

Cianoalerta: estrategia para predecir el desarrollo de cianobacterias tóxicas en embalses

E. Forján Lozano, M.J. Domínguez Vargas, C. Vilchez Lobato¹, R. Miguel, C. Costa, M.P. Reis²

(1) Grupo Bioquímica y Biotecnología de Algas. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. Campus del Carmen. 21071. Huelva. España.

(2) Facultad de Ciencias Marinas y de Medio Ambiente. Universidad del Algarve. 8005 - 139. Faro. Portugal.

➤ Recibido el 23 de abril de 2007, aceptado el 24 de enero de 2008.

Cianoalerta: estrategia para predecir el desarrollo de cianobacterias tóxicas en embalses. La eutrofización de los pantanos destinados al abastecimiento de agua de consumo humano supone un deterioro de la calidad de la misma, e incluso puede afectar a la salud de los consumidores. Éste es el caso de la presencia de la hepatotoxina microcistina, producida fundamentalmente por la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*. A través de los proyectos Cianoalerta hemos desarrollado métodos para la pronta detección de blooms específicos de cianobacterias, necesarios para llevar a cabo un adecuado tratamiento del agua, evitando el suministro de un producto de baja calidad a los consumidores. El análisis de la evolución estacional de cianopigmentos, y su correlación con la abundancia y dinámica de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos ha permitido concluir que la evolución estacional de zeaxantina y beta-caroteno presenta una dinámica muy similar a la evolución observada de las poblaciones de las cianobacterias *Oscillatoria* spp, *Anabaena* spp. y formas cocoides de cianobacterias, y diferente a la evolución de *Microcystis* spp. De acuerdo con nuestros resultados, estos fotopigmentos podrían emplearse como indicadores de la proliferación de estas poblaciones.

Palabras clave: cianotoxinas, microcistina, bloom, carotenoides, zeaxantina

Cianoalerta: a strategy to predict the development of toxic cyanobacterial blooms in water reservoirs. Eutrofization of reservoirs supplying drinking water deteriorates water quality, and may affect consumer's health. This is the case of the hepatotoxin microcystin, which is produced by the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Within the framework of Cianoalerta projects we have developed methods for the prompt detection of specific cyanobacteria blooms, a crucial step towards efficient water treatment, thus improving the quality of the product supplied. Seasonal changes in zeaxanthin and beta-carotene paralleled those shown by the cyanobacteria *Oscillatoria* spp, *Anabaena* and coccoid forms of cyanobacteria, but were different from those shown by *Microcystis*. According to our results, these photopigments can be used as indicators of the dynamics of these cyanobacterial populations.

Keywords: cyanotoxins, microcystin, bloom, carotenoids, zeaxanthin

Introducción

Las cianobacterias comprenden un grupo de microorganismos presentes en ecosistemas terrestres, de agua dulce y salada, fundamentales como productores primarios. Constituyen aproximadamente 150 géneros que engloban a 2000 especies. La mayoría presentan un metabolismo fotoautotrófico y aeróbico. Su ciclo vital sólo requiere agua, CO₂, sustancias inorgánicas y luz, lo que les permite crecer en medios muy simples. Las especies capaces de fijar el nitrógeno atmosférico contribuyen a la fertilización del suelo y agua (Rai, 1990). Otras son importantes desde el punto de vista económico, al ser fuentes de compuestos de interés como carotenoides y antibióticos (Falch *et al.*, 1995). Finalmente, algunas especies se utilizan en alimentación por su alto contenido en proteínas, vitaminas y otros factores de crecimiento, como es el caso de *Spirulina* (Borowitzka *et al.*, 1988).

Sin embargo, las cianobacterias pueden provocar importantes problemas ambientales, con posibles implicaciones en la salud humana. Así, en aguas eutrofizadas o ricas en nutrientes, nitrógeno y especialmente fósforo, y cuando la intensidad de luz es

alta, pueden multiplicarse de forma profusa, originando desarrollos explosivos, floraciones o *blooms*. Las cianobacterias presentan gran capacidad para obtener nitrógeno y fósforo del medio (algunas especies pueden utilizar el nitrógeno gaseoso disuelto en el agua). Además, las cianobacterias muestran una gran capacidad de almacenamiento de P, elemento limitante de la producción en sistemas acuático continentales ('estrategia de consumo de lujo'). En algunos casos el P almacenado les permite llevar a cabo de 2 a 4 divisiones celulares (Scheurs, 1992). Por todo ello, son enormemente competitivas en estos ambientes.

La eutrofización representa un problema ambiental reconocido desde la mitad del siglo XX (Rohde, 1969). Puede provocar el deterioro del medio acuático, agotando el oxígeno disuelto, provocando mortalidad de peces y otros organismos, facilitando la liberación de sustancias tóxicas previamente fijadas en los sedimentos, y contaminando el agua para consumo humano. Este proceso puede producirse de forma natural e irreversible; pero lo más frecuente es que su origen sea antrópico, bien por descargas de aguas residuales, bien por el lixiviado de fertilizantes procedentes de explotaciones agrícolas. En este caso, la tasa es incomparablemente más rápida, y el proceso puede llegar a ser reversible si se eliminan las condiciones que lo propiciaron.

Un aumento en la concentración de nutrientes, junto a factores coadyuvantes como elevadas temperatura e intensidad de luz, entre otros, pueden originar un desarrollo explosivo de cianobacterias. La temperatura óptima para el desarrollo de estos *blooms* es de, aproximadamente, 25°C, lo que permite que en climas templados se den con mayor frecuencia a finales de primavera, verano y principios del otoño (Robarts *et al.*, 1987). Por otro lado, la capacidad de adaptación que tienen las cianobacterias para crecer a intensidades de luz bajas y altas favorece la aparición de carotenoides, fitopigmentos de carácter fotoprotector. Además de la estabilidad de las poblaciones, otro de los factores que incidirán sobre la formación de *blooms*, es la capacidad que poseen las cianobacterias para formar vesículas de gas, útiles para situarse a distintas alturas en la columna de agua, asegurándose unas condiciones óptimas de crecimiento (Walsby, 1987).

El *bloom* de especies capaces de producir toxinas en aguas destinadas al consumo o uso recreativo, puede generar graves problemas para la salud. Como se observa en la **Tabla 1**, existen cianotoxinas de actividad neurotóxica, hepatotóxica o tóxica G-I, producidas por diversidad de géneros, muchos de los cuales están presentes en los *blooms* de nuestros embalses. De todas ellas, las más importantes son las microcistinas, producidas fundamentalmente por especies de *Microcystis*, especialmente *Microcystis aeruginosa*, y de la cual se conocen más de 50 variantes.

Tabla 1. Principales toxinas producidas por cianobacterias.

Toxina	Actividad	Géneros	Estructura	Nº Variantes
Anatoxina-a	Neurotoxina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Microcystis</i>	Alcaloide	1
Toxinas PSP (Saxitoxinas)	Neurotoxina	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i>	Alcaloide	Al menos 8
Nodularina	Hepatotoxina	<i>Nodularia</i>	Pentapéptido cíclico	6
Microcistinas	Hepatotoxina	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i>	Heptapéptido cíclico	Más de 50
Cilindrospermin	Hepatotoxina	<i>Cylindrospermopsis</i>	Alcaloide cíclico	1
LPS	Toxicidad G-I	Muchos géneros	Lipopolisacárido	Al menos 3

Fuente: OMS (1993). Guidelines for drinking-water quality.

La OMS ha establecido unos niveles de vigilancia y alerta para la presencia de cianobacterias en aguas de consumo, y niveles guía en aguas de baño (**Fig. 1**). En aguas de consumo, la Alerta de Nivel 1 se alcanza con 2000 células/ml ó 1 µg/l de

clorofila a; en este caso se tendrá que establecer un programa de monitorización de la biomasa de cianobacterias y análisis de toxinas. La Alerta de Nivel 2 se alcanza cuando ya la captación está eutrofizada y con toda seguridad se da una presencia confirmada de cianotoxinas, lo que requerirá unos tratamientos efectivos en las estaciones de tratamiento. En este caso no se deberán usar algicidas, pues se produciría la destrucción de las cianobacterias y la consiguiente liberación de toxinas, debiendo usarse procedimientos como la filtración por carbón activo y sistemas combinados de coagulación-floculación. La OMS estableció que el valor máximo de Microcistina-LR en aguas susceptibles de ser transformadas en agua potable sea de 1,0 $\mu\text{g/l}$, y es este valor el que aparece en el Real Decreto 140/2003, actual legislación vigente en nuestro país sobre aguas potables de consumo público, que indica, además, que este parámetro analítico deberá determinarse cuando se sospeche de eutrofización en la captación a la salida de la estación de tratamiento o en el depósito de cabecera.

Por la importancia de la presencia de cianobacterias en aguas destinadas al uso humano, y la necesidad de desarrollar indicadores rápidos y fiables que permitan la adopción eiciente demedidas de control, hemos llevado a cabo un estudio de las variaciones en los fotopigmentos en aguas de embalses del Algarve (Portugal) y Huelva (España) y de su relación con la presencia de diversas cianobacterias representativas.

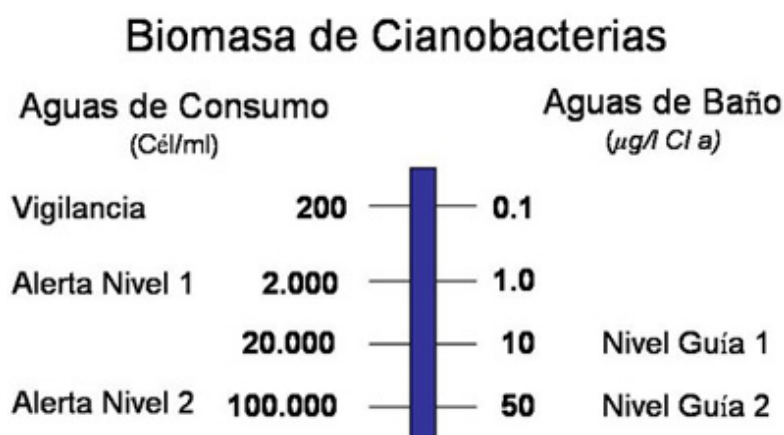


Figura 1. Niveles de vigilancia y alerta para la presencia de cianobacterias en aguas de consumo y niveles guía en aguas de baño. Fuente: OMS (1993). *Guidelines for drinking-water quality*.

Metodología

Se desarrolló y optimizó la metodología necesaria para la determinación cualitativa y cuantitativa de fotopigmentos presentes en el material biológico de las muestras de agua de los embalses y canalizaciones, fundamentalmente clorofilas y carotenoides. El análisis de los resultados obtenidos, y su correlación con el contenido en biomasa y abundancia de las distintas poblaciones de cianobacterias fotosintéticas permitirá establecer un método de bioindicación que pueda estimar de forma indirecta y precisa la presencia de dichas poblaciones.

Filtración y pretratamiento de muestras

Las muestras de agua fueron filtradas a través de membranas de 0,45 μm con objeto de retener el material biológico. Los filtros de membrana se dejaron en presencia de metanol, utilizado como extractante, durante toda la noche y en oscuridad. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm y se filtraron a través de filtros Millex®-HV de 0,22 μm , quedando dispuestas para el posterior análisis cromatográfico.

Determinación de clorofilas y carotenoides

Las clorofilas a, b, total y carotenoides totales también se cuantificaron siguiendo el procedimiento descrito por Wellburn (1994). Los carotenoides específicos zeaxantina y β -caroteno se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según modificación del método descrito por Young et al. (1997), que se detalla a continuación. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo HPLC Merck-Hitachi L-7100, provisto de un detector UV-Visible de la misma casa comercial, modelo L-7420. La columna usada fue una LichroCart® RP18 (5 μm), tamaño 250 x 4 mm. Las fases móviles utilizadas en la separación fueron una mezcla de acetonitrilo-agua 9:1 (A) y acetato de etilo puro (B). La columna fue previamente equilibrada con la fase A. El volumen de inyección fue de 20 μl . Los carotenoides se eluyeron de la columna a un flujo de 1 ml/min de acuerdo con el siguiente programa: 0', 100 % A; 0'-10' gradiente lineal hasta 50 % A; 10'-15', gradiente lineal hasta 40 % A;

15'-20', gradiente lineal hasta 35 % A; 20'-25', gradiente lineal hasta 24 % A; 32', 100 % A. La longitud de onda para la detección de los carotenoides se ajustó a 450 nm. Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC, pertenecientes a la casa comercial Panreac®. Los patrones utilizados en la determinación y cuantificación de clorofilas y carotenoides específicos se adquirieron a DHI® Water and Environment. En la **Figura 2** se muestra un cromatograma obtenido, en el que se detallan los picos correspondientes a cada uno de los fotopigmentos analizados.

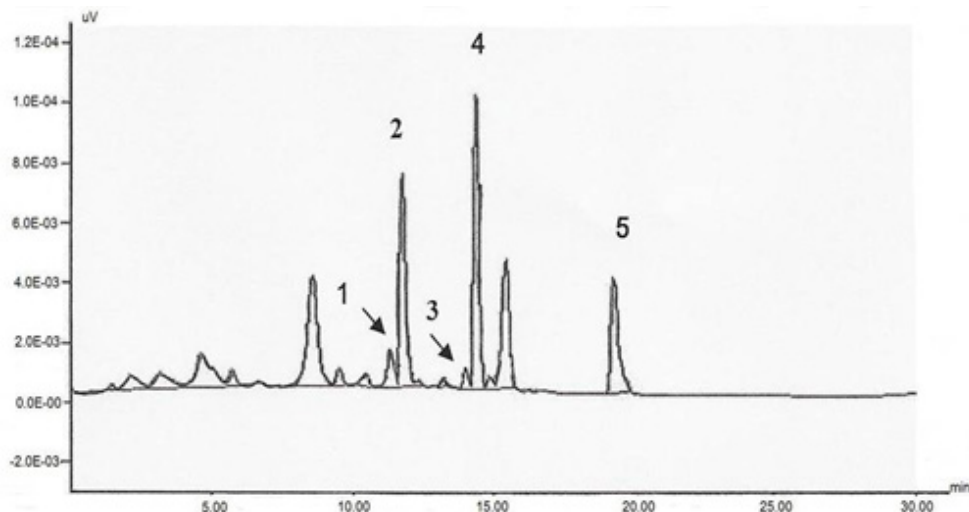


Figura 2. Cromatograma ejemplo obtenido en el que se detallan los picos correspondientes a cada uno de los fotopigmentos identificados. 1: Luteína. 2: Zeaxantina. 3: Clorofila b. 4: Clorofila a. 5: Beta-Caroteno.

El primer paso en el diseño de un programa de monitorización de la presencia de cianobacterias en abastecimientos de agua de consumo humano ha de ser la identificación y selección adecuada de las áreas de estudio en las captaciones. Para ello y una vez tenidos en cuenta factores como la estratificación de nutrientes y temperatura, y la dirección del viento (Lindholm et al., 1989), se seleccionaron entre dos y tres profundidades de muestreo significativas en los distintos embalses estudiados. Estos embalses, todos próximos entre sí, fueron los del Algarve portugués Beliche, Bravura, Choça Queimada y Funcho, y los españoles Piedras y Chanza, situados en la provincia de Huelva. El segundo paso consistió en el estudio de los factores asociados al crecimiento de cianobacterias, entre los que se encontraban las concentraciones de nitrógeno, fósforo y amonio, la temperatura, la pluviosidad y la intensidad de luz. La Universidad del Algarve identificó y cuantificó los niveles de las distintas poblaciones de cianobacterias, mientras que la Universidad de Huelva estudió la evolución cuali-cuantitativa de fotopigmentos presentes en el agua del pantano que podrían actuar como indicadores.

El análisis de resultados se planteó desde la base de poder encontrar correlaciones entre los diferentes fotopigmentos, para cada embalse y profundidad, y los perfiles de las poblaciones de cianobacterias. Ping Li *et al.* (2002) ya hicieron una aproximación al analizar los pigmentos del fitoplancton marino por HPLC y aplicarlo a la investigación de comunidades de algas. La existencia de tales correlaciones permitiría proponer la determinación de algunos fotopigmentos como herramienta para predecir la aparición de blooms de cianobacterias.

Resultados y discusión

Como ejemplo de los resultados obtenidos en los pantanos estudiados, en las **Figuras 3, 4 y 5** se muestran los resultados para el pantano Choça Queimada, correspondientes al periodo comprendido entre Julio de 2003 y Diciembre de 2004 (desde Marzo de 2004 para el β -Caroteno), y para el que se establecieron dos puntos de muestreo (superficie y fondo).

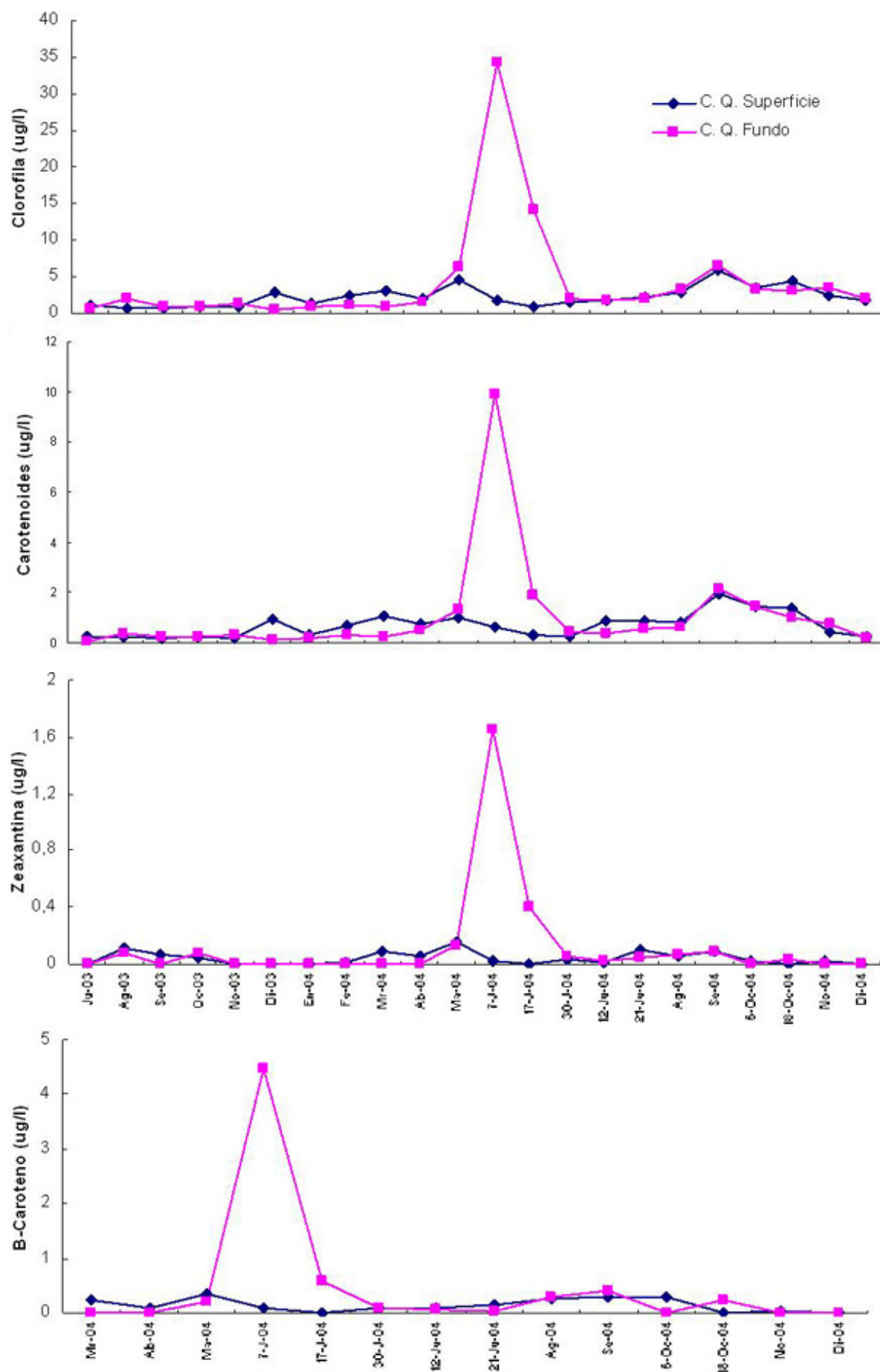
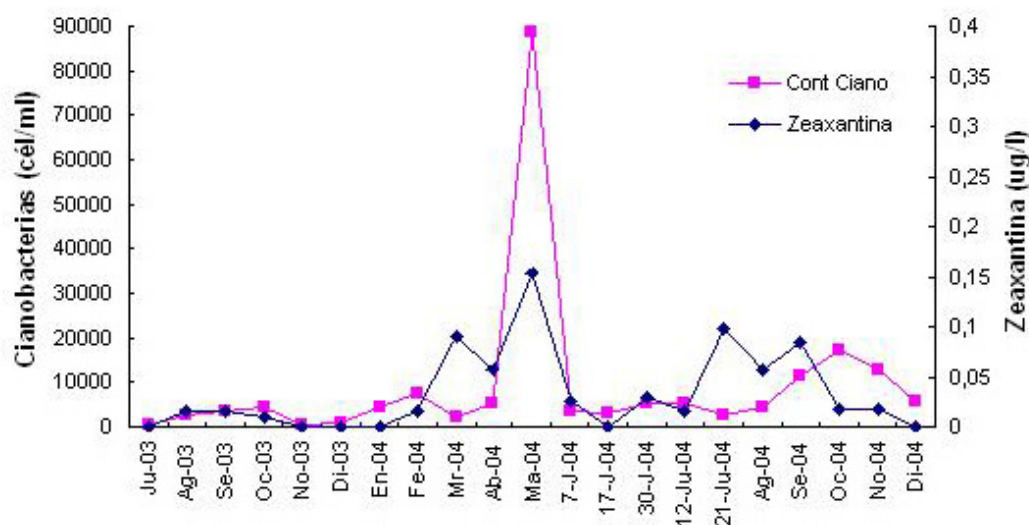


Figura 3. Resultados de los parámetros clorofila total, carotenoides totales, zeaxantina y β -caroteno correspondientes al pantano Choça Queimada. En abscisas se recogen las fechas de muestreo.

Los valores más altos de clorofilas y carotenoides totales se obtuvieron en el periodo de Junio a Octubre, meses en los que la radiación lumínica es óptima. La dinámica en la evolución de los carotenoides totales fue muy similar a la de clorofila total. Así, para el pantano Choça Queimada (**Fig. 3**) pueden observarse máximos de estas variables durante el mes de Junio de 2004 para el punto de muestreo fondo. Ello se debía a un *bloom* de *Oscillatoria* spp. En este periodo se observaron concentraciones de nitrato bajas (datos no mostrados), en coherencia con el mayor consumo debido al crecimiento de microalgas. Durante los meses de verano se observó, de forma general y para todos los abastecimientos, una disminución de la proporción de clorofila determinada en superficie y en otras profundidades. La mayor irradiancia lumínica y las temperaturas elevadas en superficie son factores que pueden provocar fotoinhibición, y una ralentización o inhibición del crecimiento, que unido a la capacidad de las cianobacterias de formar vesículas de gas para disponerse a la altura adecuada en la columna de agua, hace que se encuentren sus poblaciones a mayores profundidades durante estos periodos. No obstante, se observó un *bloom* de *Microcystis* spp. en el mes de enero en el pantano Bravura (punto de muestreo superficie, datos no mostrados), cuyo desarrollo podría ser debido a condiciones climatológicas favorables e inusuales, especialmente temperatura, alcanzadas durante ese mes.

Se ha descrito por numerosos autores que la zeaxantina es un carotenoide implicado en el ciclo de las xantofilas, involucrado en las reacciones de respuesta antioxidante de microalgas y sintetizado en situaciones de alta intensidad de luz PAR y UV-A (Hieber *et al.*, 2000). Durante los meses de verano se observó que los niveles de zeaxantina determinados en los puntos de muestreo establecidos en las zonas medias y más profundas de los embalses eran mayores que los determinados en superficie. Sin embargo, en los meses anteriores al verano, en un periodo que podría abarcar desde Marzo a Mayo, la mayoría de los pantanos presentaron niveles más altos de zeaxantina en superficie (Funcho, Beliche, Piedras ó Bravura), debido probablemente a que las intensidades lumínicas no eran nocivas para el crecimiento y permitían el desarrollo de las microalgas a esa profundidad. Durante los meses de verano, las cianobacterias se vieron obligadas a migrar hacia profundidades mayores, en busca de las condiciones óptimas de luz y temperatura. En la **Figura 3** puede observarse que los máximos de zeaxantina y β -Caroteno para Choça Queimada (punto de muestreo fondo) se produjeron en el mes de Junio, coincidiendo con el *bloom* antes referido de *Oscillatoria* spp.

En Choça Queimada (**Fig. 4** y **Fig. 5**; puntos de muestreo superficie y fondo, respectivamente), puede observarse que los máximos de zeaxantina y β -Caroteno se corresponden con los contajes máximos de cianobacterias obtenidos, tendencia seguida en los demás pantanos. No obstante, se estima que esta correlación puede depender de las poblaciones de cianobacterias dominantes. En la **Tabla 2** se muestran los valores obtenidos para 13 muestras tomadas en distintos pantanos y distintos periodos, que tenían en común un número de cianobacterias superior a 20.000 células/ml. Del total de las muestras, en 4 de ellas predominaba *Oscillatoria* spp., en 5 *Microcystis* spp., en 3 formas cocoides de cianobacterias, y en una de ellas predominaba *Microcystis aeruginosa*. En estas muestras se pone de manifiesto que los *blooms* o floraciones de *Oscillatoria* eran los que presentaban las mayores razones zeaxantina/nº células y β -Caroteno/nº células, generalmente bastante superiores a las obtenidas para *Microcystis*.



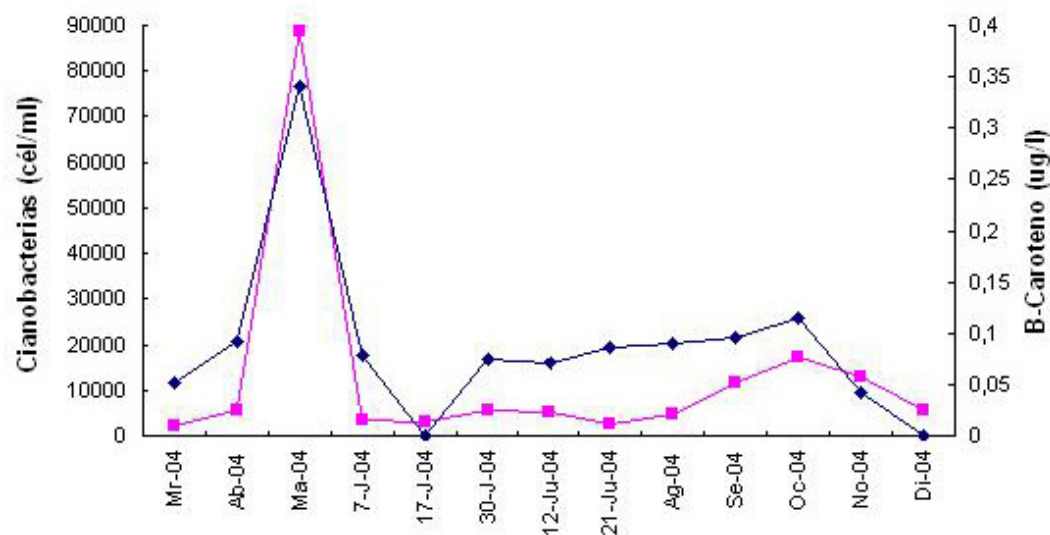


Figura 4. Perfiles zeaxantina-cianobacterias y β -caroteno-cianobacterias correspondientes al pantano Choça Queimada, profundidad superficie. En abcisas se recogen las fechas de muestreos.

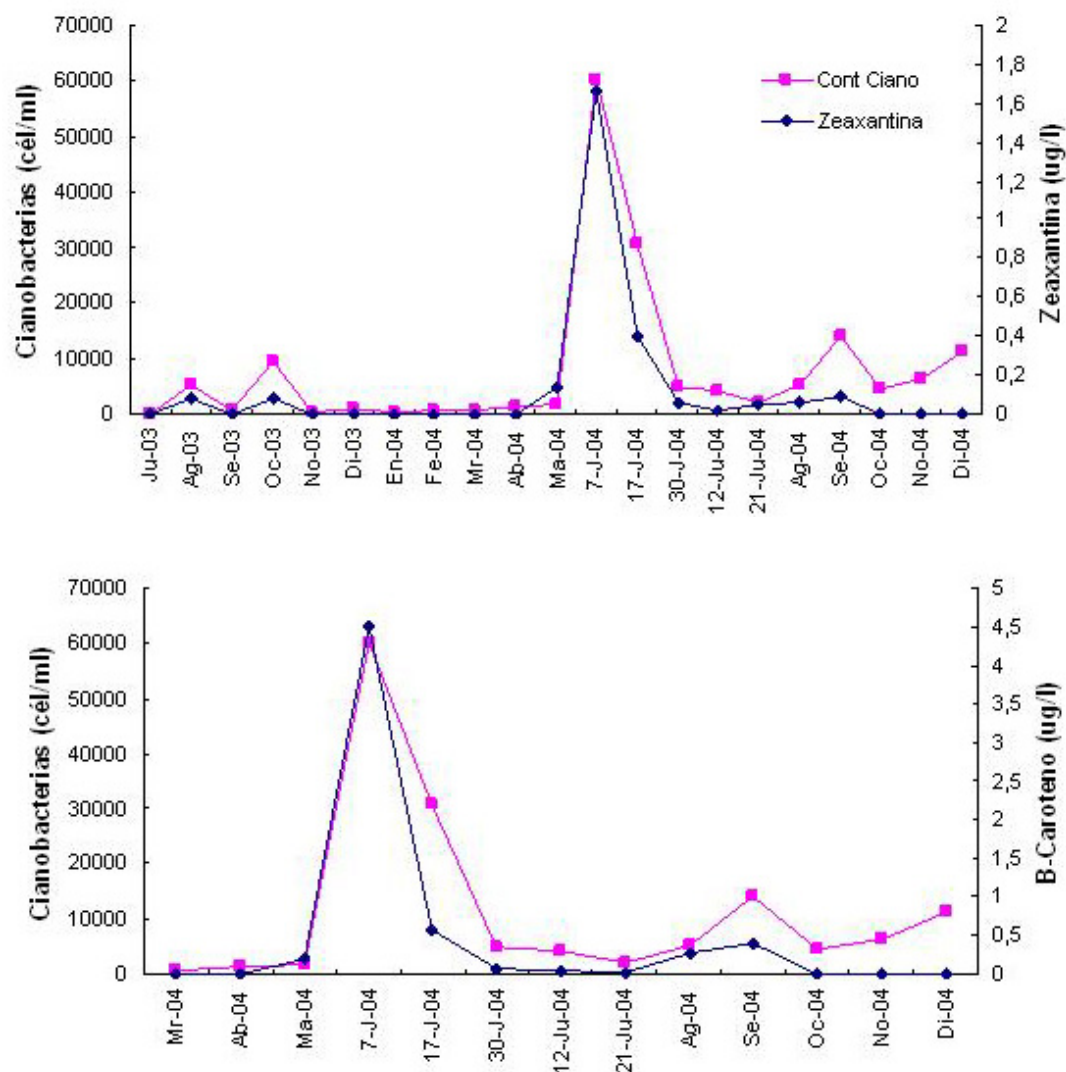


Figura 5. Perfiles zeaxantina-cianobacterias y β -caroteno-cianobacterias correspondientes al pantano Choça Queimada, profundidad fondo. En abcisas se recogen las fechas de muestreo.

Tabla 2. Relaciones entre fotopigmentos y poblaciones dominantes encontrados en las floraciones (desarrollos explosivos) detectados.

Punto de Muestreo	Fecha	Cianobacterias (Cél/ml)	Especie Dominante	Especie Dominante (Cél/ml)	Rat. Zx/Sp. Dom. (x 10 ⁶)	Rat. β -car/Sp. Dom. (x 10 ⁶)
Bravura superficie	05/08/2003	45611	<i>Microcystis</i> spp.	41535	0,120	n.d.
Bravura medio	05/08/2003	64957	<i>Microcystis</i> spp.	55802	0,233	n.d.
Bravura superficie	02/09/2003	54380	<i>Microcystis</i> spp.	45889	1,373	n.d.
Bravura medio	07/10/2003	22725	<i>Otras</i> (cocóides)	12930	2,629	n.d.
Bravura superficie	14/01/2004	42038	<i>M. aeruginosa</i>	41511	4,770	n.d.
Bravura medio	03/03/2004	20707	Otras (cocoides)	20701	0,773	2,947
C. Queim. Superf.	10/05/2004	88840	<i>Microcystis</i> spp.	83473	1,821	4,085
Beliche Superficie	10/05/2004	23982	Otras (cocoides)	22583	0,753	11,646
C. Queim. fondo	07/06/2004	60128	<i>Oscillatoria</i> spp.	59897	27,681	74,962
Beliche fondo	07/06/2004	29153	<i>Oscillatoria</i> spp.	25852	3,868	5,88
C. Queim. fondo	17/06/2004	30703	<i>Oscillatoria</i> spp.	29579	13,489	19,372
Beliche fondo	30/06/2004	22285	<i>Oscillatoria</i> spp.	21119	7,576	4,877
Bravura medio	14/09/2004	30774	<i>Microcystis</i> spp.	24728	3,720	2,305

Conclusiones

A partir de nuestros resultados se puede concluir que los valores más altos de clorofila total y carotenoides totales, indicativos de una mayor biomasa, se encuentran mayoritariamente en los meses de final de primavera y finales del verano. Los valores máximos se observaron en los puntos de muestreo medio y fondo, debido al movimiento de las cianobacterias a lo largo de la columna de agua en busca de las condiciones bioclimáticas óptimas. La dinámica observada en la evolución de los carotenoides totales es muy similar a la de la clorofila, aunque en condiciones de proliferación o dominio de *Microcystis*, los valores de carotenoides obtenidos son, en proporción al número de células, menores de lo que cabría esperar respecto a otras especies de cianobacterias como *Oscillatoria* o *Anabaena*.

Los perfiles de zeaxantina y β -caroteno se correlacionan con el número de células y la dinámica de las poblaciones de cianobacterias, por lo que su uso podría ser interesante como bioindicadores. No obstante, y según lo observado, también se concluye que las especies de *Microcystis* tendrían una menor capacidad de producción de los carotenoides señalados que otras especies de cianobacterias, por lo que se considera que la zeaxantina y β -caroteno se podrían utilizar como indicadores mucho más específicos de desarrollos explosivos o *blooms* de especies como *Oscillatoria*, *Anabaena* o formas cocoides de cianobacterias, que de *Microcystis*.

Líneas futuras de investigación

Dentro del proyecto CIANOALERTA II se seguirá profundizando en el estudio de la evolución específica de las principales especies de cianobacterias productoras de *blooms* (*Microcystis*, *Anabaena* u *Oscillatoria*), y su relación con los niveles de los pigmentos zeaxantina y β -caroteno, con el objeto de obtener mayor información respecto al perfil de producción de pigmentos de estas microalgas en ambientes naturales. Por otro lado y junto a la determinación del contenido de proteínas en las muestras problema, se procederá a la detección, determinación y estudio de los principales productos de degradación de la clorofila (feofitinas) con el objeto de obtener una idea aproximada del grado de viabilidad en el que se encontraban las células de microalgas. Este hecho presentaría gran importancia en las floraciones de *Microcystis aeruginosa*, pues la liberación de la toxina ocurre cuando la cianobacteria muere y se produce la liberación del contenido celular al agua.

Agradecimientos

Los autores quieren mostrar su agradecimiento al Fondo Europeo de Desarrollo Regional y a la Dirección General de Fondos Comunitarios y Financiación Territorial del Ministerio de Hacienda, así como a todas las entidades implicadas en el proyecto junto a las Universidades de Huelva y del Algarve. Estas entidades son: Águas do Algarve, CCDD y GIAHSA (Gestión Integral de Aguas de Huelva, S.A.). Los datos incluidos en este artículo corresponden al período del proyecto CIANOALERTA I (Julio

2003-Diciembre 2004), cuyo informe final fue redactado en Septiembre de 2005. Para más información pueden acudir a la web www.cianoalerta.org.

Referencias

- Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. 1988. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge (). 477 pp.
- Falch, B. S., Konig, G. M., Wright, A. D. et al. 1995. Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Med.* 61: 321-328.
- Hieber A. D., Burgos R., Yamamoto H. 2000. Plant lipocalins: Violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482: 84-91.
- Li, Hsiu-Ping, Gong Gwo-Ching and Hsiung, Tung-Ming. 2002. Phytoplankton pigment analysis by HPLC and its application in algal community investigations. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 283-290.
- Lindholm, T., Eriksson, J. E. and Meriemoto, J. A. O. 1989. Toxic cyanobacteria and water quality problems-examples from a eutrophic lake on Åland, Southwest Finland . *Water Research* 23: 481-486.
- OMS. 1993. *Guidelines for drinking-water quality*. Second edition. Volume 1. Recommendations. World Health Organization, Geneva . Rai, A. N. 1990. *CRC Handbook of symbiotic cianobacteria*. CRC Press. Boca Ratón. 253 pp.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE (España), núm. 45, de 21 de Febrero de 2003.
- Robarts, R. D. and Zohary, T. 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *N. Z. J. Mar. Freshwater Research* 21: 391-399 .
- Rodhe, W. 1969. Crystallization of eutrophication concepts in North Europe . In: *Eutrophication, causes, consequences, correctives*. National Academy of Sciences. Washington D. C. Standard Book Number 309-01700-9, 50-64.
- Scheurs, H. 1992. *Cyanobacterial dominance, relation to eutrophication and lake morphology*. Thesis, University of Amsterdam . Holland .
- Walsby, A. E. 1987. Mechanisms of buoyancy regulation by planktonic cyanobacteria with gas vesicles. In: P. Fay and Van Baalen [Eds] *The Cyanobacteria*. Elsevier. Amsterdam , 377-414.
- Wellburn, A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiology*. Vol. 144, 307-313.
- Young, A. J., Orset, S. and Tsavalos, A. J. 1997. In: Pessarakli, M. (Ed) *Handbook of photosynthesis*, Marcel Dekker. New York, 579-622.