figura 11. Representación del número de mortandades que surgieron en cada mes a lo largo del periodo de estudio (datos actuales).



### 4.3.3 Análisis detallado de datos actuales

#### 4.3.3.1 Estudio de la probabilidad de aparición de cianobacterias tóxicas en Doñana

La probabilidad de aparición de cianobacterias tóxicas, en este periodo, es del 75 % anual y del 52,63 % mensual.

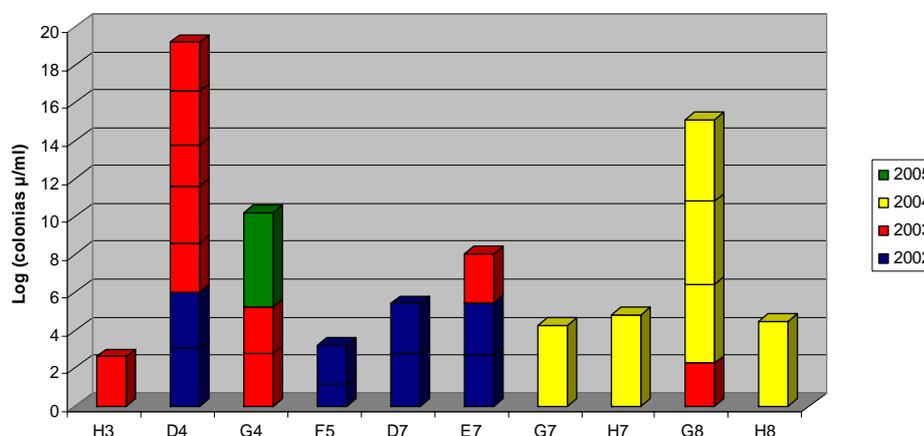
#### 4.3.3.2 Estudio de la probabilidad de aparición de cianotoxinas en Doñana

La probabilidad de aparición de cianotoxinas, en este periodo, es del 75 % anual y del 42,10 % mensual.

#### 4.3.3.3 Estudio de la distribución espacial y temporal de cianobacterias tóxicas en Doñana

La abundancia de cianobacterias tóxicas surgidas en Doñana (colonias  $\mu\text{/ml}$ ) en la distribución de cuadrículas se representa en la Figura 12. En el año 2002 aparecieron cianobacterias tóxicas en cuatro cuadrículas, en el año 2003 en cinco cuadrículas, en el año 2004 en cuatro cuadrículas y en el año 2005 en una sola cuadrícula

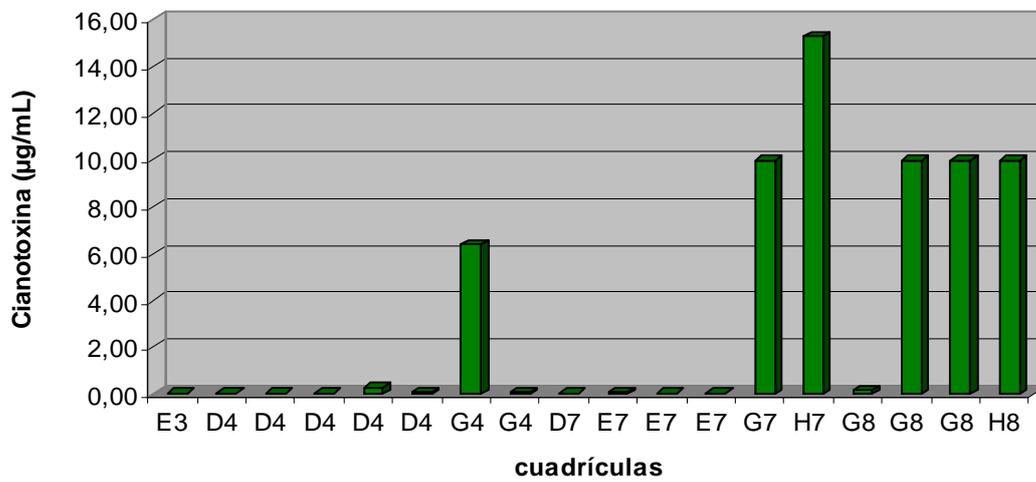
Figura 12. Logaritmo de la concentración de colonias de cianobacterias surgidas en la distribución de cuadrículas UTM de 5 x 5 km



4.3.3.4 Estudio de la distribución espacial de cianotoxinas en Doñana

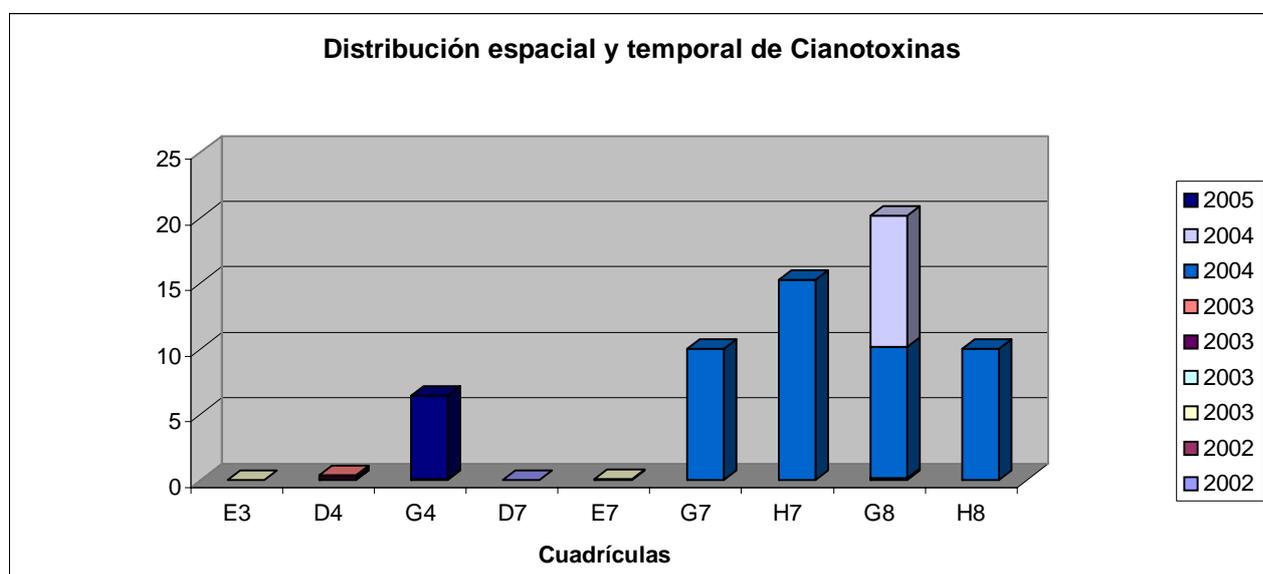
En la Figura 13 están representadas las concentraciones de cianotoxinas aparecidas en las cuadrículas durante los muestreos. Aparecieron cianotoxinas en nueve de las cuadrículas pero las concentraciones son muy bajas salvo en seis ocasiones.

Figura 13. Concentración de cianotoxinas por cuadrícula de aparición (datos actuales)



La distribución espacial y temporal de las cianotoxinas se muestran en la Figura 14 . Se puede ver que en el año 2004 el número de cuadrículas afectadas fue de cuatro mientras que en 2005 solo afectó a una.

Figura 14. Distribución espacial y temporal de cianotoxinas en los distintos muestreos realizados



#### 4.3.4 Estudio de los datos estadísticos obtenidos

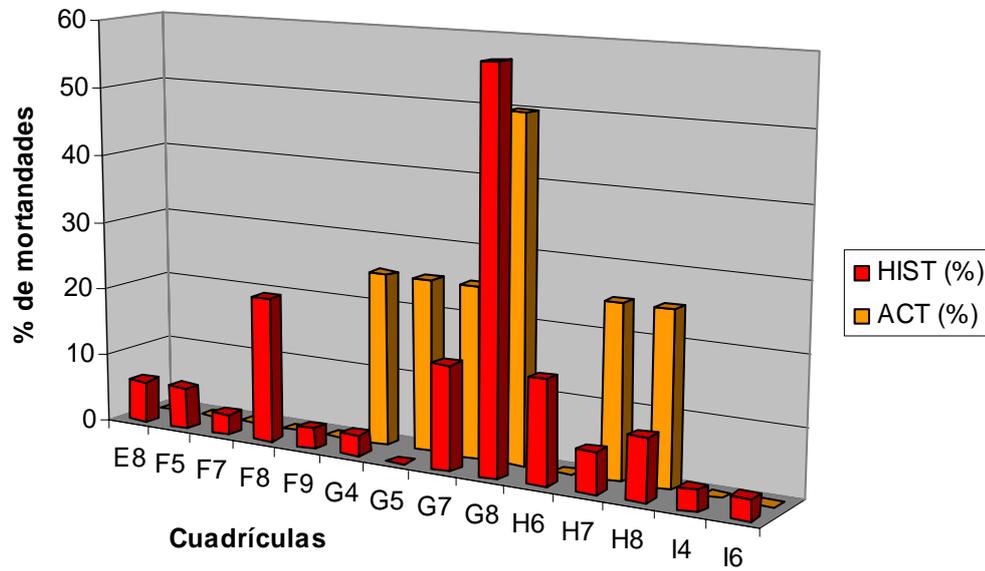
##### 4.3.4.1 Comparación de datos históricos y datos actuales

Los datos obtenidos, tanto los históricos como los datos actuales, no siguen una distribución normal.

Al analizar conjuntamente los datos obtenidos vemos que no existen diferencias estadísticas en la probabilidad de aparición de mortandades históricas y actuales ( $p > 0,05$ ).

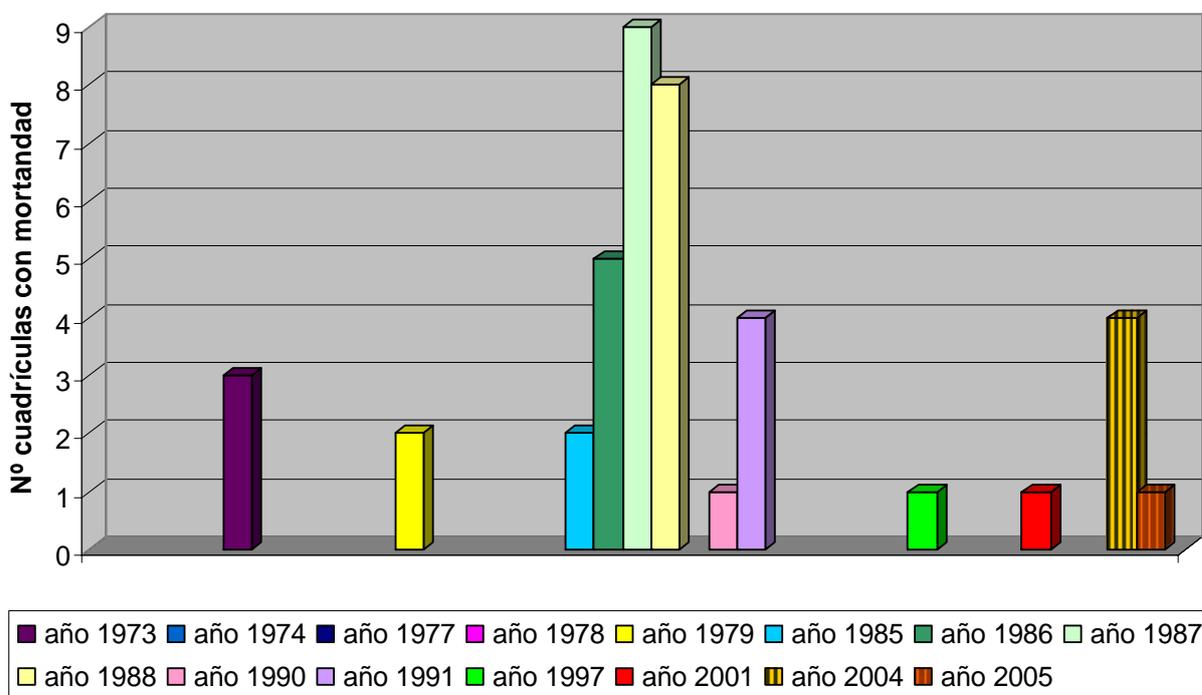
La distribución espacial de las mortandades históricas y la de las actuales (Figura 15) han surgido siempre en las mismas cuadrículas, siendo las cuadrículas G7 y G8 en las que se ha producido el porcentaje más alto en ambos periodos.

Figura 15. Porcentaje de aparición de mortandades (datos históricos y actuales) en cada cuadrícula a lo largo de todo el periodo de estudio



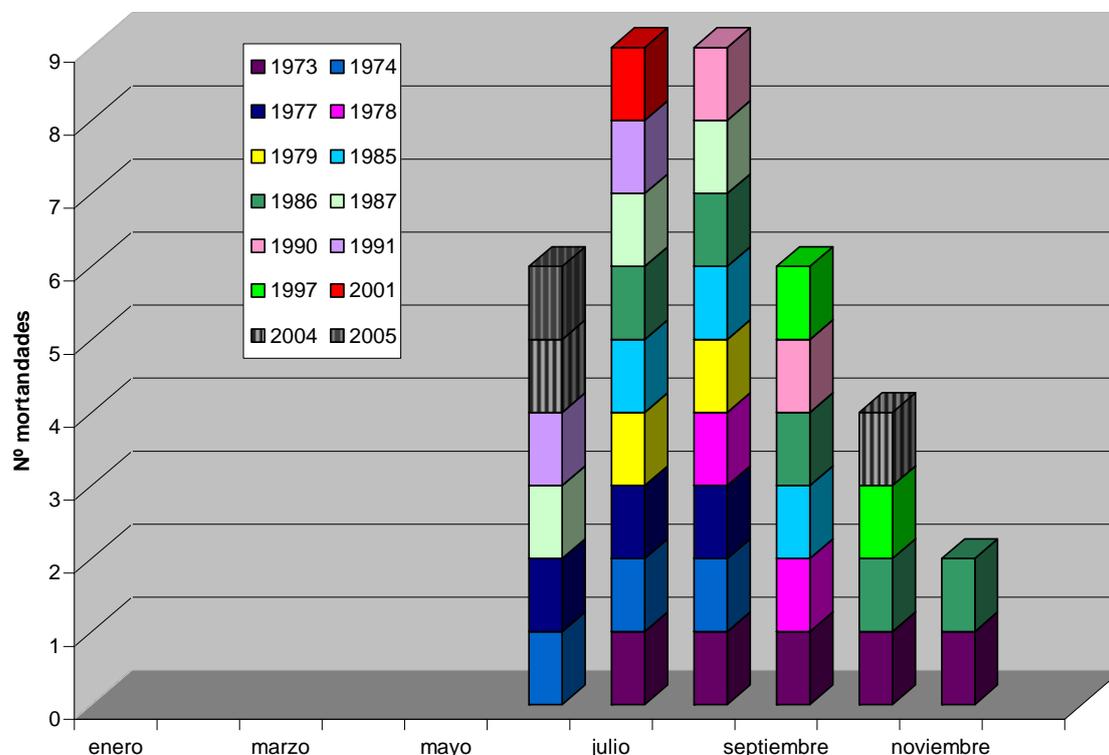
la Figura 16 recoge el conjunto de los datos históricos y los datos actuales. El número de cuadrículas afectadas es variable.

Figura 16. Número de cuadrículas afectadas por una mortandad a lo largo del periodo de estudio (datos históricos y actuales)



la Figura 17 muestra la evolución mensual de la aparición de mortandades, existiendo una marcada presencia estacional ( $p < 0,005$ ) como se puede apreciar en la Tabla 17 que recoge los valores del análisis estadístico con todos los datos obtenidos de las mortandades históricas y de las mortandades actuales mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney, en general, podemos indicar que se observan diferencias significativas ( $< 0,05$ ) con el resto de los meses del año. Debiendo señalar que también se ven diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el mes de noviembre y julio y agosto, además de, entre el mes de diciembre y junio, julio, agosto y septiembre.

Figura 17. Número de mortandades que surgieron en cada mes a lo largo del periodo de estudio (datos históricos y actuales)



Este comportamiento, en general, nos indica un claro componente estacional centrado en los meses de junio a septiembre con algunos focos esporádicos en octubre y noviembre.

Tabla 17. Comparación estadística (U de Mann-Whitney) entre los meses en los que han aparecido mortandades en datos históricos y actuales (en negrilla los valores significativos,  $p < 0,05$ ).

	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic
<b>ene</b>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	<b>0,041</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,011</b>	0,079	0,154	1,000
<b>feb</b>		1,000	1,000	1,000	1,000	<b>0,041</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,011</b>	0,079	0,154	1,000
<b>mar</b>			1,000	1,000	1,000	<b>0,041</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,011</b>	0,079	0,154	1,000

<b>abr</b>	1,000	<b>0,041</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,011</b>	0,079	0,154	1,000
<b>may</b>		<b>0,041</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,011</b>	0,079	0,154	1,000
<b>jun</b>			0,129	0,129	0,499	0,693	0,398	<b>0,041</b>
<b>jul</b>				1,000	0,389	0,060	<b>0,023</b>	<b>0,001</b>
<b>ago</b>					0,389	0,060	<b>0,023</b>	<b>0,001</b>
<b>sep</b>						0,289	0,137	<b>0,011</b>
<b>oct</b>							0,646	0,079
<b>nov</b>								0,154
<b>dic</b>								

#### 4.3.4.2 Estadística y análisis detallado de los datos actuales obtenidos

Realizamos un test de Spearman para las variables mortandad, colonias, toxinas, nitratos, fosfatos, clorofila, cuadrícula, año y mes, quedando reflejado el resultado en la Tabla 18.

Tabla 18. Comparación estadística (test de Spearman) entre los parámetros presencia de mortandad, número de colonias, concentración de nitratos, concentración de fosfatos, concentración de clorofila y cuadrícula en la que se produce (en negrilla los valores significativos,  $p < 0,05$ ).

	<b>mortandad</b>	<b>colonias</b>	<b>toxinas</b>	<b>nitratos</b>	<b>fosfatos</b>	<b>clorofila</b>	<b>cuadrícula</b>
<b>mortandad</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,074	<b>0,000</b>	0,088	
<b>colonias</b>		<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,030</b>	
<b>toxinas</b>			<b>0,028</b>	0,793	<b>0,009</b>	<b>0,000</b>	
<b>nitratos</b>				<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,086	
<b>fosfatos</b>					<b>0,006</b>	0,227	
<b>clorofila</b>						0,915	
<b>cuadrícula</b>							

Los parámetros relacionados quedan resaltados en negrilla.

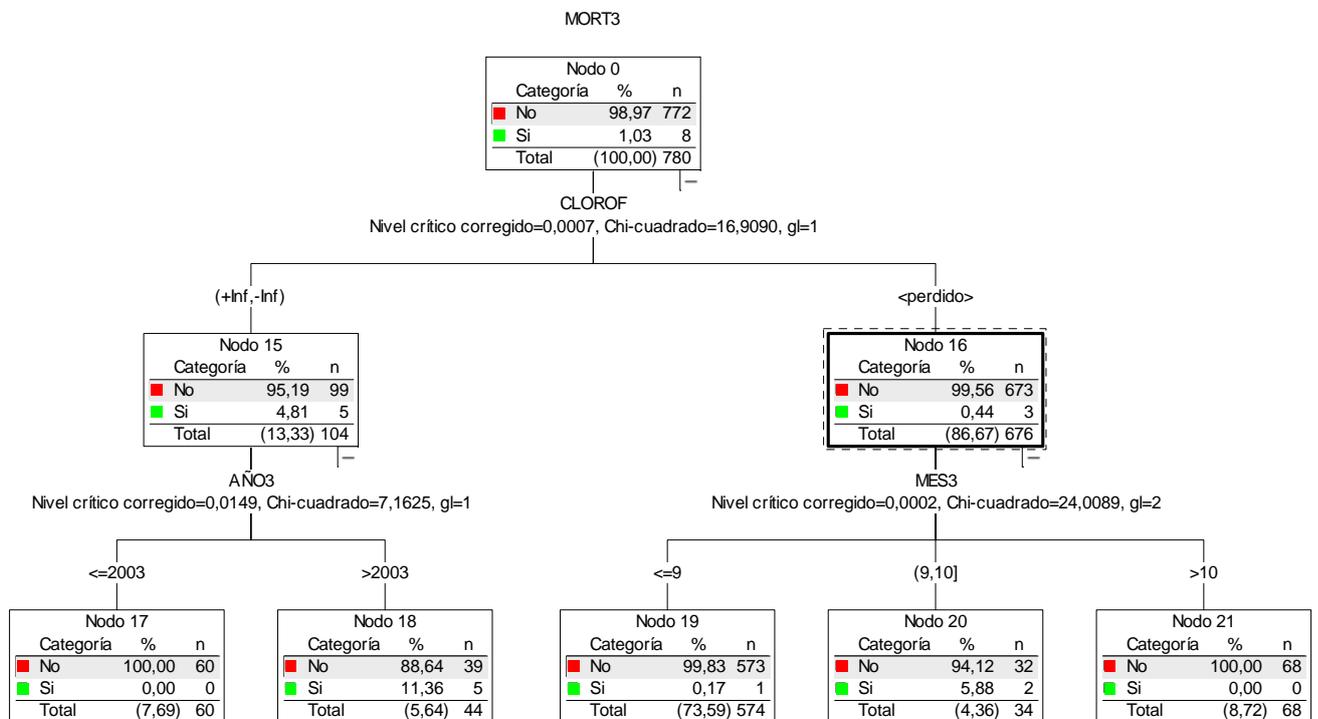
Los resultados que se muestran en la Tabla 18 indican que existe una elevada correlación (estadísticamente significativa) entre los siguientes parámetros:

- Mortandad con las colonias toxinas, nitratos y clorofila
- Colonias con las toxinas nitratos, fosfatos, clorofila y distribución en cuadrículas
- Toxinas con clorofila y distribución en cuadrículas
- Nitratos con fosfatos y clorofila

- Fosfatos con clorofila

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos, tras la realización de un árbol de decisiones, que indican que la clorofila es el valor de mayor significación (0,0007) en la aparición de mortandades. Teniendo en cuenta que tanto los nitratos ( $p= 0,0008$ ) como el mes ( $p= 0,007$ ) y el año ( $p= 0,01$ ) están incluidos como valor predictor.

Figura 18. Árbol de decisiones, por el que se establece el parámetro que más influye en la aparición de mortandades de entre los estudiados (número de colonias, concentración de nitratos, concentración de fosfatos, concentración de clorofila, cuadrícula, mes, año y concentración de toxina).



## 5. DISCUSIÓN

Aunque la primera cita científica sobre una mortandad de fauna salvaje producida por cianotoxinas fue publicada en el siglo XIX (Francis, 1878), sólo recientemente se ha empezado a considerar la implicación de las cianobacterias en este tipo de sucesos. Así, Matsunaga *et al.* (1999) establecen una relación entre la aparición en Japón de anátidas salvajes muertas y una proliferación de cianobacterias. Park *et al.* (2001) asocian las grandes mortandades de aves acuáticas que se han estudiado en el Lago Pakowki, en Canada, a la presencia de cianobacterias y Krienitz *et al.* (2003) relacionan las cianobacterias con las misteriosas muertes de Flamenco Enano (*Phoeniconaias minor*) ocurridas en Kenia. Alonso-Andicoberry *et al.* (2002) describieron la primera mortandad de aves salvajes provocada por cianotoxinas en la marisma de Doñana donde murieron, al menos, 579 pollos de Flamenco Común (*Phoenicopterus roseus*) y varias especies de anátidas. Los resultados de este trabajo indican por vez primera la relación causa-efecto existente entre las cianobacterias tóxicas y una mortandad de fauna salvaje producida en Doñana.

Uno de los objetivos principales de esta tesis es demostrar que el suceso descrito por Alonso-Andicoberry *et al.* (2002) no representa un hecho aislado y casual sino, por el contrario, que las proliferaciones de cianobacterias son una circunstancia frecuente e, incluso, predecible que explica, cuanto menos, una buena parte de las mortandades de fauna salvaje ocurridas en Doñana.

Las cianobacterias identificadas en la campaña de muestreos pertenecen a las siguientes especies: *Microcystis aeruginosa*, *Pseudanabaena catenata*, *Anabaena floss-aquae*, *Anabaena circinalis* y *Gomphosphaeria sp.*, siendo *Microcystis aeruginosa* la especie más frecuentemente detectada, concretamente en 19 de los 39 puntos de muestreo (48%). Este dato está en consonancia con lo encontrado en la bibliografía, que indica que es *Microcystis aeruginosa* la especie de cianobacteria tóxica más ampliamente distribuida en el mundo (Rabouille *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2005).

Por otra parte, el lugar que ofreció una mayor diversidad fue la Marisma del Rocío, donde se aislaron cuatro especies: *Gomphosphaeria sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena floss-aquae* y *Pseudoanabaena catenata*.

Los géneros de cianobacterias tóxicas que muestran una amplia distribución espacial en el entorno de Doñana son *Microcystis*, *Anabaena* y *Pseudanabaena* y su presencia se produce en muchas ocasiones con elevadas densidades aportando, por tanto, grandes cantidades de producción primaria al ecosistema.

Al estudiar en conjunto la distribución temporal de aparición de mortandades de los datos obtenidos, históricos y actuales, vemos que en ambos periodos el número de cuadrículas afectadas por una mortandad es variable. Sin embargo, al analizar la serie temporal de aparición de mortandades podemos concluir que se produce una marcada estacionalidad.

Este hecho queda demostrado porque entre los meses de junio, julio, agosto y septiembre hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al compararlos con los meses de enero, febrero, marzo, abril y mayo. También se ven diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el mes de noviembre y los meses de julio y agosto, así como entre el mes de diciembre y los meses de junio, julio, agosto y septiembre.

Este comportamiento, en general, nos indica un claro componente estacional centrado en los meses de junio a septiembre, con algunos focos esporádicos en octubre y noviembre. La explicación a estos resultados es que son los meses de junio a septiembre cuando se dan las condiciones más adecuadas para las floraciones de cianobacterias (Mur *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2002; Bonnet y Poulin, 2004; Domingues *et al.*, 2005) pero, aunque las cianobacterias aparecen normalmente al final de la sucesión ecológica en los periodos estivales (Rocha *et al.*, 2002; Domingues *et al.*, 2005), debe tenerse en cuenta que pueden aparecer también en periodos más adversos, como el invierno, si las condiciones de temperatura del agua lo permiten.

Todas las cianobacterias encontradas en los muestreos son capaces de producir potentes toxinas (Lawton *et al.*, 1999). La toxicidad que generan está directamente relacionada con su tipología pero también con la abundancia de colonias que presentan (Falconer *et al.*, 1999), de forma que para que las cianotoxinas sean capaces de provocar mortandades en Doñana su abundancia ha de ser elevada.

Existe una coincidencia entre los máximos niveles de abundancia de cianobacterias y la aparición de la mortandad de Junio de 2004, llegando, incluso, a registrarse una abundancia tan elevada como

la que se produjo en el Canal del Cherry, que alcanzó 62.220 colonias/mL de *Microcystis aeruginosa*. Existe una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) que indica que la presencia de mortandades está correlacionada con la abundancia de cianobacterias y con la concentración de cianotoxinas.

Es importante señalar que la abundancia de las cianobacterias se ha estimado para este trabajo mediante el recuento de colonias por mililitro, siendo un método preciso pero muy laborioso. La abundancia también se puede evaluar mediante la medición de la clorofila *a* en el agua, que es un método que ofrece menos precisión pero que es ampliamente aceptado para determinar una medida de biomasa, en especial cuando se producen proliferaciones de cianobacterias (Codd *et al.*, 1999; Lawton *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005). Este último método, no obstante, también se ha utilizado en este trabajo, lo que nos permite observar las correlaciones de ambos métodos.

Un test de Spearman muestra una correlación significativa ( $p \leq 0,001$ ) entre la abundancia de cianobacterias y la concentración de clorofila *a* medida en el agua. Por lo tanto, la abundancia de las cianobacterias también la podemos estimar mediante los niveles de clorofila *a* presentes en el agua, lo que refuerza la validez de este método para ser empleado como indicador rápido y eficaz de la abundancia de colonias de cianobacterias en Doñana y otros espacios naturales tal como está descrito por Codd *et al.* (1999) y Lawton *et al.* (1999).

En general, cuando coinciden concentraciones de cianobacterias productoras de espuma y valores de clorofila *a* por encima de 50  $\mu\text{g/L}$  se establecen alertas moderadas para el uso del agua, porque se considera que se ha producido una concentración de cianobacterias suficientemente grande como para que, si producen toxina, puedan representar un problema ya que, al flotar, el viento las concentra en las orillas. Cuando las cianobacterias no son productoras de espuma, el límite para establecer una concentración de cianobacterias como peligrosa es de 200  $\mu\text{g/L}$  (Falconer *et al.*, 1999), es decir, unos valores 4 veces más altos ya que en este caso, al no producir espuma, el riesgo de exposición es menor.

Los máximos valores de clorofila *a* encontrados coinciden con la mortandad de julio de 2004, correspondiendo el valor medido más alto al agua del Canal del Cherry, con una concentración de clorofila de 3.755  $\mu\text{g/L}$ , indicando claramente un riesgo de toxicidad muy alto ya que, si existieran

cepas productoras de cianotoxinas, la concentración sería suficientemente grande como para provocar la muerte de los animales que las consumieran, como ocurrió en este caso.

Una gran abundancia de cianobacterias no implica que se produzcan siempre cianotoxinas. De hecho, hay que tener en cuenta un aspecto de gran importancia ecológica, como es el aporte de las cianobacterias a la producción primaria de los ecosistemas acuáticos (Kirk, 1994; Falkowski & Raven, 1997). En Doñana, cuando surgen cianobacterias, las abundancias son en general bastante altas aportando, por tanto, gran cantidad de producción primaria al ecosistema.

Las cianobacterias tienen una gran capacidad de adaptación al medio ambiente pero también a distintos contaminantes antropogénicos (Costas *et al.*, 2001; López-Rodas *et al.*, 2001; Baos *et al.*, 2002; García-Villada *et al.*, 2002; García-Villada *et al.*, 2004; Altamirano *et al.*, 2004; Flores-Moya *et al.*, 2005). Debido a que las cianobacterias, junto con las algas, son los principales productores primarios de los ecosistemas acuáticos (Kirk, 1994; Falkowski & Raven, 1997), la capacidad de adaptación a los cambios ambientales bruscos es también un aspecto de gran importancia y relevancia ecológica.

La clorofila *a* es un parámetro que permite también valorar la producción primaria de los organismos acuáticos fotosintéticos, como las cianobacterias y el fitoplancton (Rejmánková y Komárková, 2005) y es, además, indicativo de la eutrofia del agua. En este sentido, se considera que los valores de clorofila *a* oscilan entre los 1-10 µg/L en aguas oligotróficas y los 300 µg/L en aguas hipereutróficas (Bartram *et al.*, 1999; Mur *et al.*, 1999).

Si seguimos estos valores para determinar la eutrofia, podemos observar que los valores de clorofila *a* de junio de 2004 (resaltado en negrilla) fueron los más elevados (Canal del Cherry 3.755 µg/L; Casa de los Corros 2.534 µg/L) por lo que, cuando se produjo la mortandad de peces y aves acuáticas, se puede indicar que el agua estaba hipereutrófica. No obstante, debe hacerse una precisión y es que, para obtener un valor real de eutrofización, el nivel de clorofila *a* se tiene que combinar con otros parámetros, como son el contenido de fósforo y de nitrógeno (Neal *et al.*, 2006).

Numerosos experimentos han demostrado, en el laboratorio y en el campo, el importante papel del fósforo y del nitrógeno en la dinámica de las poblaciones de los organismos fotosintéticos del agua,

tanto en lo que respecta a su biomasa como a la composición específica de las proliferaciones (Havens *et al.*, 2003; Roelke *et al.*, 2004; Domínguez *et al.*, 2005). La relación entre la disponibilidad y la demanda biológica hace que estos sean los elementos que principalmente regulan o limitan la productividad de los ecosistemas acuáticos (Margalef, 1982).

El nitrato es la forma principal del nitrógeno inorgánico que se encuentra en aguas naturales, ya que es altamente soluble y, además, es la forma más estable en aguas superficiales. Puesto que los nitratos estimulan el crecimiento de la vegetación acuática, los organismos acuáticos en un medio con elevada concentración de nitrato pueden alcanzar un crecimiento excesivo, degradando las condiciones ambientales al provocar un proceso de eutrofización (Margalef, 1982; Bartram *et al.*, 1999).

El fenómeno de eutrofización puede dar lugar a la aparición de proliferaciones de cianobacterias que, cuando mueren, aportan grandes cantidades de materia orgánica. Esta cantidad de materia, al mineralizarse, consume el oxígeno disuelto provocando la muerte de los peces por falta de oxígeno y liberando, a su vez, los fosfatos que se encontraban inmovilizados en los sedimentos oxidados creándose, en conjunto, un efecto de retroalimentación (Bartram *et al.*, 1999), puesto que la muerte de los peces también aumenta la carga de materia orgánica y provoca, en consecuencia, el incremento de los fosfatos.

De todas las formas posibles en las que el fósforo se encuentra en el agua, el ortofosfato disuelto representa la principal fuente para los microorganismos fotosintéticos (Muylaert *et al.*, 2006). Esto ha propiciado que en numerosos estudios limnológicos, principalmente en aquellos en los que se busca el análisis de las características tróficas, sea esta la forma más frecuentemente estudiada. Sin embargo, restricciones metodológicas relacionadas con la dificultad de distinguir analíticamente entre las distintas formas de oxidación del fósforo, con el umbral de detección de estas técnicas y con la capacidad descrita en algunas algas y cianobacterias para almacenar el fósforo en gránulos intracitoplasmáticos (gránulos de ortofosfato) (Mur *et al.*, 1999), han propiciado el incremento de los análisis del fósforo en su conjunto (total o disuelto) como principal indicador del estado trófico de un sistema acuático (Álvarez Cobelas *et al.*, 1991).

El fósforo puede estar presente en las aguas como una especie disuelta o particulada y, dado que es

un nutriente esencial para los vegetales, puede ser un factor limitante para su crecimiento según su concentración (Margalef, 1982; Rodríguez, 2004).

En Doñana se produce una correlación entre la abundancia de cianobacterias y la cantidad de nitratos y fosfatos presente en todos los lugares de muestreo donde se identificaron cianobacterias, tal y como Rejmánková y Komárková (2005) indican que se produce en las proliferaciones de cianobacterias.

Por otro lado, con los datos actuales también hemos encontrado una correlación entre la presencia de mortandades y la concentración de nitratos y clorofila. Además, podemos ver que la abundancia de cianobacterias (colonias/mL) está estadísticamente correlacionada con la concentración de toxinas, nitratos, fosfatos.

Cuando los niveles de nitratos en agua se muestran bajos, son las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno las que proliferan (Mur *et al.*, 1999) dejando fuera de competición al resto de los organismos fotosintéticos. Así que es el nitrógeno disuelto el elemento que permite explicar la dominancia de ciertos géneros o especies de cianobacterias (Codd *et al.*, 1999) y son los valores de fosfato los que permiten orientar sobre cuándo se va a producir un incremento de cianobacterias (Codd *et al.*, 1999).

Al realizar con nuestros datos un árbol de decisiones vemos que es la clorofila el valor de mayor significación (0,0007) en la aparición de mortandades aunque, tanto los nitratos ( $p= 0,0008$ ) como el mes ( $p= 0,007$ ) y el año ( $p= 0,01$ ), están incluidos como valores de predicción pero no muestra a los fosfatos como valor de significación, tal y como argumentan Codd *et al.* (1999).

Como ya se ha indicado, la identificación de cianobacterias y su cuantificación ofrecen una orientación sobre el riesgo de toxicidad de las aguas pero para saber si en las células muestreadas existen toxinas es necesario emplear métodos más objetivos (Codd *et al.*, 1999).

Los bioensayos en ratón son procedimientos que presentan algunas desventajas, como el hecho de ser métodos poco específicos que permiten detectar cualquier toxina pero no identificarla. Son,

además, poco sensibles, de forma que es necesaria una alta concentración de toxina para que pueda ser detectada. Finalmente, otra desventaja es su baja precisión (Harada *et al.*, 1999).

Aún así, los bioensayos en ratón están especialmente indicados en la detección de cianotoxinas por presentar una serie de ventajas. Por ejemplo, son procedimientos rápidos, permiten medir la toxicidad total y, además, detectar toxinas desconocidas que pudieran pasar desapercibidas utilizando otros métodos (Harada *et al.*, 1999). La validez de esta prueba permitió plantear bioensayos en ratón con las cianobacterias obtenidas de los distintos puntos de muestreo. Los resultados indican que las muestras obtenidas en el mes de junio de 2004 mostraron valores de cianotoxinas claramente positivos, es decir, en las cianobacterias existía una gran cantidad de toxinas. Las muestras en las que los bioensayos fueron positivos coinciden en el tiempo con la mortandad de junio de 2004.

Las microcistinas son las cianotoxinas más frecuentes en las aguas continentales (Huynh-Delermec *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Dado que la cianobacteria más abundante en las fechas en las que se produjo la mortandad de junio de 2004 era *Microcystis aeruginosa*, se realizaron mediciones de la concentración de microcistina-LR en todos los lugares de muestreo que presentaron cianobacterias tóxicas con la intención de dilucidar si era esta la toxina responsable de la mortandad.

Se puede ver que, aunque en todos los muestreos en los que se detectaron *Microcystis aeruginosa* se encontraron trazas de microcistina-LR, fue durante la mortandad de junio de 2004 cuando las concentraciones de microcistina alcanzaron valores muy elevados. La muestra del Canal del Cherry, que presentaba el recuento más alto de *Microcystis aeruginosa* (62.220 colonias/mL), contenía (15.3 µg/mL) de microcistina. Como referencia orientativa, cabe mencionar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que el nivel máximo de microcistina para el agua de consumo debe ser inferior a 1µg/L. Por tanto, en junio de 2004 los niveles de microcistina-LR eran 15.300 veces superiores a los señalados por la OMS.

En contraste con otros riesgos microbiológicos y toxicológicos, las apariciones de proliferaciones son, en muchas ocasiones, perceptibles a simple vista, facilitando su identificación (Codd *et al.*, 1999; Codd *et al.*, 2005). Los muestreos de cianobacterias siempre deberían ser complementados con una inspección visual del lugar ya que los datos que se obtienen podrían ser importantes en la

interpretación del muestreo realizado (Utkilen *et al.*, 1999).

En la inspección previa a la toma de muestras que se realizó durante el estudio de la mortandad de junio de 2004 se encontraron grandes cantidades de espuma concentradas en las orillas situadas a sotavento y que, por el color, sugerían ser cianobacterias. En el Lucio de Los Ánsares, Canal del Cherry, Casa de Las Nuevas, Casa de Los Corros y Casa de Leo Biaggi, se estimó que se había producido la muerte de 5.500 aves pertenecientes a 47 especies, incluyendo algunas en peligro de extinción como la Cerceta Pardilla (*Marmaronetta angustirostris*) y la Malvasía Cabeciblanca (*Oxyura leucocephala*). En el Canal del Cherry también aparecieron muertos peces de todos los tamaños (Memorias PND 2004, Informe Interno; Equipo de Seguimiento de la EBD). Por el contrario, en la inspección previa a la toma de muestras que se realizó durante el estudio de la mortandad de octubre de 2004, no se encontraron proliferaciones de ningún tipo en el agua. La especie más afectada en este caso fue el Pato Cuchara (*Anas clypeata*) y la mortandad se produjo a lo largo de dos meses en dos focos distintos: el Lucio del Lobo y Veta de la Palma (Equipo de Seguimiento de la EBD).

Ante cualquier suceso de mortandad la realización de necropsias es una herramienta imprescindible que permite siempre orientar el diagnóstico. En las mortandades estudiadas (junio de 2004 y octubre de 2004) se realizaron necropsias de los cadáveres de aves encontrados en buen estado de conservación, seleccionando, además, especies con distintos hábitos tróficos para poder evaluar si las toxinas, en caso de encontrarse, se incorporaron a la cadena trófica.

Los hallazgos de las necropsias de junio de 2004, en general, indicaron lesión hepática y, en las anátidas con buena condición corporal, muerte de curso agudo. Todas las aves limícolas, por el contrario, mostraron una mala condición corporal, lo que indica una patología de curso crónico. Las lesiones descritas en los pulmones de algunos animales sugieren ahogamiento. Las causas por las que se produjo en algunas de las anátidas una parálisis de intestino grueso y cloaca no pudieron precisarse, aunque se sabe que en las proliferaciones de cianobacterias se producen varios tipos de cianotoxinas (Bartram *et al.*, 1999) pudiendo, por tanto, aparecer algún alcaloide que provocara la parálisis de intestino y cloaca.

En los hallazgos de necropsia de octubre de 2004 se presentaron dos cuadros patológicos distintos,

según los lugares donde se recogieron los cadáveres. Así, los cadáveres de Veta de la Palma presentaban lesiones uniformes en las que las petequias en el epicardio y el coágulo lardáceo en el corazón sugieren un proceso septicémico que, por la buena condición corporal, fue de curso agudo. Los cadáveres recogidos en el Lucio del Lobo presentaban una condición corporal muy mala, siendo la carencia de grasa subdérmica sugestiva de un proceso muy crónico que, unido a la presencia de plomo en alguno de los cadáveres, orienta hacia un proceso de intoxicación por plomo.

Tras estudiar el contenido de los ventrículos en varios de los animales muertos en junio de 2004 se encontraron cianobacterias, concretamente *Microcystis aeruginosa*. Por el contrario, en los contenidos de los ventrículos de los animales procedentes de la mortandad de octubre de 2004 no se encontró ninguna cianobacteria. No obstante, se procedió a realizar un bioensayo en ratón con los contenidos ventriculares de los animales muertos en los distintos casos estudiados, tratando de determinar la existencia de toxinas, incluidos aquellos ventrículos en los que no se detectaron cianobacterias.

El bioensayo en ratón resultó positivo en todos los animales muestreados procedentes de la mortandad de junio de 2004 y negativo en los animales procedentes de la mortandad de octubre de 2004; es decir, únicamente en los ventrículos de los animales muertos en junio de 2004 se encontraba alguna toxina capaz de provocar la muerte de los ratones. Pero para determinar si la toxina que el bioensayo de ratón detectaba era microcistina-LR, se midió también en el contenido de los ventrículos su valor de concentración

Se estima que en las truchas (*Salmo trutta*), tras la absorción por el intestino de las microcistinas, aproximadamente el 10% de la dosis oral consumida es biodisponible. En el caso de ratones y ratas, el 15% de la dosis de microcistina-LR administrada oralmente es excretada por las heces y el 9% por la orina, llegando al hígado, que es el órgano diana, alrededor del 80% (Bischoff, 2001). Como vemos en la Tabla 12, no hay ninguna duda de que, en el suceso de junio de 2004, los animales que murieron habían ingerido unas grandes cantidades de microcistina-LR.

Por otro lado, aunque la dosis letal (DL50) tras la administración oral de microcistina-LR para ratones es de 10.9 mg/kg, se considera que dosis de 500 µg/kg por vía oral son suficientes para provocar su muerte (Ito *et al.*, 2000). Puede decirse que las concentraciones de toxina ingerida eran

suficientes para provocarles la muerte. Pero para confirmar que fue la toxina microcistina el agente causal directo se midió su concentración en el hígado de los animales afectados, incluidos los hígados de los peces muertos hallados en el curso de esta misma mortandad.

Hay que indicar que el único dato relevante que se pudo obtener de los peces muertos encontrados en junio de 2004 ha sido esta medición de microcistina en el hígado, ya que la autólisis que se produce en estos cadáveres es muy rápida, impidiendo obtener otra información (Noga, 2000).

Las concentraciones de microcistina-LR que se detectaron en el hígado de estos animales fueron muy altas. Aunque se sabe que exposiciones continuas a bajas dosis pueden dar lugar a la acumulación de la toxina en el hígado (Gilroy *et al.*, 2000), viendo las dosis que habían ingerido parece razonable pensar que la acumulación de microcistina se estaba produciendo de forma bastante rápida, al menos en las anátidas. Se tiene muy poca información sobre la susceptibilidad que presentan las distintas especies de aves a las cianotoxinas y tampoco se conoce cómo les afectan las distintas rutas de exposición a niveles tóxicos (Krienitz *et al.*, 2003), por lo que los datos de las concentraciones de microcistina en hígado que se han obtenido en este estudio también son orientativos sobre las concentraciones que resultan tóxicas para las distintas especies.

Tras el análisis de todos los resultados obtenidos sabemos lo siguiente sobre los distintos casos estudiados:

#### **Mortandad de junio de 2004:**

Una gran proliferación de cianobacterias surgió en el Canal del Cherry, en la laguna de Los Ánsares y en las charcas aledañas de Los Corros, Las Nuevas y Leo Biaggi (Doñana). Esta proliferación formó una capa opaca en la superficie del agua y espuma en las orillas protegidas del viento. En poco tiempo aparecieron en la misma zona cientos de peces (fundamentalmente carpas y lisas de todos los tamaños) y miles de aves muertas. Esta mortandad en masa acabó a principios de septiembre y se calcula que afectó a más de 5.500 aves de 47 especies distintas (Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales, Estación Biológica de Doñana, CSIC).

Durante su estudio lo primero que se analizó fue la presencia y abundancia de cianobacterias,

encontrando que las especies más abundantes fueron *Microcystis aeruginosa* y *Pseudanabaena catenata*. Ambas especies mostraron una abundancia extraordinaria (>60.000 colonias/mL de *M. aeruginosa* en el Canal del Cherry, y >18.000 colonias/mL de *P. catenata* en Los Ánsares), así como una heterogeneidad espacial intensa.

Por otro lado, los resultados de las necropsias practicadas (hemorragias hepáticas) eran compatibles con la intoxicación con microcistina. El bioensayo en ratón de la muestra de agua evidenció la presencia de toxinas en las cianobacterias recogidas, porque todos los ratones murieron. Los análisis de microcistina realizados indicaron una gran concentración de esta toxina. Por otro lado, el contenido de células de cianobacterias tóxicas en el ventrículo de las aves herbívoras fue muy alto (más de  $10^5$  colonias/mL de *M. aeruginosa*) y en el de las aves piscívoras se encontraron restos de peces y crustáceos. El bioensayo en ratón con el contenido de los ventrículos fue positivo en todos los casos, por lo que se midió la cantidad de microcistina presente en el contenido ventricular de las aves muestreadas (herbívoras y piscívoras). Finalmente, la cantidad de microcistina acumulada en el hígado, previamente absorbida por el intestino, era suficientemente alta para provocarles la muerte.

Tras el análisis de todos los resultados se pudo recrear el siguiente escenario: en junio de 2004 se produjo un cambio en las concentraciones de nitratos y fosfatos del agua muestreada que coincidió con una proliferación importante de cianobacterias tóxicas que, al menos, produjeron microcistina-LR. Tal como indican varios autores (Watanabe *et al.* 1997; Beattie *et al.* 1998; Gilroy *et al.*, 2000) la microcistina se acumuló en el zooplankton, en invertebrados acuáticos y en los peces herbívoros exponiendo a sus depredadores (limícolas y aves piscívoras) a la acción de las toxinas. Las anátidas de superficie ingirieron directamente gran cantidad de cianobacterias (se encontraron en los ventrículos más de  $10^5$  colonias/mL de *M. aeruginosa*) y murieron tras su consumo.

Como se esperaba, se detectó una cantidad muy elevada de microcistina en las muestras de hígado de todas las aves analizadas, confirmando el paso de la toxina a través de la cadena trófica. Se puede confirmar que todos los animales muestreados en este episodio murieron por microcistina, ya que las cantidades que se encontraron en los hígados eran muy elevadas pero no a todos debió de afectarles por igual porque, mientras los consumidores directos de algas tuvieron una muerte aguda (presentaban una buena condición corporal), las aves piscívoras murieron tras un proceso crónico (presentaban una mala condición corporal).

Al analizar los resultados de las necropsias podemos indicar que la presencia de equimosis hepáticas coincide con las lesiones que producen las microcistinas, para las que el órgano diana es el hígado donde provocan una desestructuración del citoesqueleto que da lugar a la aparición de hemorragias intrahepáticas (Runnegar *et al.*, 1993; Codd, 2000; revisado por Bischoff, 2001; Malbrouck *et al.*, 2003; Gehringer, 2004; Wiegand y Pflugmacher, 2005; revisado por Huynh-Delermec *et al.*, 2005). Aunque la ingestión de la toxina se produjo por vía oral no existen diferencias en cuanto a la aparición de síntomas y lesiones si se compara con la administración de la microcistina por vía intraperitoneal (Ito *et al.* 2000), por lo que esperábamos encontrar las lesiones hepáticas “características”.

Si las dosis de cianotoxinas que se consumen son elevadas, la muerte de los animales se producirá de forma rápida, encontrando cadáveres con una buena condición corporal, como las anátidas de superficie necropsiadas. Por el contrario, si la cantidad de toxina que se ingiere es menor, los daños hepáticos se manifiestan de forma progresiva a medida que esta se va acumulando, por lo que el animal puede sufrir una pérdida de peso significativa antes de morir, que es probablemente lo que ocurrió con las limícolas encontradas, muy delgadas pero con elevadas concentraciones de microcistina en el hígado.

No obstante, los distintos patrones observados en los cuadros de intoxicación también pueden estar relacionados con las diferencias de sensibilidad a la toxina existente entre distintas especies (Ito *et al.*, 1997). En este sentido, Ito *et al.* (2000) han encontrado diferencias de sensibilidad a la microcistina-LR administrada por vía oral, incluso entre distintas cepas de ratón. La parálisis de intestino grueso y cloaca que se apreció en la necropsia de varias de las anátidas de superficie no se puede explicar por la acción de la microcistina pero, al haber sido esta toxina la única muestreada, no se puede descartar la aparición, en este mismo episodio de proliferación, de otro tipo de cianotoxinas que actuaran de forma sinérgica, provocando, por tanto, lesiones que no se explicarían por la acción de una sólo de estas.

#### **Mortandad de octubre de 2004:**

En octubre de 2004 comenzó una mortandad de aves acuáticas en el Lucio del Lobo y en Veta de la Palma. La aparición de cadáveres se produjo entre el 18-10-04 al 10-11-04 (Equipo de Seguimiento

de Procesos Naturales, Estación Biológica de Doñana, CSIC). En el agua de estas localidades no se apreció, a simple vista, la existencia de proliferaciones de microorganismos fotosintéticos. Esta mortandad afectó a unas 160 aves de 19 especies distintas. En Veta de la Palma la especie más afectada fue el Pato Cuchara (*Anas clypeata*).

Durante el estudio de esta mortandad lo primero que analizamos fue la presencia y abundancia de cianobacterias, no encontrando ninguna que pudiera considerarse abundante. Posteriormente, mediante un bioensayo en ratón, se procedió a comprobar si existía alguna toxina en el agua, dando un resultado negativo, por lo que se analizaron los contenidos de los ventrículos de los animales muertos, no encontrándose cianobacterias en los mismos. Finalmente, los resultados de las necropsias realizadas presentaron dos cuadros patológicos distintos, según los lugares donde se recogieron los cadáveres. Así, las necropsias realizadas a los cadáveres de Veta de la Palma sugieren la existencia de un proceso septicémico, mientras que las necropsias de los cadáveres recogidos en el Lucio del Lobo indican un cuadro de intoxicación por plomo, como se ha descrito anteriormente en este apartado de discusión.

Tras analizar todos los datos obtenidos se puede afirmar que la mortandad de octubre de 2004 no se debió a una intoxicación por consumo de cianotoxinas. En las muestras de agua analizadas no se aislaron cianobacterias y el bioensayo realizado en ratón también ofreció un resultado negativo. Además, cuando se analizaron los contenidos de los ventrículos no se encontró ninguna célula de cianobacteria y las lesiones descritas en la necropsia no coinciden con una patología originada por cianotoxinas, sino que parecen orientar el diagnóstico a dos procesos patológicos distintos: enfermedad infecciosa e intoxicación por metales pesados.

A continuación se describe y discute separadamente la mortandad ocurrida en junio de 2005 que, tiene la particularidad y el gran interés científico de ser el primer caso de intoxicación por saxitoxinas en aguas continentales registrado fuera de Australia.

#### **El episodio de mortandad de peces de junio de 2005:**

En Junio de 2005 se produjo la aparición de una proliferación de microorganismos fotosintéticos, así como unas 30 Tm de peces muertos en el Caño del Guadiamar, Parque Natural de Doñana.

Durante la inspección de la zona se apreció una coloración azul verdosa del agua, que sugería que la proliferación estaba formada por cianobacterias. La mortandad en masa de peces acabó en tres días. Se recogieron muestras de agua y de peces muertos siguiendo la metodología descrita en esta tesis y se identificó el organismo fotosintético dominante como la cianobacteria *Anabaena circinalis*. La abundancia calculada de *Anabaena circinalis* fue de 88.880 colonias/mL. Asimismo, se realizó un bioensayo en ratón que dio un resultado positivo (3+). Al haberse producido una mortandad masiva en un periodo de tiempo corto (el 90% de los peces apareció muerto el primer día) y ser la cianobacteria *Anabaena circinalis* la especie más abundante se procedió a analizar las concentraciones de saxitoxina en las cianobacterias recogidas durante el muestreo. El resultado de este análisis fue positivo, encontrándose unas concentraciones de saxitoxina de 6,38 ppb en el agua.

Para poder determinar que la muerte de los peces se debió al consumo de estas cianobacterias se procedió a analizar el contenido de saxitoxina en el hígado de los ejemplares recogidos, obteniendo una concentración de 2,2 ppb. Teniendo en cuenta que la dosis DL<sub>50</sub> oral de PSP, oscila entre 128 µg/Kg de peso vivo para las cobayas y los 420 µg/Kg de peso vivo para los ratones (revisado por Kuiper-Goodman *et al.*, 1999) y que los niveles máximos permitidos para el consumo de moluscos en España son de 80 µg/100g (Decreto 116/1995, del 31 de marzo, Consejería de la Presidencia y Administración Pública de Galicia), parece evidente que la muerte de los peces se debió a la ingestión masiva de esta toxina. En este caso no se procedió al estudio de las necropsias porque la velocidad de autólisis que se produce en los órganos de los peces es muy rápida y no los permite valorar (Noga, 2000).

Las microcistinas son las cianotoxinas más frecuentes en las aguas continentales. Sin embargo, las neurotoxinas producidas por las cianobacterias filamentosas, como las saxitoxinas, pueden también suponer un grave peligro para el ecosistema y para la salud humana (Liu *et al.*, 2005).

Dentro de las cianobacterias de aguas continentales eutróficas, las especies del género *Anabaena* están entre la más importantes productoras de toxinas (Berg *et al.*, 1986, 1987; Carmichael *et al.*, 1990; Skulberg *et al.*, 1993) pudiendo tener, por tanto, un impacto negativo en la calidad del agua de abastecimiento. Los crecimientos en masa o proliferaciones de *Anabaena* pueden dar lugar a la aparición de toxinas, con serias consecuencias para la fauna doméstica y salvaje (Smith y Lewis, 1987; Edwards *et al.*, 1992; Falconer, 1992).

*Anabaena circinalis* es una de las cianobacterias planctónicas de agua dulce considerada como un importante riesgo mundial para la salud de las personas y animales, que se ven expuestos a través del agua de consumo. Y es que, la presencia de esta cianobacteria tóxica en los reservorios de agua dulce puede indicar la aparición de toxinas similares a las producidas por otras cianobacterias (Carmichael *et al.*, 1997; Humpage *et al.*, 1994 y Mahmood y Carmichael, 1986) y por algunos dinoflagelados en las mareas rojas (Hallegraeff, 1993), como son las anatoxinas y las saxitoxinas y sus derivados (Pomati *et al.* 2004).

En el medio ambiente marino, las saxitoxinas responsables del PSP (Paralytic Shellfish Poison) producido por los dinoflagelados en las “mareas rojas” han sido las mayores responsables de pérdidas humanas a través del consumo de moluscos bivalvos, que la acumulan en el hepatopáncreas (Kao, 1993). Las toxinas productoras de PSP, de las cuales la representante más potente es la saxitoxina (STX), son alcaloides neurotóxicos que, selectivamente, bloquean los canales de Na<sup>+</sup> en las células (Catterall, 1980).

La presencia de saxitoxina en las cianobacterias ha sido demostrada únicamente en cuatro especies y en zonas concretas del planeta: *Aphanizomenon flossaquae* (Jachim y Gentile, 1968; Sawyer *et al.*, 1968; Alam *et al.*, 1973 y Mahmood y Carmichael, 1986) y *Lyngbya wollei* (Carmichael *et al.*, 1997; Onodera *et al.*, 1997 y Yin *et al.*, 1997) en América del Norte; *Anabaena circinalis* (Bowling, 1992; Humpage *et al.*, 1994 y Onodera *et al.*, 1996) en Australia y, finalmente, *Cylindrospermopsis raciborskii* en Brasil (Lagos *et al.*, 1999).

A pesar de que *A. circinalis* es una especie distribuida por todo el mundo, existe una segregación geográfica de las cepas productoras de toxina. Así, en América y Europa los aislamientos de *A. circinalis* producen únicamente anatoxinas, mientras que en Australia producen, exclusivamente, saxitoxinas (Sivonen, K., y G. Jones. 1999; Beltran y Neilan, 2000). La razón de esta distribución geográfica en la producción de esta neurotoxina es desconocida pero Pomati *et al.* (2004) han publicado la identificación de diferencias genómicas entre cepas tóxicas y no tóxicas de *A. circinalis*.

Hasta donde nosotros conocemos, sólo los aislamientos australianos de *Anabaena circinalis* producen toxinas PSP. El hallazgo de colonias de *Anabaena circinalis* productoras de saxitoxina en

el Caño del Guadiamar representa, según estos datos, la primera cita de este tipo de neurotoxina en aguas continentales en España y en Europa y también la primera cita de *A. circinalis* productoras de saxitoxina fuera de Australia.

Tsujimura (2004) investigó el efecto de la desecación en la germinación y frecuencia de aparición de acinetos en el género *Anabaena*. También valoró la importancia de la desecación de los reservorios de agua dulce como medida para la inhibición de proliferaciones de *Anabaena*. Las conclusiones que obtuvo fueron que la mayoría de los acinetos de *Anabaena* perdían su capacidad de germinación a 25 °C después de 3 días de desecación, incluso en lagos y reservorios de agua poco profundos, demostrando, así, que la desecación de sedimentos puede ser considerada una medida útil para reducir y espaciar estas proliferaciones. En Doñana se suceden estaciones húmedas y secas que, probablemente, permitan una regulación natural de las proliferaciones tóxicas de *Anabaena circinalis*.

En el pasado, se ha mostrado gran atención hacia los péptidos cíclicos hepatotóxicos, las microcistinas, producidas por proliferaciones de *Microcystis spp.*, debido a su alta frecuencia de aparición. Por ello, en muchos programas de control de agua dulce no está incluido ningún análisis de saxitoxinas. La carencia de facilidades analíticas para detectar las cianotoxinas y la ausencia de estándares también limitan los estudios en este campo. No obstante, debiera recomendarse prestar atención al estudio, no solo de las hepatotoxinas sino, también, de las neurotoxinas producidas por cianobacterias en España.

Negri y Jones (1995) demostraron la potencia y capacidad de las saxitoxinas para propagarse, a partir de los moluscos bivalvos, por toda la cadena trófica del ecosistema acuático. Los bivalvos actúan paraténicamente y aumentan la posibilidad de exposición a las toxinas de los mamíferos acuáticos, peces y aves que consuman dichos moluscos. En las zonas donde se producen descensos en los niveles de agua la exposición de los bivalvos a las cianobacterias tóxicas es mayor porque, en esta agua, resulta muy fácil la acumulación de cianobacterias en las orillas, de forma que si son tóxicas, la toxina se concentra en mayor cantidad. Por otro lado, en las zonas con niveles de agua variables, como son las marismas, los moluscos quedan más fácilmente expuestos a sus consumidores habituales.

En el curso de la mortandad de peces de junio de 2005, producida por saxitoxinas, no se encontraron aves muertas, si bien se vieron agrupaciones de milanos negros (*Milvus migrans*) y cigüeñas blancas (*Ciconia ciconia*) e, incluso, una Cigüeña Negra (*Ciconia nigra*) (datos propios) comiendo de los restos de peces muertos. El que no se encontraran cadáveres de cigüeñas no indica que estas no murieran o no se vieran afectadas por las toxinas ingeridas. Las aves son capaces de desplazarse varios kilómetros fácilmente y en poco tiempo y pueden comer en áreas muy distantes de los lugares donde pudieran quedar postradas o muertas (Shumway *et al.*, 2003).

Sin embargo, en la mortandad que se produjo en junio de 2004, se encontraron muchísimas aves muertas, fundamentalmente anátidas. Y es que las anátidas, a diferencia del resto de las aves, tienen en la época estival un proceso de muda acelerado, desprendiéndose casi simultáneamente de todas las plumas de vuelo y dejando a los animales incapaces para desplazarse a otras zonas. Si bajo estas circunstancias se produce una proliferación tóxica en el lugar donde se encuentran, quedarán totalmente expuestos a las toxinas. Además, las aves parecen exhibir un amplio rango de sensibilidad a las cianotoxinas y los síntomas varían dependiendo de la especie y de la cianotoxina implicada (Shumway *et al.*, 2003).

Hay muchos estudios locales y globales que indican que la colonización y aparición de asentamientos humanos y los cambios de uso de las tierras se concentran desproporcionadamente en zonas de gran valor biológico, haciendo que disminuyan las áreas protegidas (Araujo, 2003; Scharlemann *et al.*, 2004; Luck *et al.*, 2004). En el caso de las zonas húmedas el impacto de las poblaciones humanas todavía es más acusado por la competencia que se produce por el agua para usos agrícolas y/o urbanizaciones.

Las aves acuáticas están ligadas inevitablemente a los humedales, que son ecosistemas, normalmente, con una estacionalidad más o menos acusada en su hidrología, por lo que obligan a un gran número de aves a realizar desplazamientos migratorios o dispersivos. La conservación de las aves acuáticas está ligada a la existencia de refugios situados a lo largo de las rutas migratorias. El problema surge cuando se van perdiendo las zonas húmedas que no tienen una protección suficiente, obligando a las aves a concentrarse en los humedales que sí están protegidos. En el mundo se van creando, como alternativa a la pérdida de grandes humedales, zonas protegidas mucho más pequeñas. Como ejemplo de esta política se encuentran los refugios establecidos a lo

largo del Río Grande (Kitchell *et al.*, 1999).

Las grandes concentraciones de aves en los humedales que aún perviven suponen un aporte muy significativo de materia orgánica a través de las heces, que puede provocar o contribuir de forma importante a los fenómenos de eutrofización, disminuyendo la calidad de las aguas (Manny *et al.*, 1994, Post *et al.*, 1998, Kitchell *et al.*, 1999; Mukherjee y Borad, 2001). Las aves utilizan las marismas como zona de cría, descanso y de alimentación, de forma que parte de los nutrientes ingeridos allí son de nuevo devueltos, a través de la excreta de heces, en forma de N y P soluble (Pettigrew *et al.*, 1998). Estos autores estudiaron los efectos de la contribución de los nutrientes contenidos en las heces a la cadena trófica, encontrando que la adición de excrementos incrementaba inmediatamente la cantidad de N y P en la columna de agua provocando picos de fitoplancton días después.

Post *et al.* (1998) han demostrado que los nutrientes aportados por las aves en los humedales durante el invierno son proporcionales a su densidad y se estima que podrían suponer un aporte del 40% del nitrógeno y del 75% del fósforo. Los humedales se encuentran, generalmente, limitados en nitrógeno y son las aves acuáticas las que aportan grandes cantidades de N y P en forma soluble y biodisponible para los organismos fotosintéticos. Se sabe que los ratios inferiores a 16:1 promueven la aparición de cianobacterias (Mur *et al.*, 1999) y que las heces de las aves tienen proporciones de nitrógeno/fósforo bajas, lo cual favorece también la aparición de cianobacterias (Mitchell y Wass, 1995).

Todos estos datos nos llevan a reflexionar sobre la importancia de llevar a cabo estudios que permitan valorar la relación entre la aparición de floraciones de cianobacterias tóxicas y los aumentos de biomasa de aves, el aporte de heces y los niveles de eutrofia del agua en las marismas de Doñana.

Por otra parte, Arthur *et al.* (2006) indican que el impacto ecológico de las cianobacterias tóxicas no está bien comprendido. Sin embargo, tras el análisis de las mortandades que se describen en esta tesis, se puede ver como en el entorno de Doñana, especialmente durante la época estival, se concentran alrededor de pequeños reductos de agua una gran cantidad de especies animales, muchas de las cuales se encuentran en peligro de extinción o en una situación de conservación desfavorable

y, como se ha expuesto, es en este momento cuando convergen diversas circunstancias ambientales que favorecen las floraciones masivas de cianobacterias y la aparición de cianotoxinas.

Por tanto, la desaparición de estos espacios naturales de tan alto valor, asociada a la problemática que añaden las mortandades masivas implicando a especies amenazadas conducen a considerar estos fenómenos como un problema de conservación potencialmente grave, que debe llevar al planteamiento de estudios que permitan orientar sobre la forma de prevenir o aminorar sus consecuencias hasta donde sea posible. En este sentido, las Marismas de Doñana pueden ser el laboratorio perfecto que permita avanzar en esta línea.

Por otro lado, sabemos que la relación entre cianobacterias y fauna salvaje es muy estrecha y se viene produciendo desde hace mucho tiempo (Krienitz *et al.*, 2003). Es el caso, por ejemplo, de los flamencos en el lago Bogoria (Kenia) que han tenido contacto siempre con las cianobacterias y sus toxinas. Krienitz *et al.* (2003) consideran que es muy probable que la susceptibilidad de los flamencos a las toxinas venga dada, por un lado, por la mayor exposición a las cianobacterias, ya que la eutrofia de origen antropogénico incrementa la aparición de proliferaciones y/o por la aparición de otro tipo de contaminantes que hagan a los flamencos más sensibles a las cianotoxinas. Es muy posible que esta misma situación se esté produciendo en las Marismas de Doñana.

Existen algunas evidencias de que las aves que se encuentran en zonas propensas a la floración de algas tóxicas han desarrollado un comportamiento aprendido para evitar su consumo (Shumway *et al.*, 2003). Tras observaciones prolongadas en los patos Eider (*Somateria mollissima*), se ha comprobado que parecen tener la habilidad de saborear las toxinas y evitar su consumo, considerándolos en algunas regiones, incluso, como indicadores de la presencia de moluscos tóxicos (Shumway *et al.*, 2003). Otro ejemplo de la aversión a las toxinas como comportamiento aprendido es el de los ostreros (*Haemantopus ostralegus*) en California, que dejan caer la carne de los mejillones cuando detectan que llevan toxinas, utilizando para ello las terminaciones sensoriales de sus picos (Shumway *et al.*, 2003).

Estos mismos autores consideran que, en las zonas donde son frecuentes las proliferaciones de cianobacterias tóxicas, las aves capacitadas para saborear la comida (al triturarla o machacarla) antes de ingerirla, como, por ejemplo, las gaviotas, patos y ostreros, tienen una mayor facilidad para

evitar las algas tóxicas a través del comportamiento aprendido que aquellas otras especies que engullen a sus presas enteras, como es el caso de los cormoranes, y que no pueden detectar las toxinas mediante el sabor. Al ser un comportamiento aprendido, estos autores postulan que las aves que nunca han estado expuestas a las cianotoxinas son las que tienen un mayor riesgo de ingerirlas, pudiendo provocar efectos desastrosos en poblaciones enteras que se ven por primera vez expuestas a las cianotoxinas.

Los motivos por los que, históricamente, no se han citado más casos de mortandad de aves acuáticas en Doñana apuntando como posible agente causal a las cianobacterias tóxicas pueden tener que ver, entre otros factores, con el enmascaramiento de la sintomatología, que no ha permitido establecer con facilidad una relación causa-efecto con la presencia de estos organismos.

Así, Krienitz *et al.* (2003) investigan las mortandades en masa de Flamenco Enano (*Phoeniconaias minor*) en el Valle del Rift, que están provocando el declive de esta especie y que han venido atribuyendo, en los últimos años, a micobacteriosis, intoxicaciones por metales pesados y pesticidas. Pero, tras investigar en el Lago Bogoria (Kenia), han llegado a la conclusión de que las cantidades de microcistinas y anatoxinas que se encuentran en el agua pueden estar contribuyendo a la muerte de estos flamencos.

Los efectos de las cianotoxinas, por si solos, pueden no resultar siempre letales, pero convierten a los animales que las ingieren en más vulnerables a otros procesos o presiones medioambientales, provocándoles finalmente la muerte. Esto es especialmente cierto con las especies migradoras que ya han perdido sus reservas y llegan emaciadas a zonas donde se han producido eventos tóxicos (Shumway *et al.*, 2003). Por la misma razón, cualquier proceso sistémico fisiológico, como la muda, o patológico que suponga una exigencia energética o nutricional grande, deja endebles a los animales y, bajo estas condiciones, incluso pequeñas dosis de toxina podrían provocar una incapacidad a los animales para comer, muriendo, así, de inanición (Shumway *et al.*, 2003), tal y como se ha visto que sucede también en Doñana.

Por otro lado, en los lugares de difícil acceso, pueden suceder casos de mortandad que pasen desapercibidos debido a factores como el corto periodo de aparición de algunas de las proliferaciones de cianobacterias y/o algas tóxicas, el desconocimiento de que se está produciendo

un brote de estos organismos o de que está ocurriendo una mortandad de fauna salvaje (Shumway *et al.*, 2003). Además, las cianotoxinas son extremadamente estables y pueden persistir en el agua durante semanas (Sivonen y Jones 1999); consecuentemente, las cianotoxinas pueden llegar al estómago directamente a través del consumo de las células contenidas en el agua o indirectamente cuando los animales beben el agua con toxinas disueltas tras el final de una proliferación.

Al analizar conjuntamente los datos obtenidos de las mortandades históricas y las actuales vemos que no existen diferencias estadísticas, obteniendo una significación asintótica bilateral de 0,556 ( $p > 0,05$ ) que indica claramente que no existe diferencia alguna entre la probabilidad de aparición de mortandades entre los años de datos históricos y los años de datos actuales.

Si consideramos, por tanto, que la probabilidad de que surja una mortandad ha sido desde 1969 hasta 2005 es estadísticamente semejante, podremos decir que desde 1969 concurren circunstancias que hacen posible la aparición de estos brotes.

Este hecho coincide con lo descrito por Bernis (1974) que ya consideró que las mortandades en masa de fauna salvaje que surgen en la marisma de Doñana son fenómenos frecuentes. Por otro lado, Bernis (1974) también comenta que estos fenómenos surgieron antes de que se utilizaran en la marisma plaguicidas. Es evidente que si ya surgían mortandades antes del posible uso inadecuado de plaguicidas, las mortandades descritas antiguamente hacen suponer que se produjeron por brotes de intoxicación alimentaria (cianotoxinas y/o botulismo).

Siguiendo el razonamiento anterior, se podrían descartar las enfermedades infecciosas porque, en general, en las mortandades descritas se vieron afectadas varias especies con requerimientos tróficos y edades diferentes (Bernis, 1974; Hidalgo, 1974; Espina *et al.*, 1981; León *et al.*, 1981; Memorias PND 2004, Informe Interno; Equipo de Seguimiento de la EBD).

En el periodo de datos históricos, aunque no hay en la bibliografía científica ninguna cita, se realizaron algunos trabajos en los se han descrito brotes de botulismo (Hidalgo, 1974; Espina *et al.*, 1981; León *et al.*, 1981), como más adelante se argumenta.

Para que se produzca un brote de botulismo es necesario que algún fenómeno desencadene la secuencia de mortandad (Friend y Franson 1999). De hecho, en estos sucesos del periodo de datos históricos se achacó la aparición de los brotes de botulismo a una posible intoxicación con pesticidas (Hidalgo, 1974; Espina *et al.*, 1981; León *et al.*, 1981).

Por otro lado, existen trabajos realizados en este periodo (datos históricos), en los que se documenta la presencia de cianobacterias y la aparición de floraciones, además de describir condiciones del medio adecuadas para su crecimiento (Furest y Toja, 1981; Pérez–Cabrera y Toja, 1989; López *et al.*, 1991; Toja *et al.*, 1991; López *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1994; Toja *et al.*, 1997).

Ligado a lo anterior, creemos estar en condiciones de afirmar que una buena parte de las mortandades históricas constatadas han tenido relación con las cianotoxinas como agente causal primario. En apoyo de este planteamiento tenemos varias circunstancias:

Que entre el 50% y el 75% de las proliferaciones de cianobacterias son tóxicas (Graham y Wilcox, 2000).

Que en el periodo histórico han surgido proliferaciones de cianobacterias (Pérez–Cabrera y Toja, 1989; López *et al.*, 1991; Toja *et al.*, 1997).

Que, estadísticamente, se ha comprobado que en el periodo actual, el 50% de las mortandades anuales se produce por cianobacterias.

Que la presencia de mortandades está correlacionada con la abundancia de cianobacterias y con la concentración de cianotoxinas.

Lo anteriormente expuesto no excluye, sin embargo, la aparición de brotes de botulismo como agente causal secundario de algunas mortandades.

Con los datos históricos se ha realizado un estudio de la distribución espacial de las mortandades surgidas en Doñana a partir de sus frecuencias de aparición (en porcentaje), que son reflejadas en

las cuadrículas representadas en el mapa 3. Los resultados muestran una distribución agregada de las mortandades, indicando que la probabilidad de que aparezcan es mayor en las proximidades de donde ya se han registrado con anterioridad y menor a medida que nos alejamos, quizá porque las formas de resistencia sigan siendo viables.

Con los datos actuales se ha realizado el mismo estudio estadístico, cuyos resultados muestran también la existencia de una distribución agregada de las mortandades.

Al comparar ambas distribuciones espaciales (periodo histórico y periodo actual) vemos que las mortandades han surgido siempre en las mismas cuadrículas, siendo las cuadrículas G7 y G8 donde se ha producido el porcentaje más alto en ambos periodos.

En el entorno de Doñana, especialmente durante la época estival, se concentran alrededor de los pequeños reductos de agua un buen número de especies animales, muchas de las cuales se encuentran en peligro de extinción o en una situación de conservación desfavorable, por lo que, desde el punto de vista de la gestión, el seguimiento no debería realizarse exclusivamente en las cuadrículas donde es más frecuente la aparición de mortandades. En este sentido, deberían vigilarse, a partir del análisis de los parámetros relacionados con la aparición de cianobacterias, todas aquellas zonas que puedan presentar riesgos potenciales de surgimiento de mortandades, buscando obtener un mapa lo más completo posible de zonas de riesgo.

Hemos establecido correlaciones estadísticas entre los distintos parámetros pero, para poder discriminar cuál de ellos tiene una mayor influencia en la aparición de mortandades, hemos empleado un árbol de decisiones (realizado con el software Answer Tree 12.0) que permite crear un algoritmo completo de un árbol estadístico con múltiples variables, lo que facilita una exploración exhaustiva de los datos.

Los resultados obtenidos indican que es la clorofila el valor de mayor significación (0,0007) en la aparición de mortandades. Teniendo en cuenta que tanto los nitratos ( $p= 0,0008$ ) como el mes ( $p= 0,007$ ) están incluidos como valores de predicción, esta conclusión nos permite plantear que en los meses de junio a noviembre se deberían vigilar especialmente las concentraciones de clorofila y nitratos para poder predecir la aparición de cianotoxinas.

Al analizar de forma comparada los datos obtenidos de las mortandades históricas y los correspondientes al periodo actual se obtiene una significación asintótica bilateral, de 0,556 ( $p > 0,05$ ), que indica claramente que no existen diferencias estadísticas en la probabilidad de aparición de mortandades entre ambas series de datos (históricos y actuales).

Si consideramos, por tanto, que la probabilidad de que surja una mortandad ha sido desde 1969 hasta 2005 la misma, podremos decir que desde 1969 concurren circunstancias que hacen posible la aparición de estos brotes, coincidiendo con lo descrito por Bernis (1974).

Sabemos que el botulismo es una intoxicación alimentaria muy relacionada con las grandes mortandades de fauna salvaje (Friend y Franson, 1999) y, aunque no existe bibliografía científica, si hay documentación que recoge la aparición de brotes de botulismo relacionados con los sucesos de mortandad del periodo histórico en las marismas de Doñana (Hidalgo, 1974; Espina *et al.*, 1981; León *et al.*, 1981).

Para que se produzca un brote de botulismo es necesario que algún fenómeno desencadene la cascada de mortandad (Friend y Franson, 1999); de hecho, en estos sucesos del periodo de datos históricos se achacó la aparición de los brotes de botulismo a una posible intoxicación con pesticidas (Hidalgo, 1974; Espina *et al.*, 1981; León *et al.*, 1981). Por otro lado, existen trabajos realizados en este periodo en los que se documenta la presencia de cianobacterias y la aparición de floraciones, además de describir condiciones del medio adecuadas para su crecimiento.

Así, Furest y Toja (1981) describen unos valores fisicoquímicos de muestras de agua tomadas entre 1979 y 1980 en el Lucio de Sanlúcar, Lucio de los Ánsares y el Lucio del Buentiro que estarían dentro de los parámetros adecuados para el crecimiento de cianobacterias. Pérez-Cabrera y Toja (1989) describen en el Lucio de Santa Olalla un sobrecrecimiento de cianobacterias en noviembre de 1985 y en la primavera de 1986. López *et al.* (1991) describen entre los años 1985 y 1987, en el Lucio de Santa Olalla, que el fitoplancton dominante son cianobacterias, identificando *Microcystis aeruginosa*. También midieron en este lucio los valores de clorofila *a*, obteniendo medias mayores de 100  $\mu\text{g/L}$  y, al final del periodo estival de 1987, se observaron valores de más de 900  $\mu\text{g/L}$ .

Toja *et al.* (1997) describen en 1986 floraciones de cianofíceas en el Lucio de Santa Olalla con

concentraciones de clorofila *a* de más de 100 µg/L. Toja *et al.* (1991) establecen que el Lucio de Santa Olalla es una laguna hipereutrofica con concentraciones de clorofila *a* usualmente muy altas y con parámetros de temperatura, conductividad y pH muy adecuados para las cianobacterias, encontrando en el Lucio Dulce (lucio muy cercano al de Santa Olalla), en mayo de 1989, *Microcystis aeruginosa*.

Serrano *et al.* (1994) describen en los años 1991, 1992 y 1993 en el Lucio de Las Verdes concentraciones de clorofila *a* menores que las descritas para el Lucio de Santa Olalla pero relativamente altas cuando se comparan con otras aguas naturales. Además, describen como grupo dominante de cianobacterias los géneros *Microcystis* y *Gomphosphaeria*.

López *et al.* (1993) indican que la laguna de Santa Olalla, en los años normales y/o secos, se transforma en primavera en una laguna alcalina sin macrófitos en el fondo y dominada absolutamente por las cianofíceas. El estudio de los sedimentos de esta laguna ha permitido constatar que las condiciones que tenía a mediados del siglo XVIII eran parecidas a las que tiene actualmente.

Con los datos históricos existentes y los datos actuales obtenidos sobre los parámetros de nitratos, fosfatos y clorofila *a*, podemos establecer que las condiciones físico-químicas existentes en el agua de las marismas de Doñana son adecuadas para la aparición de floraciones de cianobacterias tóxicas, por lo que se pueden considerar estas como fenómenos naturales.

Finalmente, esta discusión conduce a considerar la importancia de establecer las bases para un sistema de recogida de muestras ordenado, repetible en el tiempo y operativo que permita prever en lo posible, y posteriormente diagnosticar con fiabilidad y rapidez, floraciones masivas de cianobacterias y sus niveles de toxicidad, instaurando, así, lo que podríamos denominar un protocolo de alerta temprana.

A continuación se propone un protocolo que es descrito siguiendo el mismo esquema de trabajo planteado en esta tesis:

### **Protocolo de alerta temprana para la detección de proliferaciones de cianobacterias tóxicas en un espacio natural**

#### **– Selección de la época y de los lugares de muestreo rutinario**

Para poder establecer un protocolo de actuación ante la aparición de cianobacterias en un espacio natural, inicialmente se ha de establecer un muestreo rutinario que permita determinar donde se produce una proliferación de cianobacterias tóxicas. Para lo cual se ha de realizar previamente un estudio de los lugares más favorables para el desarrollo de cianobacterias revisando además los datos retrospectivos que se posean de mortandades de fauna salvaje y aparición de proliferaciones de organismos fotosintéticos acuáticos. Los muestreos se han de acotar a las épocas del año más proclives para los desarrollos de proliferaciones de cianobacterias, teniendo en cuenta que se las considera dominantes a 24°C en todas las proporciones de Nitrógeno: Fósforo (N:P) inferiores a 20µM/L. Como se ha visto en esta tesis, la distribución de las cianobacterias en Doñana se produce de forma agregada, por lo que será más frecuente la aparición de cianobacterias en los sitios que, en estos años de muestreo, han dado lugar a proliferaciones. Por lo tanto el trabajo de inspección y muestreo rutinario en el entorno de Doñana se ha de llevar a cabo en las estaciones de muestreo que se han seleccionado y en las épocas de primavera verano y otoño.

#### **– Inspección ocular**

En los lugares de muestreo seleccionados se ha de realizar una inspección ocular que permita evaluar la aparición de proliferaciones en los meses de primavera, verano y otoño. Cuando se hace una inspección ocular hay que tener en cuenta que las proliferaciones de cianobacterias pueden aparecer como densas espumas en la superficie de algas verde-azuladas, o como acumulaciones de granos de arena verdes flotantes, o como una intensa pintura azul-verdosa cercana a la superficie.

#### **– Toma de muestras**

En el caso de que se produzca la aparición de una proliferación de organismos fotosintéticos en el

agua se debe proceder al muestreo completo del punto de agua, que brevemente indicamos:

- Anotaciones sobre la fecha y lugar del muestreo.
- Recoger 100 mL de agua en cajas de cultivo de tejidos de tapa ventilada (Tissue Culture FlaskT75 CN Vent Cap, SARSTEDT, USA), para la identificación microscópica de las cianobacterias en vivo.
- Recoger 100 mL de muestra, a la que se le ha de añadir inmediatamente formol al 1% tamponado con PBS (Phosphate Buffer Saline), para la identificación microscópica y recuento.
- Para medir la clorofila *a* recoger 100 mL de muestra en cajas de cultivo de tapa ventilada (Tissue Culture FlaskT75 CN Vent Cap, SARSTEDT, USA),
- Se deben filtrar de 100 a 500 mL (en función de la cantidad de partículas disueltas en el agua) por un filtro de red, para recoger materia celular para los bioensayos en ratón.
- Para medir el fosfato y nitrato del agua, se aconseja utilizar una sonda multiparamétrica que nos indique sus valores in situ.
- Para medir la cantidad de toxinas en el agua, se recogerán 50 mL en una caja de cultivo de tapa ventilada (Tissue Culture FlaskT75 CN Vent Cap, SARSTEDT, USA).
- Por si fuera necesario repetir algún análisis, se recogerán dos litros de agua a una profundidad máxima de 25 cm.
- Todas las muestras de agua se han de transportar en condiciones de oscuridad y bajo refrigeración (unos 4 °C) en una nevera portátil hasta el laboratorio, donde quedaron almacenadas para su estudio en una cámara frigorífica a 4 °C.
- **Identificación y recuento**

En el laboratorio se debe proceder a la observación microscópica de las muestras de la proliferación

acuática y realizar una identificación de las mismas para confirmar si son especies de cianobacterias productoras de toxina. Si las cianobacterias son productoras de toxinas pero no se encuentran en abundancia, no producirán suficiente toxina para representar un problema, por lo que hay que medir la abundancia, bien con recuentos de colonias o por estimación de biomasa por medida de clorofila *a*.

– **Estimaciones de toxicidad**

Cuando se está produciendo una proliferación de organismos fotosintéticos con una abundancia de 1 - 400 colonias/mL la frecuencia de muestreos ha de aumentarse y realizarse semanalmente para poder prevenir un evento tóxico que surja por sucesión planctónica. Pero cuando la abundancia de cianobacterias es superior a 400 colonias/mL ó 1µg/L de clorofila *a* la frecuencia de muestreos ha de ser diaria y se debe confirmar mediante un bioensayo en ratón si hay suficiente toxina para provocar un evento tóxico en la fauna salvaje.

Si el bioensayo en ratón es positivo hay que discernir si son los péptidos cíclicos hepatotóxicos o los alcaloides neurotóxicos los implicados, ya que los primeros causan la muerte por daño hepático en pocas horas tras la administración de la dosis, mientras que los segundos causan la muerte por parada respiratoria muy rápidamente (< 1h). Si el bioensayo en ratón es positivo se han de tomar medidas para evitar que la fauna salvaje, especialmente aquella que tenga poblaciones consideradas en peligro, tenga acceso a esta agua en la medida de lo posible.

– **Determinación de la toxina presente en la proliferación**

Posteriormente, el bioensayo ha de ser confirmado usando otras técnicas analíticas específicas, como son los enzimoimmunoanálisis que permiten determinar la cianotoxina que se ha producido y su concentración, o bien con técnicas de HPLC para toxinas conocidas.

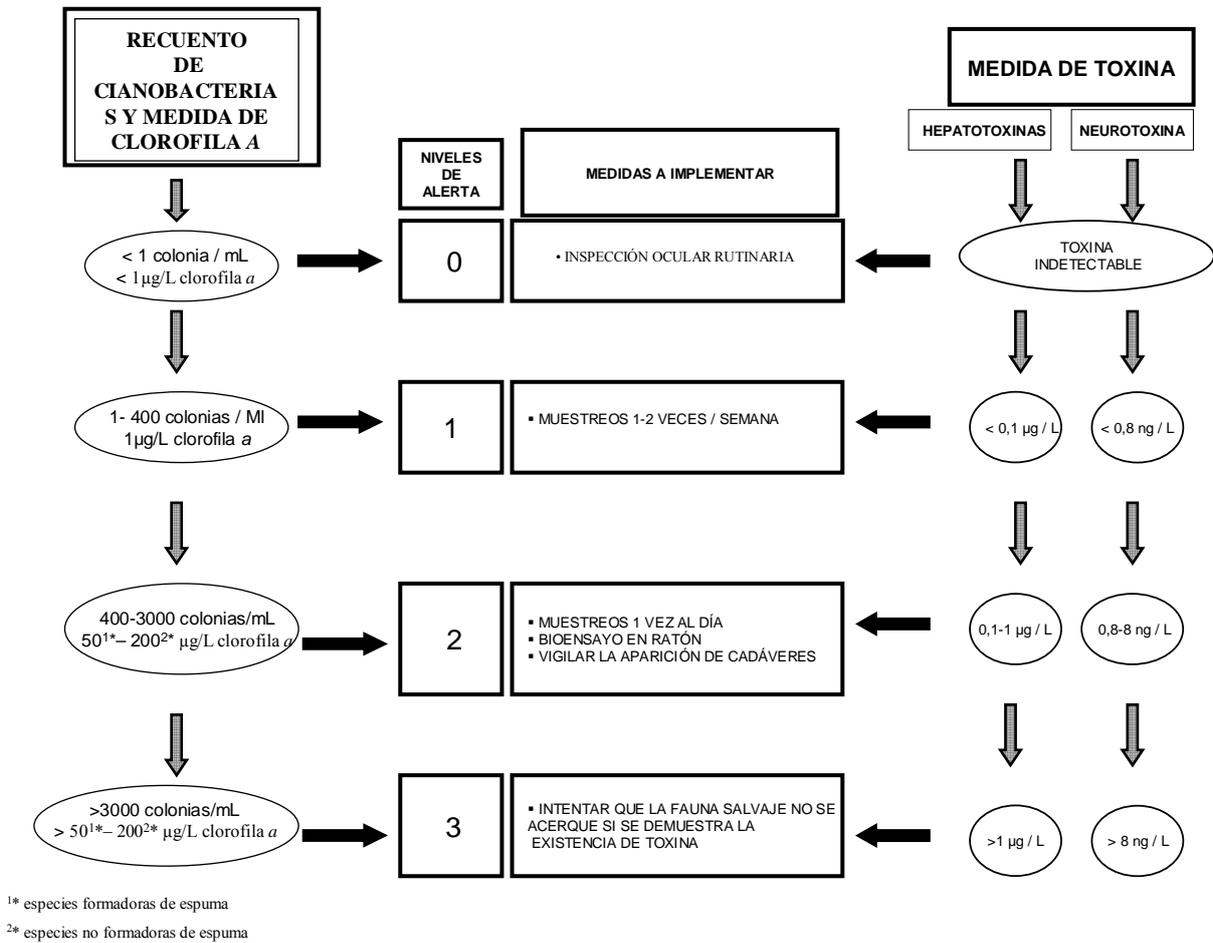


Figura 19. Niveles de alerta en relación con los recuentos de colonias, clorofila a y niveles de toxinas.

**Protocolo para identificar a las cianotoxinas como origen de un caso de mortandad**

En el caso de que se haya producido una mortandad de fauna salvaje coincidente con una proliferación de cianobacterias, para confirmar que la muerte de los animales se ha debido a la ingestión de cianotoxinas se han de realizar las necropsias de los cadáveres (siempre siguiendo los protocolos y legislación vigente). En el curso de las necropsias, no sólo hay que anotar todos los hallazgos, sino también realizar una toma de muestras adecuada que permita detectar y cuantificar las cianotoxinas en el ventrículo e hígado de los animales afectados, que se resume en la siguiente figura:

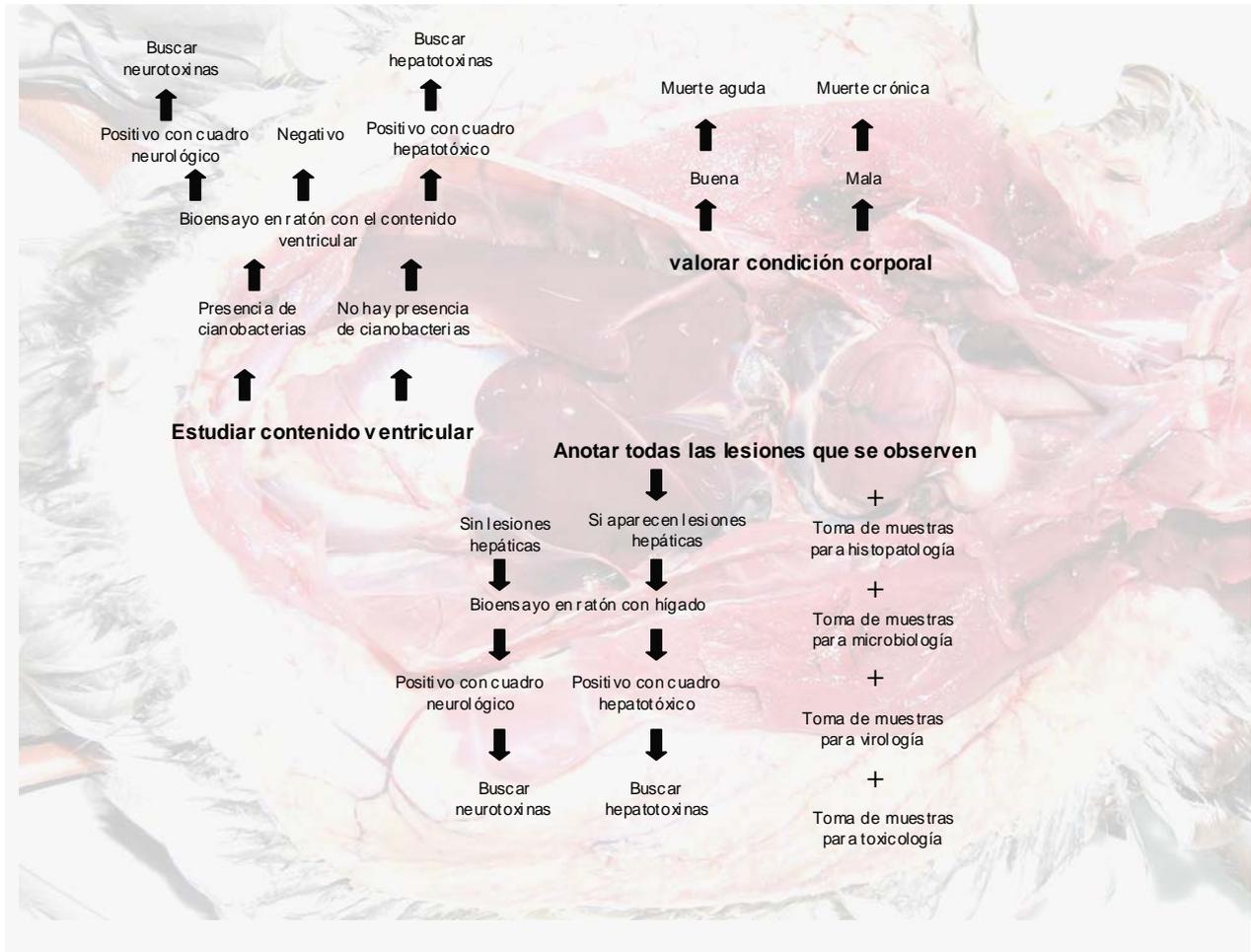


Figura 20. Pasos a seguir durante la necropsia.

Posteriormente, los bioensayos se han de confirmar también usando técnicas analíticas específicas, como son los enzimoimmunoanálisis que permitirán determinar la cianotoxina que se ha producido y su concentración. Para poder indicar que las cianotoxinas del agua son la causa de la mortandad se han de encontrar toxinas en los ventrículos y/o acumuladas en el hígado. Por otro lado, a lo largo de la necropsia se han de tomar muestras para estudios de histopatología, microbiología, virología y toxicología, ya que comprender las causas de las mortandades en masa de aves acuáticas debería enfocarse como una investigación multidisciplinar que abarque investigaciones en ecología, epidemiología, toxicología y patología.

Las intoxicaciones por cianobacterias deberían tenerse en cuenta como posible causa de mortalidades en masa de aves acuáticas, especialmente en sistemas acuáticos continentales

eutróficos. El procedimiento diagnóstico propuesto aquí es útil como herramienta para detectar mortalidades en aves acuáticas provocadas por cianobacterias en espacios naturales protegidos. Hay que incrementar la atención sobre el potencial impacto de las cianobacterias en la fauna salvaje y establecer una base de datos global que permita ofrecer a los conservacionistas la información necesaria para proteger las especies sensibles durante los brotes de cianobacterias tóxicas.

## 6. CONCLUSIONES

El desarrollo de esta tesis permite establecer las siguientes conclusiones:

1. La probabilidad de aparición de floraciones de cianobacterias en las Marismas de Doñana es claramente estacional y abarca un periodo que comprende desde el mes de mayo hasta octubre.
2. La distribución de las proliferaciones de cianobacterias tóxicas en las Marismas de Doñana se produce de forma agregada, siendo recurrente en los mismos sitios a lo largo de los cuatro últimos años.
3. La distribución de las proliferaciones de cianobacterias tóxicas está fuertemente asociada con las mortandades masivas ocurridas en las Marismas de Doñana durante los últimos cuatro años.
4. A pesar de la gran cantidad de datos dispersos en los registros del Parque Nacional de Doñana sobre mortandades en masa de fauna salvaje desde el año 1969, del análisis de los resultados sólo puede extraerse que estas mortandades fueron debidas a intoxicaciones alimentarias.
5. La mortandad de aves que sucedió en julio de 2004 en las Marismas de Doñana, fue el resultado de la ingestión por los animales de cianobacterias tóxicas de las especies *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flossaquae* y *Pseudoanabaena catenata*, habiendo encontrado en el ventrículo y en el hígado de las aves muertas cantidades letales de microcistina-LR.
6. La mortandad en masa de peces ocurrida en julio de 2005 en el Caño del Río Guadiamar, fue producida por la cianobacteria tóxica *Anabaena circinalis*, habiéndose encontrado en el hígado de los peces muertos dosis letales de saxitoxinas y siendo la primera vez que se describe esta toxina en aguas dulces en Europa.
7. A la vista de los resultados obtenidos, se considera de gran importancia para la conservación de la fauna salvaje el desarrollo de protocolos de alerta temprana que permitan la detección de proliferaciones de cianobacterias tóxicas en el medio natural, especialmente en los espacios naturales protegidos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

Abrantes, N., S. C. Antunes, M. J. Pereira, and F. Gonçalves. 2006. Seasonal succession of cladocerans and phytoplankton and their interactions in a shallow eutrophic lake (Lake Vela, Portugal). *Acta Oecologica* 29 (1): 54-64.

Alonso-Andicoberry, C., L. García-Villada, V. Lopez-Rodas, and E. Costas. 2002. Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *Veterinary Record* 151: 706-707.

Altamirano, M., L. García-Villada, M. Agrelo, L. Sánchez-Martín, L. Martín-Otero, A. Flores-Moya, M. Rico, V. López-Rodas, and E. Costas. 2004. A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants: an application to detect TNT. *Biosensors and bioelectronics*, 19: 1319-13123.

Álvarez Cobelas, M., P. Muñoz Ruiz, and A. Rubio Olmo. 1999. La eutrofización de las aguas continentales españolas. Henkel Iberica, S.A.

Araujo, M. B. 2003. The coincidence of people and biodiversity in Europe. *Global Ecology and Biogeography*, 12: 5-12.

Arthur, K. E., C. J. Limpus, C. M. Roelfsem, J. W. Udy, and G. R. Shaw. 2006. A proliferación of *Lyngbya majuscula* in Shoalwater Bay, Queensland, Australia: An important feeding ground for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Harmful Algae*, 5 (3): 251-265.

Azevedo, S. M. F. O., W. W. Carmichael, E. M. Jochimsen, K. L. Rinehart, S. Lau, G. R. Shaw, and G. K. Eaglesham. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, 181-182 (27): 441-446.

Banker, P. D., S. Carmeli, O. Hadas, B. Teltsch, R. Porat, and A. Sukenik. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret,

Israel. J. Phycol., 33: 613-616.

Baos, R., L. García-Villada, M. Agrelo, V. López-Rodas, F. Hiraldo, and E. Costas. 2002. Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *European Journal of Phycology*, 37: 593-600.

Bartram, J., W. W. Carmichael, I. Chorus, G. Jones, and O. M. Skulberg. 1999. Introduction. *In* Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 1-15.

Beattie, K. A., K. Kaya, T. Sano, and G. A. Cood. 1998. Three dehydrobutyryne (Dhb)-containing microcystins from the cyanobacterium *Nostoc* sp. *Phytochemistry* 47, 1289-1292.

Belfiore, N. M. and S. L. Anderson. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research* 489: 97-122.

Beltran, E. C. and B. A. Neilan. 2000. Geographical Segregation of the Neurotoxin-Producing Cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Appl Environ Microbiol.* 66(10): 4468-4474.

Bernis, F. 1974. Botulismo, plaguicidas y aves. *Ardeola*, 20: 199-220.

Berry, S. 2003. Endosymbiosis and the design of eukaryotic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1606 (1-3): 57-72.

Bischoff, K., and M. S. Dabvt. 2001. The toxicology of microcystin-LR: Occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. *Veterinary Human Toxicology*, 43: 294-297.

Bolch, C. J. S., S. I. Blackburn, G. J. Jones, P. T. Orr, and P. M. Grewe. 1997. Plasmid content and distribution in the toxic cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann (Cyanobacteria:

Chroococcales). *Phycologia*, 36: 6-11.

Bonnet, P., and M. Poulin. 2004. DyLEM-1D: a 1D physical and biochemical model for planktonic succession, nutrients and dissolved oxygen cycling. Application to a hyper-eutrophic reservoir. *Ecological Modelling*, 180 (2-3): 317-344.

Bradshaw, A. D., and K. Hardwick. 1989. Evolution and stress – genotype and phenotype components. *Biological Journal of the Linnean Society* 37: 137–155.

Braun, A., and T. Pfeiffer. 2002. Cyanobacterial proliferaciones as the cause of a Pleistocene large mammal assemblage. *Paleobiology*, 28: 139–154.

Briand, J. F., S. Jacquet, C. Bernard, and J. F. Humbert. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34: 361-377.

Carmichael, W. W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270: 78-86.

Carmichael, W. W. 1995. Cyanobacterial toxins. *In* Manual of Harmful Marine Microalgae. G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson and A. D. Cembella, (eds). IOC Manuals and Guides No 33, Paris, UNESCO. Pp. 163-176.

Carmichael, W. W., N. A. Mahmood, and E. G. Hyde. 1990. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). *En*: Hall, S., Strichartz, G. (Eds.), *Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*, ACS-Symposium Series 418, American Chemical Society, Washington D.C, pp. 87.

Carmichael, W. W., S. M. F. O. Azevedo, J. S. An, R. J. R. Molica, E. M. Jochimsen, S. Lau, K. L. Rinehart, G. R. Shaw, and G. K. Eaglesham. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.*, 109: 663–668.

Carpenter, E. J., D. G. Capone, and J. G. Reuter., (Eds). 1992. *Marine Pelagic Cyanobacteria:*

Trichodesmium and other Diazotrophs. NATO ASI Series C, Mathematical and Physical Sciences, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol. 362.

Carpintero S., J. Reyes-López, and L. Arias de Reyna. 2004. Impact of human dwellings on the distribution of the exotic Argentine ant: a case study in the Doñana National Park, Spain. *Biological Conservation*, 115 (2): 279-289.

Carrillo, E., L. M. Ferrero, C. Alonso-Andicoberry, A. Basanta, A. Martín, V. López-Rodas, and E. Costas. 2003. Interstrain variability in toxin production in populations of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from water-supply reservoirs of Andalusia and lagoons of Doñana National Park (southern Spain). *Phycologia*, 42: 269-274.

Castenholz, R. W., and J. B. Waterbury. 1989. Cyanobacteria. *En*: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt, Editors, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1710–1727.

Choi, H., B. Kim, J. Kim and M. Han. 2005. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the azardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters. *Biological Control*, 33(3): 335-343.

Chorus, I., and L. Mur. 1999. Preventative Measures. *En Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 235-274.

Codd, G. A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51–60.

Codd, G. A., I. Chorus, and M. Burch. 1999. Design of monitoring programmes. *En*: Chorus, I. y Bartram, J., Editors, 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water*, E and FN Spon, London, pp. 312–328.

Codd, G. A., L. F. Morrison, and J. S. Metcalf. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for

health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 264–272.

Cohen-Bazire G., R. Kunisawa, and N. Pfennig. 1969. Comparative Study of the Structure of Gas Vacuoles. *Journal Of Bacteriology*, 11: 1049-1061.

Costas, E., E. Carrillo, L. M. Ferrero, M. Agrelo, L. García-Villada, J. Juste, and V. López-Rodas. 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents. *Phycologia*, 40, 391-398.

Des Marais, D. J. 2000. When Did Photosynthesis Emerge on Earth?. *Science* 289(5485): 1703 – 1705.

Domingues, R. B., A. Barbosa, and H. Galvão. 2005. Nutrients, light and phytoplankton succession in a temperate estuary (the Guadiana, south-western Iberia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(2-3): 249-260.

Douglas, S. E. 1994. Chloroplast origins and evolution. *En: D.A. Bryant (ed.). The Molecular Biology of Cyanobacteria.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 91-118.

Dunton, P. G., and A. E. Walsby. 2005. The diameter and critical collapse pressure of gas vesicles in *Microcystis* are correlated with GvpCs of different length. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1): 37-43.

Ecobichon, D. J. 1996. Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Klaassen DC, Amdur MO, Doull J, eds). Boston:McGraw-Hill, 643-689.

Engström-Öst, J. 2002. Effects of cyanobacteria on plankton and planktivores. Walter and Andréa de Nottbeck. *Foundation Scientific Reports*, Helsinki, 29 pp.

Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales (E.B.D), CSIC, 2001; Oficina de Coordinación de la Investigación E.B.D, CSIC, 2002).

Espina, J., M. Mañez, y J. Perpiñá. 1981. Mortandad y aves recuperadas durante el verano de 1979 en las marismas del Parque Nacional de Doñana. XV Congreso Internacional de Fauna Cinegética y Silvestre. Trujillo. 267-278.

Fabricio, S., J. Blas, M. Forero, N. Fernández, J. A. Donázar, and F. Hiraldo. 2005. Preservation of wide-ranging top predators by site-protection: Black and red kites in Doñana National Park. *Biological Conservation*, 125(1): 11-21.

Falconer, I., J. Bartram, I. Chorus, T. Kuiper-Goodman, H. Utkilen, M. Burch, and G. A. Codd. 1999. Safe Levels And Safe Practices. *En Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 155-178.

Falconer, I., M. Dornbusch, G. Moran, and S. K. Yeung. 1992. Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon*, 30: 790–793.

Falkowski, P. G., and J. A. Raven. 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Malden, MA, USA: Blackwell Science.

Falkowski, P. G., and J. A. Raven. 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Malden, MA, USA: Blackwell Science.

Fernández, M. L., and A. D. Cembella. 1995. Part B. Mammalian Bioassays. *En: Manual on Harmful Marine Microalgae*. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. (eds.). IOC Manual Guides N°33 UNESCO.

Flores-Moya, A., E. Costas, E. Bañares-España, L. García-Villada, M. Altamirano, and V. López-Rodas. 2005. Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through preselective mutations. *New Phytologist*, 166: 655-661.

Formularios Oficiales Red Natura 2000. Elaboración: DGCN. MIMAM, Ministerio de Medio Ambiente.

Francis, G. 1878. Poisonous Australian lake. *Nature*, 18: 11-12.

Friend, M., and J. C. Franson. 1999. *Field Manual of Wildlife Diseases, General Field Procedures and Diseases of Birds*. USGS, Biological Resources Division, National Wildlife Health Center, U.S.A.

Furest, A., y J. Toja 1981. Ecosistemas acuáticos del Parque Nacional de Doñana: Distribución del zooplancton. I Simposio sobre el agua en Andalucía. Vol. 1: 151-165.

García-Villada, L., V. López-Rodas, E. Bañares-España, A. Flores-Moya, M. Agrelo, L. Martín-Otero, and E. Costas. 2002. Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene by rare preselective mutations. *Journal of Phycology*, 38: 1074-1081.

Gehringer, M. M. 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *Federation of European Biochemical Societies*, 557(1-3): 1-8.

Gilroy, D. J., K. W. Kauffman, R. A. Hall, X. Huang, and F. S. Chu. 2000. Assessing Potential Health Risks from Microcystin Toxins in Blue-Green Algae Dietary Supplements. *Environmental Health Perspectives* 108(5): 435-439.

Graham, L., and L. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice Hall Press. New Jersey.

Grimalt, J.O., M. Ferrer and E. MacPherson. 1999. Special issue: the mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci. Total Environ*, 242: 3-11.

Harada, K. I., I. Ohtani, K. Iwamoto, M. Suzuki, M. F. Watanabe, M. Watanabe, and K. Terao.

1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*, 32: 73-84.

Harada, K., F. Kondo, and L. Lawton. 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. *En Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 369-405.

Havens, K. E., R. T. James, T. L. East, and V. H. Smith. 2003. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution*, 122: 379–390.

Hidalgo, J. 1974. Sobre la mortandad masiva de aves en las marismas del Guadalquivir durante el verano de 1973. *Ardeola* 20: 187-197.

Humpage, A. R., J. Rositano, A. H. Breitag, R. Brown, P. D. Baler, W. C. Nicholson, and A. D. Steffensen. 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial proliferaciones. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 45: 761–777.

Huynh-Delerme C., M. Edery, H. Huet, S. Puiseux- Dao, C. Bernard, J.-J. Fontaine, F. Crespeau, and A. de Luzc. 2005. Microcystin-LR and embryo–larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems. *Toxicon*, 46(1): 16-23.

IGME (Instituto Geológico y Minero de España). 2006. Dirección de Hidrogeología y Aguas Subterráneas. [http://aguas.igme.es/zonas\\_humedas/donana.htm](http://aguas.igme.es/zonas_humedas/donana.htm).

ITGE (Instituto Tecnológico GeoMinero). 1992. Hidrogeología del Parque Nacional de Doñana y su Entorno. Publ. Min. Industria y Energía, Madrid, 64 pp.

Ito, E., and H. Nagai. 1998. Morphological observations of diarrhea in mice caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning in Hawaii. *Toxicon*, 36: 1913-1920.

- Ito, E., F. Kondo, and K. Harada. 2000. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon*, 38 : 37-48.
- Ito, E., F. Kondo, and K.-I. Harada. 1997. Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon*, 35: 231-239.
- Jacquet S., J.-F. Brianda, C. Leboulanger, C. Avois-Jacquet, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, G. Paolini, J.-C. Druart, O. Anneville, and J.-F. Humbert. 2005. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae*, 4(4): 651-672.
- Jochimsen, E. M., W. W Carmichael, J. S. An, D. M. Cardo, S. T. Cookson, C. E. Holmes, M. B. Antunes, D. A. de Melo Filho, T. M. Lyra, V. S. Barreto, S. M. Azevedo, and W. R. Jarvis. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.*, 338: 873–878.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, 2nd edn. New York, USA: Cambridge University Press.
- Kitchell, J. F., D. E. Schindler, B. R. Herwig, D. M. Post, and M. H. Olson. 1999. Nutrient cycling at the landscape scale: the role of diel foraging migrations by geese at the Bosque del Apache National Wildlife Refuge, New Mexico. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 828-836.
- Krienitz, L., A. Ballot, K. Kotut, C. Wiegand, S. Pütz, J. S. Metcalf, G. A. Codd, and S. Pflugmacher. 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *Microbiology Ecology*, 43: 141-148.
- Kuiper-Goodman, T., I. Falconer, and J. Fitzgerald. 1999. Human health aspects. *En Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 113-153.

- Lanzarot, M. P., V. López-Rodas, y N. Perdignes. Curso de Necropsia y Toma de Muestras en Fauna Salvaje. Gabinete de Formación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), celebrado en la Reserva Nacional de Doñana los días 25, 26 y 27 de abril de 2005.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin, 506 p.
- Lawton, L., B. Marsalek, J. Padisák, and I. Chorus. 1999. Determination Of Cyanobacteria In The Laboratory. *En Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 347-367.
- Lee, J. H. W., I. J. Hodgkiss, K. T. M. Wong, and I. H. Y. Lam. 2005. Real time observations of coastal algal blooms by an early warning system. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65(1-2): 172-190.
- Lee, R. E. 1999. *Phycology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 645 pp.
- León, L., A. Miranda, J. Carranza, A. Perca y M. Hermoso de Mendoza. 1981. Aspectos de botulismo aviar en la marisma del Guadalquivir. *Actas de la II Reunión Iberoamericana sobre conservación y zoología de vertebrados*. Cáceres.
- Li, R., and M. M. Watanabe. 2001. Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes. *Phytochemistry*, 57(5): 727-731.
- Liu, Y., W. Chen, D. Li, Y. Shen, G. Li, and Y. Liu. 2005. First report of aphanotoxins in China—waterblooms of toxigenic *Aphanizomenon flos-aquae* in Lake Dianchi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- López T., J. Román, y J. Toja. 1993. Las diatomeas de los sedimentos de las lagunas de Santa Olalla y Dulce (P. N. Doñana). *Actas VI Congreso Español de Limnología*, Granada, mayo de 1993: 291 - 297.

- López T., J. Toja, and N. A. Gabellone. 1991. Limnological comparison of two peridunar ponds in the Doñana National Park (Spain). *Arch. Hydrobiol.* 120: 357-378.
- Luck, G. W., T. H. Ricketts, G. C. Daily, and M. Imhoff. 2004. Alleviating spatial conflict between people and biodiversity. *PNAS*, vol. 101 pp. 182–186.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 1999. *Biología de los microorganismos*. Octava edición revisada, Prentice Hall, España. Pp. 1060.
- Maier, H. R., G. C. Dandy, and M. D. Burch. 1998. Use of artificial neural networks for modelling cyanobacteria *Anabaena* spp. in the River Murray, South Australia. *Ecological Modelling*, 105(2-3): 257-272.
- Malbrouck, C., G. Trausch, P. Devos, and P. Kestemont. 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(1): 39-48.
- Manny, B. A., W. C. Johnson, and R. G. Wetzel. 1994. Nutrient additions by waterfowl to lakes and reservoirs: predicting their effects on productivity and water quality. *Hydrobiologia*, 279/280: 121-132.
- Margalef, R. 1969. Comunidades planctónicas en las aguas litorales. In: Ayala-Castañares, A. and Phleger, F.B., Editors, 1969. *Lagunas Costeras, un Simposio*. Mem. Simp. Intern. Lagunas Costeras. UNAMUNESCO, Nov 28–30, 1967, Univ. Nal. Autón, México, D.F., pp. 545–562
- Margalef, R. 1982. *Ecología*. Omega. Barcelona, 1974, Pp 951.
- Margalef, R. 1983. *Limnología*. Omega, Barcelona. Pp. 1010.
- Margulis, L., and K. V. Schwartz. 1999. *Five Kingdoms*. W.H. Freeman and Company. New York .

Matsunaga, H., K. I. Harada, M. Senma, Y. Ito, N. Yasuda, S. Ushida, and Y. Kimura. 1999. Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: sudden appearance of toxic cyanobacteria. *Natural Toxins* 7: 81-84.

McBarron, E. J., R. I. Walker, I. Gardner, and K. H. Walker. 1975. Toxicity to livestock of the blue-green algae *Anabaena circinalis*. *Aust Vet J.*, 51(12): 587-588.

Ministerio de Medio Ambiente. 2006. <http://www.mma.es/parques/lared/donana/visita/marisma.htm>

Mitchell, S. F., and R. T. Wass. 1995. Food consumption and faecal deposition of plant nutrients by black swans (*Cygnus atratus* Latham) in a shallow New Zealand lake. *Hydrobiologia*, 306: 189-197.

Mukherjee, A., and C. K. Borad. 2001. Effects of waterbirds on water quality. *Hydrobiologia*, 464: 201-205.

Muñoz-Reinoso, J. C. 2001. Vegetation changes and groundwater abstraction in SW Doñana, Spain. *Journal of Hydrology*, 242: 197-209.

Muñoz-Reinoso, J. C., and F. J. de Castro. 2005. Application of a statistical water-table model reveals connections between dunes and vegetation at Doñana. *Journal of Arid Environments*, 60(4): 663-679.

Mur, L. R., O. M. Skulberg, and H. Utkilen. 1999. Cyanobacteria in the environment. *En Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 15-40.

Muylaert, K., S. Declerck, J. Van Wichelen, L. De Meester, and W. Vyverman. 2006. An evaluation of the role of daphnids in controlling phytoplankton biomass in clear water versus turbid shallow lakes. *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters*, 36: 69-78.

Mwaura, F., A. O. Koyo, and B. Zech. 2004. Cyanobacterial blooms and the presence of cyanotoxins in small high altitude tropical headwater reservoirs in Kenya. *J Water Health*, 2(1): 49-57.

Neal, C., J. Hilton, A. J. Wade, M. Neal, and H. Wickham. 2006. Chlorophyll-a in the rivers of eastern England. *Science of The Total Environment*, 365(1-3): 84-104.

Noga, E. J. 2000. *Fish Disease, Diagnosis and Treatment*. Mosby-Year Book, Inc. pp 367.

Ohtani, I., R. E. Mooreand, and M. T. C. Runnegar. 1992. Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 114: 7941-7942.

Oren, A. 2004. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 54: 1895-1902.

Paerl, H. W., J. Tucker, and P. T. Bland. 1983. Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. *Oceanogr*. 28: 847-857.

Palomares, F., E. Revilla, J. Calzada, N. Fernández, and M. Delibes. 2005. Reproduction and pre-dispersal survival of Iberian lynx in a subpopulation of the Doñana National Park. *Biological Conservation*, 122(1): 53-59.

Park, H., M. Namikoshi, S. M. Brittain, W. W. Carmichael, and T. Murphy. 2001. [<sup>14</sup>C-Leu<sup>1</sup>] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. *Toxicon*, 39: 855-862.

Pérez, S., and D. S. Aga. 2005. Recent advances in the sample preparation, liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(7): 658-670.

- Pérez-Cabrera, J., y J. Toja. 1989. Introducción al conocimiento de las comunidades de ciliados existentes en la zona de la Laguna de Santa Olalla (Parque Nacional de Doñana). *Oxyura*, vol. V, 1: 5-29.
- Pettigrew, C. T., B. J. Hann, and L. G. Goldsborough. 1998. Waterfowl feces as a source of nutrients to a prairie wetland: responses of microinvertebrates to experimental additions. *Hydrobiologia*, 362: 55-66.
- Plata-Torres, J. L., y F. M. Rubio-Sánchez-Aguililla. 2003. Avance de los trabajos geofísicos últimamente realizados en el acuífero almonte-marismas (Doñana). Tecnología de la intrusión de agua de mar en acuíferos costeros: países mediterráneos. Instituto Geológico y Minero de España. Pp 177-185.
- Porat, R., B. Teltsch, R. A. Mosse, Z. Dubinsky, and A. E. Walsby. 1999. Turbidity changes caused by collapse of cyanobacterial gas vesicles in water pumped from lake Kinneret into the Israeli national water carrier. *Water Research*, 33(7): 1634-1644.
- Post, D. M., J. P. Taylor, J. F. Kitchell, M. H. Olson, D. E. Schindler, and B. R. Herwig. 1998. The role of migratory waterfowl as nutrient vectors in a managed wetland. *Conservation Biology*, 12: 910-920.
- Rabouille, S., J. Thébault, and M. Salençon. 2003. Simulation of carbon reserve dynamics in *Microcystis* and its influence on vertical migration with Yoyo model. *Comptes Rendus Biologies*, 326(4): 349-361.
- Rai, A. N. 1990 *CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria*. CRC Press, Boca Raton, 253 pp.
- Reina M., J. L. Espinar, and L. Serrano. 2006. Sediment phosphate composition in relation to emergent macrophytes in the Doñana Marshes (SW Spain) *Water Research* Volume 40, Issue 6 , March 2006, Pages 1185-1190.

- Rejmánková, E., and J. Komárková. 2005. Response of cyanobacterial mats to nutrient and salinity changes. *Aquatic Botany*, 83(2): 87-107.
- Reynolds, C. S., V. Huszar, C. Kruk, L. Naselli-Flores, and S. Melo. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton *Journal of Plankton Research*, 24: 417-428.
- Rico, M., M. Altamirano, V. López-Rodas, and E. Costas. 2004. Analysis of polygenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strains by Restricted Maximum Likelihood (REML) procedures: 1. Size and shape of colonies and cells. *Phycologia*.
- Robertson, A., D. Stirling, C. Robillot, L. Llewellyn, and A. Negri. 2004. First report of saxitoxin in octopi. *Toxicon*, 44: 765–771.
- Rocha, C., H. Galvão, and A. Barbosa. 2002. Role of transient silicon limitation in the development of cyanobacteria blooms in the Guadiana estuary, south-western Iberia, *Marine Ecology Progress Series*, 228: 35–45.
- Rodríguez, J. 2004. *Ecología*. Editorial Pirámide, Madrid, España.
- Roelke, D., Y. Buyukates, M. Williams, and J. Jean. 2004. Interannual variability in the seasonal plankton succession of a shallow, warm-water lake. *Hidrobiología*, 513: 205–218.
- Roset, J., S. Aguayo, y M. J. Muñoz. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol.* 18: 65-71.
- Ruiz, F., Antonio Rodríguez-Ramírez, Luis M. Cáceres, Joaquín Rodríguez Vidal, María Isabel Carretero, M. Abad, M. Olías, and M. Pozo. 2005. Evidence of high-energy events in the geological record: Mid-holocene evolution of the southwestern Doñana National Park (SW Spain). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 229 (3): 212-229.
- Runnegar, M. T., S. Kong, and N. Bernot. 1993. Protein phosphatase inhibit and in vivo

hepatotoxicity of microcystins. *American Journal Physiology*, 265: 224-230.

Sagan, L. 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14: 225-274.

Samsonoff, W. A., and R. MacColl. 2001. Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat. *Arch Microbiol.*, 176(6): 400-5.

Scharlemann, J. P. W., R. E. Green, and A. Balmford. 2004. Land-use trends in endemic bird areas: global expansion of agriculture in areas o high conservation value. *Global Change Biology*, 10: 2046-2051.

Schembri, M. A., B. A. Neilan, and C. P. Saint. 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Environ. Toxicol.* 16: 413–421.

Schopf, J. W. 1993. Microfossils of the early Archean apex chert: New evidence of the antiquity of life, *Science* 260: 640–646.

Serrano L., R. M. Lamelas, J. Jáuregui, and J. Toja. 1994. Daily variations in two ponds with different mixing dynamics in the Doñana National Park (SW Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25: 1345-1349.

Short, S. B., and W. C. Edwards. 1990. Blue-Green algae Toxicoses in Oklahoma. *Vet. Hum. Toxicol.* 32: 558-560.

Shumway S. E., S. M. Allen, and P. Dee Boersma. 2003. Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events?. *Harmful Algae*, 2: 1–17.

Sitte, P., E. R. Weiler, J. W. Kadereit, A. Bresinsky, and C. Korner. 2004. Strasburger. *Tratado de Botánica*. 35ª edición, Editorial Omega. Barcelona.

Sivonen, K., and G. Jones. 1999. *In Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health*

consequences, monitoring and management. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 41-112.

Skulberg, O. M., W. W. Carmichael, G. A. Codd, and R. Skulberg. 1993. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In: Falconer (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, pp. 145.

Skulberg, O. M., W. W. Carmichael, G. A. Codd, and R. Skulberg. 1993. Taxonomy of toxic *Cyanophyceae* (Cyanobacteria). In I. Falconer editor. *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press, San Diego. Pp. 145-161.

Sleep, N. 2001. Oxygenating the atmosphere. *Nature*, 410: 317-319.

Smarda J., D. Smajs, J. Komrska, and V. Krzyžánek. 2002. S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron*, 33(3): 257-277.

Sommer, U. 1989. The role of competition for resources in plankton succession. In: U. Sommer (Ed.) *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*. Springer Verlag, New York, 57-106.

Stielow, S., and D. L. Ballantine. 2003. Benthic cyanobacterial, *Microcoleus lyngbyaceus*, blooms in shallow, inshore Puerto Rican Seagrass habitats, Caribbean sea. *Harmful Algae*, 2: 127-133.

Suda, S., M. M. Watanabe, S. Otsuka, A. Mahakahant, W. Yongmanitchai, N. Nopartnaraporn, Y. Liu, and J. G. Day. 2002. Taxonomic revision of water-proliferación-forming species of oscillatoriod cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1577–1595.

Toja, J., T. López, and N. Gabellone. 1991. Successional changes in two dune ponds (Doñana National Park). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 1556-1559.

Toja, J., T. López, and N. Gabellone. 1997. Limnology of the permanent dune ponds in Doñana

National Park (Spain). The ecology and conservation of European dunes.

Tovar-Sanchez, A., M. A. Huerta-Diaz, J. J. Negro, M. A. Bravo, and S. A. Sañudo-Wilhelmy. 2006. Metal contamination in interstitial waters of Doñana Park. *Journal of Environmental Management*, 78(3): 286-293.

Ueno, Y., S. Nagata, T. Tsutsumi, A. Hasegawa, M. Watanabe, H. D. Park, G.-C. Chen, G. Chen, and S.-Z Yu. 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17: 1317- 1321.

Utkilen, H., J. Fastner, and J. Bartram. 1999. Fieldwork: Site Inspection And Sampling. *En Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram (eds.). London, E. & F. N. Spon, pp. 329-347.

Vezie, C., L. Briant, K. Sivonen, G. Bertru, J. C. Lefeuvre, and M. Salkinoja-Salonin. 1998. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grad Lieu (France). *Microbial Ecology*, 35: 126-135.

Walsby, A. E., A. Avery, and F. Schanz. 1998. The critical pressures of gas vesicles in *Planktothrix rubescens* in relation to the depth of winter mixing in Lake Zurich, Switzerland. *Journal of Plankton Research*, 20(7): 1357-1375.

Walsby, A. E., and P. K. Hayes. 1989. Review Article. Gas vesicle proteins. *Biochem. J.* 264: 313-322.

Watanabe, M. F., H-D. Park, F. Kondo, K-I. Harada, H. Hayashi, and T. Okino. 1997. Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. *Nat. Toxins*, 5: 31-35.

Whitton, B. A. 1992 Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: N.H. Mann and N.G. Carr [Eds] *Photosynthetic Prokaryotes*. Plenum Press, New York, pp. 1-51.

WHO. 1998. Guidelines for Drinking Water Quality, 2nd ed. Addendum to Vol 2, Health Criteria and Other Supporting Information. Geneva:World Health Organization.

Wiegand C., and S. Pflugmacher. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3): 201-218.

Williams, M. 1977. Stereological techniques. En: *Practical methods in electron microscopy*. Glavert A. M. (ed.). north Holland American Elsevier, Amsterdam. Pp.1- 216.

Yu, S. Z. 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10: 674–682.

Zsiros, O., S. I. Allakhverdiev, S. Higashi, M. Watanabe, Y. Nishiyama, and N. Murata. 2006. Very strong UV-A light temporally separates the photoinhibition of photosystem II into light-induced inactivation and repair *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1757(2): 123-129.

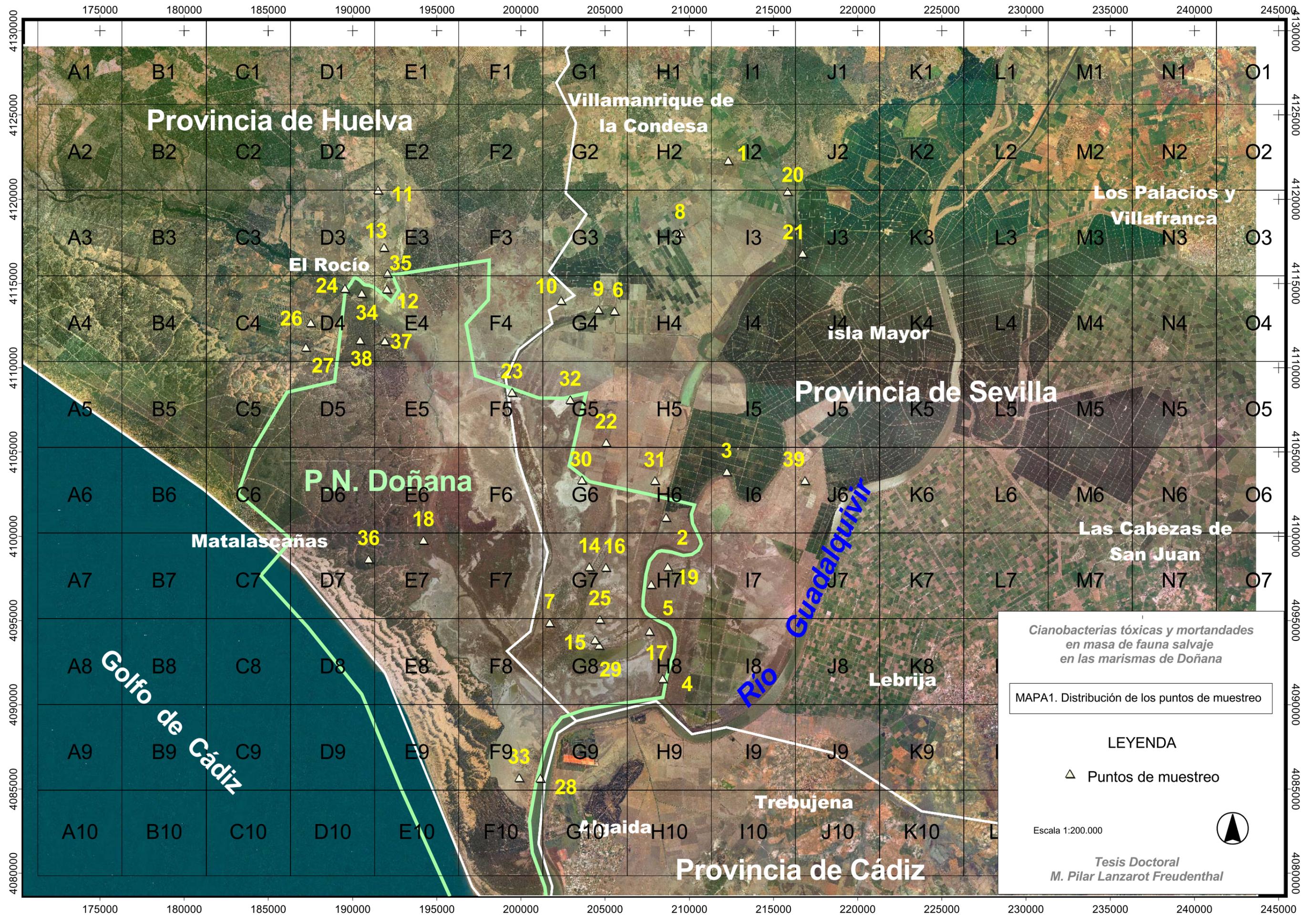
Zurawell, R. W., H. Chen, J. M. Burke, and E. E. Prepas. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*, 8(1):1-5.

## ANEXO DE MAPAS

Mapa 1: Distribución de los puntos de muestreo de los datos actuales.

Mapa 2: Distribución de los puntos con presencia y ausencia de cianobacterias de los datos actuales.

Mapa 3: Distribución de las mortandades (datos históricos).



Provincia de Huelva

Villamanrique de la Condesa

Los Palacios y Villafranca

Isla Mayor

Provincia de Sevilla

P.N. Doñana

Matalascañas

Las Cabezas de San Juan

Golfo de Cádiz

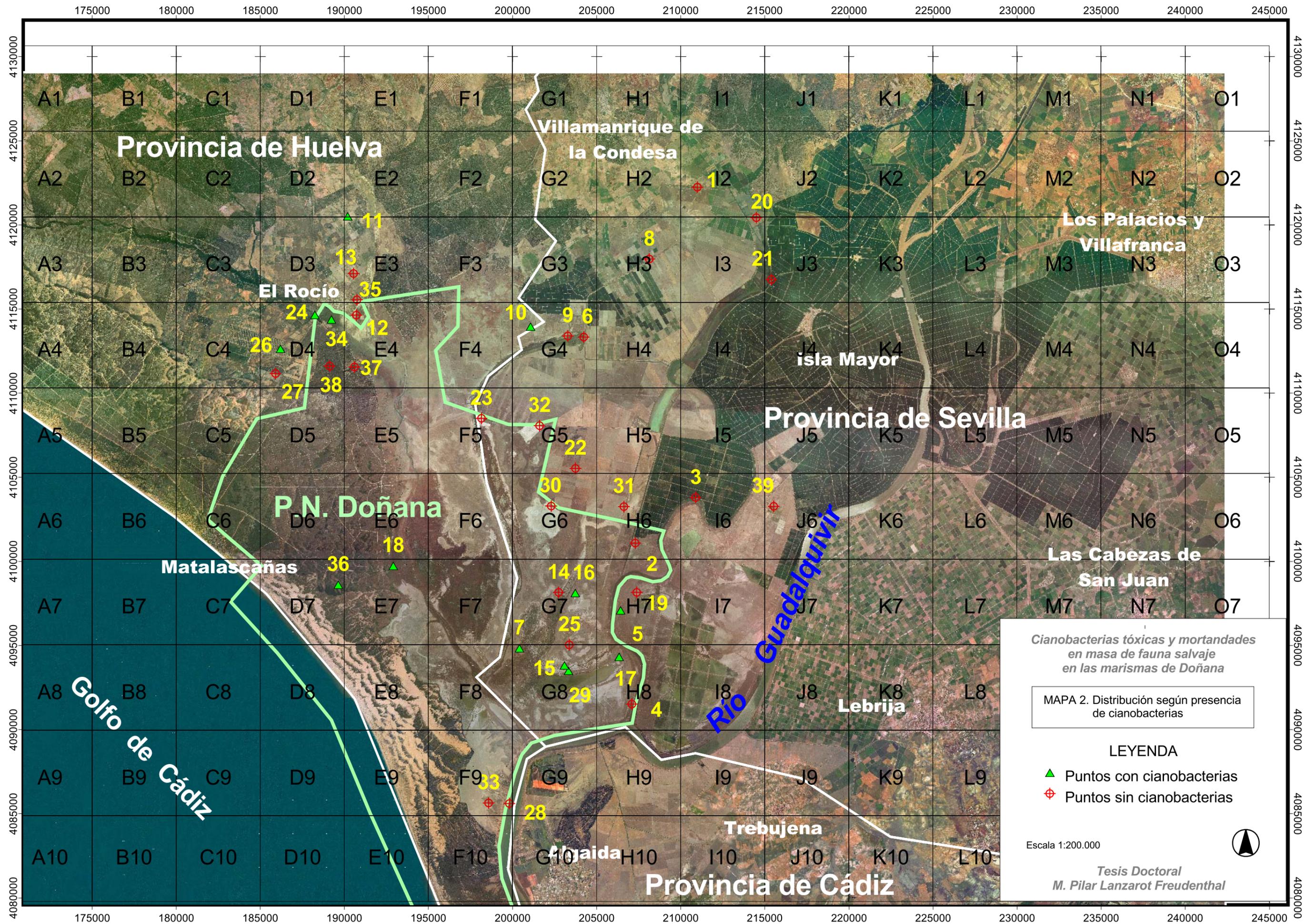
Río Guadalquivir

Lebrija

Trebujena

Aljaraque

Provincia de Cádiz



Provincia de Huelva

Villamanrique de la Condesa

Los Palacios y Villafranca

Isla Mayor

Provincia de Sevilla

P.N. Doñana

Matalascañas

Las Cabezas de San Juan

Golfo de Cádiz

Rio Guadalquivir

Lebrija

Trebujena

Aljaraque

Provincia de Cádiz

