

Informe

"ESTUDIO INICIAL PARA LA DISCRIMINACIÓN DE UMBRALES DE RIESGO POR PROLIFERACIONES DE FITOPLANCTON POTENCIALMENTE TÓXICO EN AGUAS COSTERAS DEL MAR MENOR"

15 Mayo 2018

Región de Murcia
Consejería de Empleo, Universidades, Empresa y Medio Ambiente
Dirección General Medio Ambiente y Mar Menor
Servicio de Planificación y Evaluación Ambiental
C/ Catedrático Eugenio Úbeda Romero, 3.
30071 Murcia

Nuria Alcaraz Oliver
Ainhua Oller Ruiz
Gema Férez Melgarejo
Sánchez Huertas M^a del Mar
Tragsatec

Dirección: Javier Gilabert Cervera
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Universidad Politécnica de Cartagena
Paseo Alfonso XIII, 52
30203 – Cartagena
javier.gilabert@upct.es

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES.....	3
2. METODOLOGÍA.....	4
2.1. MUESTREOS EN PLAYAS.....	4
2.2. MUESTREOS EN EL INTERIOR DEL MAR MENOR.....	4
2.3. TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS EN LABORATORIO.....	5
2.3.1. Determinación taxonómica y de densidad del fitoplancton	5
2.3.2. Determinación de toxinas.....	7
3. RESULTADOS	11
3.1. Playas del Mar Menor	11
3.1.1. 20 DE MARZO 2018	11
3.1.2. 3 DE ABRIL DE 2018.....	12
3.2. INTERIOR DEL MAR MENOR.....	13
3.2.1. Distribución espacio temporal del fitoplancton general.....	13
3.2.2. Distribución espacio temporal de los grandes grupos del fitoplancton	14
3.2.3. Distribución espacio temporal de los principales órdenes de las dinofalgeladas	15
3.2.4. Distribución espacio temporal de los principales taxones potencialmente tóxicos encontrados.....	16
3.3. TOXINAS.....	18
3.3.1. Toxinas en playas	19
3.3.2. Toxinas en muestras del interior	21
4. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	23

1. ANTECEDENTES

El fitoplancton potencialmente tóxico y nocivo del Mar Menor se ha estado estudiando discontinuamente desde el año 2003. Los primeros estudios se realizaron en las aguas de los puertos deportivos. Tras el evento ocurrido en la playa de Calarreona de Águilas en 2006, que requirió de asistencia ambulatoria a más de un centenar de personas, se realizaron distintos seguimientos incluyendo las playas del Mar Menor desde el año 2007 al 2009. Estos seguimientos se retomaron en 2015 hasta la actualidad. El año 2016 tuvo una especial relevancia por la crisis de eutrofización acaecida en el Mar Menor.

En la actualidad existe una lista de referencia de especies de fitoplancton nocivo (<http://www.marinespecies.org/hab/>) que eleva el número de estas especies a 528. Algunas de ellas suelen estar presente en muchas masas de agua sin causar problemas de toxicidad, excepto cuando proliferan masivamente.

En los años 2017 y 2018, de los que se recogen aquí los datos, se seleccionaron 5 playas del Mar Menor en función de los datos obtenidos en años precedentes. Las playas en las que se realizaron recuentos de fitoplancton potencialmente tóxico fueron: Los Aliseos, Playa Honda, Los Urrutias, Manzanares y Castillico. Los resultados de los recuentos de fitoplancton potencialmente tóxico de estas playas ya se presentaron en el informe correspondiente a diciembre de 2017, aquí se presentan los resultados de los muestreos realizados el 20/3/2018 y el 3/4/2018 correspondientes a la temporada de semana santa de estas playas.

Desde 2016 se están recogiendo muestras semanal o quincenalmente de tres estaciones en el interior del Mar Menor donde se recuenta con más detalle taxonómico el fitoplancton. En el presente informe se proporciona también esta información desde el 7/8/2017 al 16/04/2018.

Entre estas fechas también se tomaron muestras para el análisis de toxinas, al igual que de las de las playas anteriormente señaladas. Se presentan los resultados para las toxinas analizadas que se indican en la sección de metodología.

2. METODOLOGÍA

2.1. MUESTREOS EN PLAYAS

Al igual que en los planes de vigilancia realizados en años previos se han seleccionado las playas incluidas en la Tabla I, donde se detectó la presencia de especies potencialmente tóxicas en densidades más elevadas con respecto a otras playas en los planes de vigilancia de años anteriores.

Tabla I. Selección de playa para su estudio.

Playa	Municipio
Los Aliseos	San Javier
Playa Honda	Cartagena
Los Urrutias	Cartagena
Manzanares	Los Alcázares
Castillico	San Javier

La Tabla II muestra las fechas de muestreos realizados en los años 2016, 2017 y 2018.

Tabla II. Fechas de muestreos de 2018.

Fechas de muestreo 2018
20/03
03/04

2.2. MUESTREOS EN EL INTERIOR DEL MAR MENOR

En el interior del Mar Menor se seleccionaron tres estaciones de muestreo, una en la zona Norte, en la zona central y la tercera en la zona Sur. La Figura 1 muestra las localidades tanto de estas estaciones como la de las playas anteriores y la Tabla III sus coordenadas UTM.



Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo.

Tabla III. Coordenadas de las estaciones de muestreo.

Los Aliseos	699850.79	4171683.07
Playa Honda	699807.73	4167411.28
Los Urrutias	691505.57	4172711.77
Manzanares	689543.25	4179355.21
Castillico	694260.70	4187303.89
MM1	695519.75	4184278.25
MM2	694873.81	4177091.31
MM3	696504.32	4171422.70

2.3. TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS EN LABORATORIO

2.3.1. Determinación taxonómica y de densidad del fitoplancton

Las muestras de agua se tomaron en frascos de polipropileno de 250 ml de capacidad por duplicado a una distancia de la superficie de 30 cm aproximadamente, donde la columna de agua tenía alrededor de un metro de profundidad. Uno de los frascos se fijó

con una solución de Lugol, mientras que el otro se mantuvo sin fijar para su observación *in vivo* y aislamiento de cepas si fuera el caso. El etiquetado de las muestras incluía el lugar de muestreo o código identificador de la playa, coordenadas GPS (UTM), fecha y hora de recogida. Los frascos con las muestras se guardaron en neveras opacas a la luz hasta su depósito en laboratorio en un tiempo no superior a 8 horas.

Una vez en el laboratorio se procedió con el método de observación al microscopio invertido de Utermöhl para muestras de fitoplancton. Tras la homogeneización de la muestra se sedimentaron volúmenes de 100, 75 y 50 ml en función de la densidad celular esperable y la cantidad de materia particulada en ellas. Los tiempos de sedimentación variaron en función de la altura de la columna, normalmente 24 horas. Los recuentos y las identificaciones taxonómicas se realizaron sobre las cámaras al microscopio óptico invertido (Leica DM IL) equipado con cámara digital y objetivos de 5x, 10x, 20x, 40x y 63x secos.

Para los recuentos se procedió a realizar un barrido de toda la cámara de sedimentación a 200x (objetivo 20x, ocular 10x) para cuantificar los organismos menos abundantes y de mayor tamaño. Seguidamente se procedió a realizar transectos (generalmente 2) a 200x para cuantificar los organismos más abundantes del microplancton ($>20\ \mu\text{m}$) y transectos a 400x para cuantificar los organismos del nanoplancton ($<20\ \mu\text{m}$). En muchas ocasiones, y en función de la densidad celular se realizaron recuentos de media cámara de sedimentación o de la cámara completa para obtener recuentos significativos. A los individuos de cada especie potencialmente tóxica que resultaban de interés se les sacaba diferentes fotografías a 630x antes de proceder a su identificación taxonómica. Cuando en alguna muestra apareció una proliferación importante de algún tipo de células, se recontaron campos al azar hasta obtener un recuento de no menos de 300 individuos de la misma especie. Habitualmente se recontó media cámara de sedimentación.

El número de células contadas se convierte a unidad de densidad por volumen de muestra como células por litro. En ocasiones la determinación a nivel de especie e incluso de género requiere de técnicas adicionales como microscopía electrónica de barrido y contenido de pigmentos mediante HPLC, en otras se requiere la preparación de ejemplares con cortes o tinciones para su observación al microscopio de luz directa

y/o luz polarizada. En nuestro caso se intentó llegar al taxón más detallado posible mediante la observación directa con microscopía invertida.

2.3.2. Determinación de toxinas

En todas las estaciones se tomaron también 2 litros de muestra para el análisis de toxinas y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Puesto que el contenido de las posibles toxinas marinas contenidas en las muestras de mar se espera a niveles de trazas, para conseguir detectarlas, resulta necesario el uso de un potente equipo de detección, así como un tratamiento de muestra que las preconcentre y, además, elimine otras posibles interferencias presentes en las muestras. Para ello, se ha hecho uso de la técnica de preconcentración SPE (Extracción en Fase Sólida), en la cual, la muestra se hace pasar por unos cartuchos rellenos de sílice que interaccionará y retendrá a las toxinas. Estas, posteriormente se redisolverán en un pequeño volumen de un disolvente adecuado, quedando así preconcentradas. En esta técnica, resulta necesario el uso de un sistema colector a vacío Visiperp™, metanol y agua de calidad LC-MS (Cromatografía Líquida y Espectrometría de Masas), además de ácido fórmico (FA) 98 % y acetato amónico de calidad LC empleados como modificadores del pH.

El procedimiento es como sigue, se filtran 80 mL de muestra a través de un filtro GF/F de 25 µm diámetro. Se toman 75 mL del filtrado y se preconcentran mediante la SPE, a través de los siguientes pasos: 1) Acondicionamiento del cartucho, primero con metanol y luego con agua al 0.1 % de FA; 2) Preconcentración de la muestra, se añaden los 75 ml del filtrado habiéndolo acidificado previamente al 0.1 % de FA; 3) Lavado con agua al 0.1 % de FA; 4) Elución de las toxinas, primero con una disolución de metanol:agua (1:9, v/v) a 0.2 M de acetato amónico con la que eluye el ácido domoico (DA) (Elución A), a continuación otra disolución de MeOH a 1 M de acetato amónico para redissolver el resto de toxinas y 5) Las eluciones se filtran con jeringa y un filtro de nylon de 0.45 µm, finalmente se inyecta en el LC.

Para optimizar este proceso, se siguieron los métodos utilizados por Wang (2007, 2012), Jiang (2017) y de la Iglesia (2008) y se probaron diferentes composiciones y volúmenes de elución, para mejorar dichos métodos. Se estudió si había pérdida de

los analitos en la etapa de lavado, al no ser así, se incluyó para eliminar posibles interferencias y la propia salinidad del agua.

El equipo utilizado para la detección de las toxinas fue un Agilent 6420 triple cuadrupolo LC/MS acoplado a un cromatógrafo líquido 1260 Infinity, con bomba cuaternaria, automuestreador y un compartimento de columna termostatizado. La columna utilizada fue una Zorbax SB-C18 (2.1 x 75 mm, 3.5 μ m). La fase móvil empleada, se componía de metanol y agua al 0.1 % de FA y 2 mM de acetato amónico, utilizada en forma de gradiente para conseguir una separación óptima de los picos.

Las toxinas estudiadas fueron las siguientes, 13,19-didesmethyl spirolide C, 13-desmethyl spirolide C, 20-methyl spirolide G, Azaspiracid 1, Azaspiracid 2, Azaspiracid 3, Azaspiracid 4, Azaspiracid 5, Dinophysistoxin 1, Dinophysistoxin 2, Okadoix Acid, Yessotoxin y Homoyessotoxin compradas a Laboratorio Cifga, S.A. (Lugo, España). Pectenotoxin 2 y gymnodimine obtenidas de National Research Council Canada (Halifax, Canada) y Acido Domoico de Sigma-Aldrich Química, S.L. (Madrid, España).

La Tabla IV resume las toxinas analizadas, el tipo de toxinas, el síndrome que producen y los organismos que la pueden producir.

Inicialmente, fue necesaria una optimización de los parámetros de detección en el triple cuadrupolo, para cada uno de los estándares por separado. Se utilizaron las transiciones y las condiciones de ionización que aparecen en la Tabla V. Seguidamente se procedió a la separación de los analitos en la columna cromatográfica, intentando obtener la mejor resolución de picos en el menor tiempo posible, para conseguir un método rápido, sensible y con el menor consumo de disolventes. Una vez separados los picos, se probaron diferentes temperaturas en el compartimento termostatizado de la columna, al aumentarla, la presión en su interior era menor pero los picos se deformaban, así, se eligieron 30 °C. Por último, se optimizaron los parámetros de la fuente de ionización en el triple cuadrupolo para todos los estándares.

Tabla IV. Tipo de toxinas, síndrome que producen, organismos que la pueden producir, y toxinas analizadas.

Tipo	Síndrome	Productor	Toxina
SPX – Espirolidos	PSP - Paralíticas	Alexandrium Prorocentrum	13,19-didesmethyl spirolide C 13-desmethyl spirolide C 20-methyl spirolide G
AZAs - Azaspirácidos	DSP - Diarreica (Inmunitario y otros)	Azadinium (Heterocapsa, Karlodinium) Protoperdium (P. Crassipes)	Azaspiracid 1 Azaspiracid 2 Azaspiracid 3 Azaspiracid 4 Azaspiracid 5
DTX – Dinofisistoxinas	DSP – Diarreica	Género Dinophysis (muy esporádico)	Dinophysistoxin 1 – DTX1 Dinophysistoxin 2 – DTX2
OA – Ácido Okadoico	DSP - Diarreica	Dinophysis Prorocentrum	Okadoic Acid
YSX - Yessotoxinas	DSP – Diarreica (toxina relacionada)	Protocertium (baja toxicidad)	Yessotoxin - YTX Homoyessotoxin - Homo-YTX
Pectenotoxinas (asociada al Ácido Okadoico)	DSP - Diarreica	Dinophysis fortii Prorocentrum lima Gonyaulax, etc.	Pectenotoxin 2 – PTX2
GYM - Gymnodimina	PSP - Paralíticas	Karenia (K. selliformis)	Gymnodimine
AD – Ácido domoico	ASP - Amnésico	Pseudo-nitzschia (P. australis, delicatissima, multiseriata, etc.)	Domoic Acid

Tabla V. Transiciones y las condiciones de ionización utilizadas para el análisis de las toxinas analizadas.

Toxina	Ión precursor	Ión producto	Energía de colisión (eV)	Fragmentador (V)	Tipo de transición
DA	312	266	10	120	Q
		248	10	120	q
		161	20	120	q
13desMeC	692	164	50	200	Q
		444	40	200	q
13,19-didesMeC	678	164	50	200	Q
		430	40	200	q
AZA-1	842	824	30	190	Q
		806	45	180	q
AZA-2	856	838	30	190	Q
		820	45	180	q

AZA-3	828	810	30	190	Q
		792	45	170	q
AZA-4	844	826	30	190	Q
		808	45	190	q
AZA-5	844	826	35	180	Q
		808	40	190	q
DTX-1	841	823	45	180	q
		737	55	190	Q
DTX-2	827	809	45	160	q
		723	55	190	Q
OA	827	723	55	190	Q
		809	45	180	q
YTX	1141.5	1061.3	35	135	Q
		925.5	60	135	q
hYTX	1155.4	1075.5	35	135	Q
PTX2	881.5	539.3	70	230	
GYM	508.3	490.6	40	200	Q
SPX20G	706	688	30	190	Q
		670	35	190	q

Se realizó una validación analítica del procedimiento completo. A las muestras se les añadieron los estándares adquiridos de las toxinas, a diferentes niveles de concentración y se analizaron. Con las respuestas obtenidas en el equipo, se crearon gráficos con la concentración añadida frente a la respuesta que daba cada analito en el equipo. Dichos gráficos, muestran una recta lineal con una pendiente característica para cada analito, además, también es diferente para cada muestra, por lo que, para saber el contenido de cada analito a cada muestra, hubo que hacerle estas adiciones estándar a cada muestra. Esto es conocido como, la presencia de efecto matriz en las muestras. Con esta validación también se calcularon los Límites de Detección (LD) y los Límites de Cuantificación (LQ) de cada analito con este procedimiento. Por lo que, es posible que en las muestras haya cierta cantidad de un determinado analito pero no sea posible su detección si dicho contenido está por debajo de su propio LD.

También se estudió la recuperación de los analitos desde la muestra a través de la técnica SPE que usamos, estuvo en el rango de 80-110 %, lo que resulta adecuada para el análisis.

Finalmente, en algunas de las muestras analizadas hasta la fecha, se encontraron contenidos a niveles de trazas de DA, pero no del resto de las toxinas aquí estudiadas. Los gráficos representan los contenidos obtenidos mediante este análisis para DA, con respecto a cada muestra tomada en las tres estaciones del interior del Mar Menor y en cada fecha de recogida.

3. RESULTADOS

Se presenta a continuación una caracterización general de las muestras analizadas. Se presentan primero los resultados de los recuentos del fitoplancton en las playas. Seguidamente se muestran los datos de las series temporales de las estaciones en el interior del Mar Menor y finalmente los de las toxinas.

3.1. Playas del Mar Menor

3.1.1. 20 DE MARZO 2018

La Tabla VI muestra las densidades de células potencialmente tóxicas encontradas en las 5 playas muestreadas el 20 de marzo de 2018. Se observan densidades bajas (≤ 1000 cel/L por lo general). En este primer muestreo de la temporada 2018 se puede destacar una mayor diversidad de taxones en la playa de los Aliseos, donde aparecen 6 especies distintas de células potencialmente tóxicas. En playa honda aparecen 7, 4 en los Urrutias, 8 en Manzanares y 10 en Castillico, en contraste con las encontradas por estas mismas fechas en 2017.

Tabla VI. Densidades (cel/L) de las células potencialmente tóxicas encontradas en las distintas playas el 20 de marzo de 2018.

	Aliseos	Playa Honda	Los Urrutias	Manzanares	Castillico
<i>Alexandrium cf pseudogonyaulax</i>		4.74E+02		3.16E+02	9.48E+02
<i>Alexandrium cf minutum</i>	7.90E+01	7.48E+02	4.74E+02	1.58E+02	1.58E+02
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	2.21E+03				
<i>Alexandrium sp</i>			1.58E+02		

<i>Cochlodinium polykryoides</i>				1.58E+02	1.58E+02
<i>Gonyaulax spinifera</i>					7.90E+01
<i>Heterocapsa spp</i>	1.58E+02		1.58E+02	1.58E+02	3.16E+02
<i>Karenia cf selliformis</i>	3.48E+03	1.58E+03		9.48E+02	2.69E+03
<i>Karenia spp</i>	2.68E+02	6.32E+02	1.58E+02	4.74E+02	1.90E+03
<i>Karlodinium cf micrum</i>		4.74E+02			1.58E+02
<i>Karlodinium veneficum</i>		3.16E+02		1.58E+02	
<i>Prorocentrum minimum</i>		4.74E+02		9.48E+02	7.90E+01
<i>Pseudo-nitzschia sp</i>	3.32E+03				3.16E+02

3.1.2. 3 DE ABRIL DE 2018

La Tabla VII presenta las densidades (cel/L) de las células potencialmente tóxicas encontradas en las distintas playas el abril de 2018.

Tabla VII. Densidades (cel/L) de las células potencialmente tóxicas encontradas en las distintas playas el 10 de abril de 2017.

	Aliseos	Playa Honda	Los Urrutias	Manzanares	Castillico
<i>Alexandrium cf pseudogonyaulax</i>	4.86E+02				7.29E+02
<i>Alexandrium cf minutum</i>	4.86E+03		7.29E+02	2.43E+02	
<i>Chrysocromulina sp</i>	1.22E+03				1.22E+03
<i>Gymnodiniales</i>	1.46E+03	1.22E+03			
<i>Heterocapsa spp</i>	2.43E+03	1.22E+03		1.22E+03	1.22E+03
<i>Karenia cf selliformis</i>	2.43E+02				1.22E+03
<i>Karenia spp</i>	4.86E+02			1.22E+03	4.86E+02
<i>Karlodinium cf armiger</i>	1.71E+02				
<i>Karlodinium cf micrum</i>	1.22E+03				4.32E+03
<i>Karlodinium veneficum</i>	3.65E+03		1.22E+03	2.43E+02	
<i>Prorocentrum minimum</i>	4.86E+02		1.22E+03		1.46E+03
<i>Pseudo-nitzschia sp</i>	3.65E+03	1.22E+03			

Aquí en la playa de los Aliseos se encuentra el mayor número de taxones potencialmente tóxicos habiéndose identificado 12. Le sigue en número la playa de Castillico con 7, Manzanares con 4 y Playa Honda y Los Urrutias con 3.

La máxima densidad encontradas ha sido de Karenias y Alexandrium no llegando a 5×10^3 cel/L.

3.2. INTERIOR DEL MAR MENOR

3.2.1. Distribución espacio temporal del fitoplancton general

A continuación, se muestran la evolución de los taxones clasificados y recontados desde el 7/8/2017 al 16/4/2018 en las tres estaciones del interior del Mar. La Figura 2 muestra las densidades totales del fitoplancton para las tres estaciones interiores: MM1 en el Norte, MM2 en el centro y MM3 en el Sur.

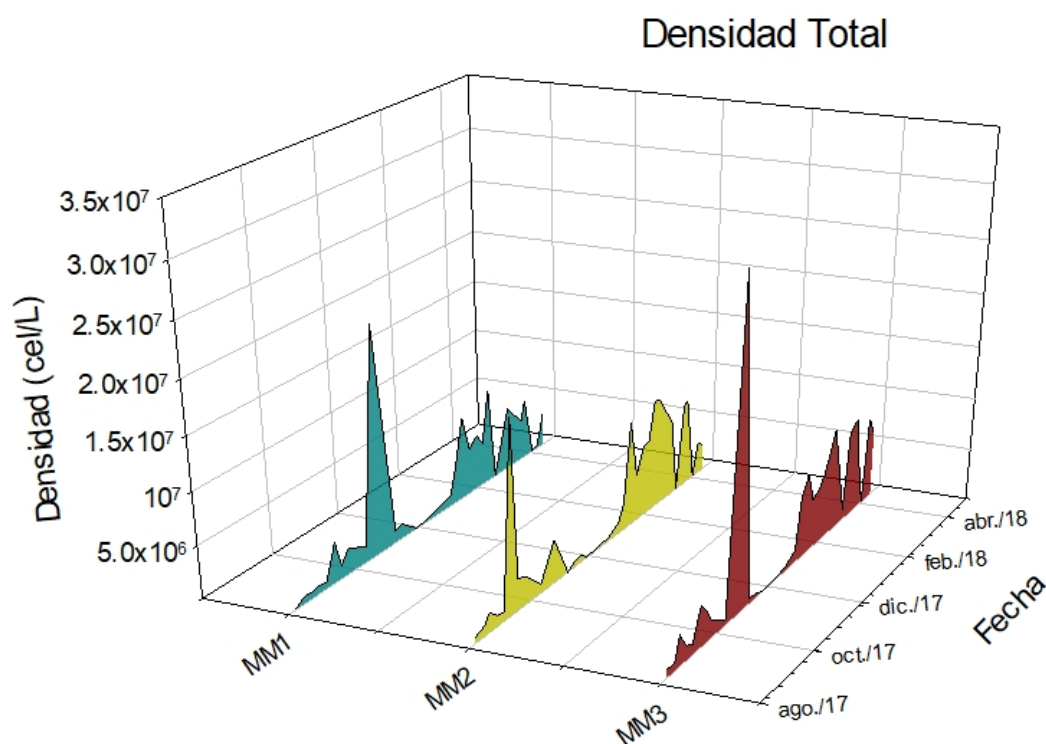


Figura 2 Evolución de la densidad del fitoplancton en las tres estaciones muestreadas en el interior del Mar Menor.

3.2.2. Distribución espacio temporal de los grandes grupos del fitoplancton

La Figura 3 muestra también para las mismas estaciones la distribución en el espacio y en el tiempo de las tres grandes categorías del fitoplancton en función de las densidades encontradas: diatomeas, dinoflageladas y otros tipos.

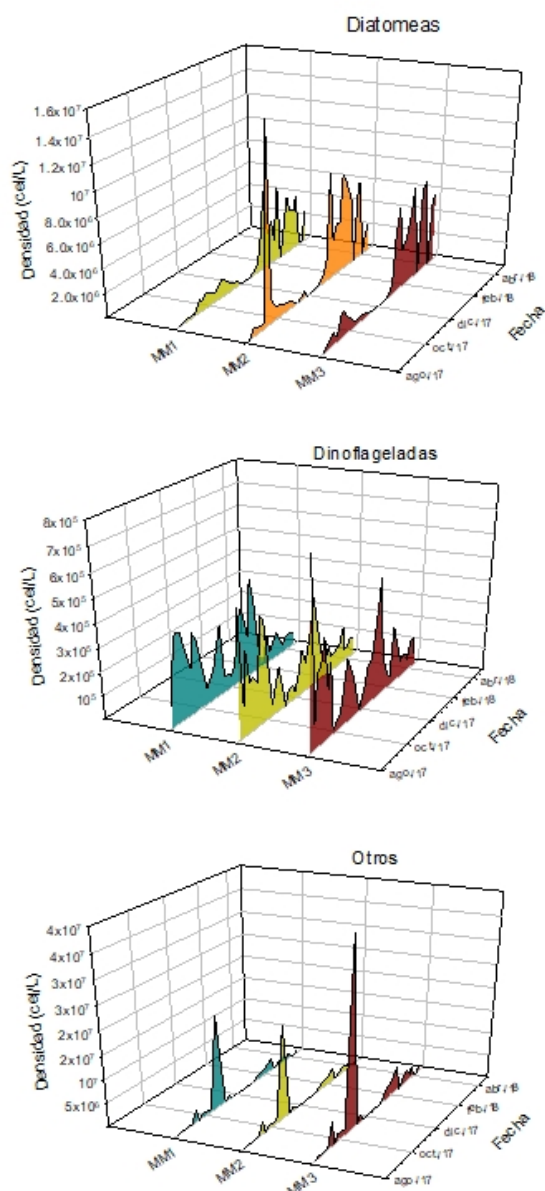


Figura 3. Evolución en las tres estaciones de muestreo del interior del Mar Menor de los grandes grupos del fitoplancton: diatomeas, dinoflageladas y otros tipos.

3.2.3. Distribución espacio temporal de los principales órdenes de las dinoflageladas

Dentro del grupo de las dinoflageladas se han dividido en órdenes tal y como muestra la Figura 4

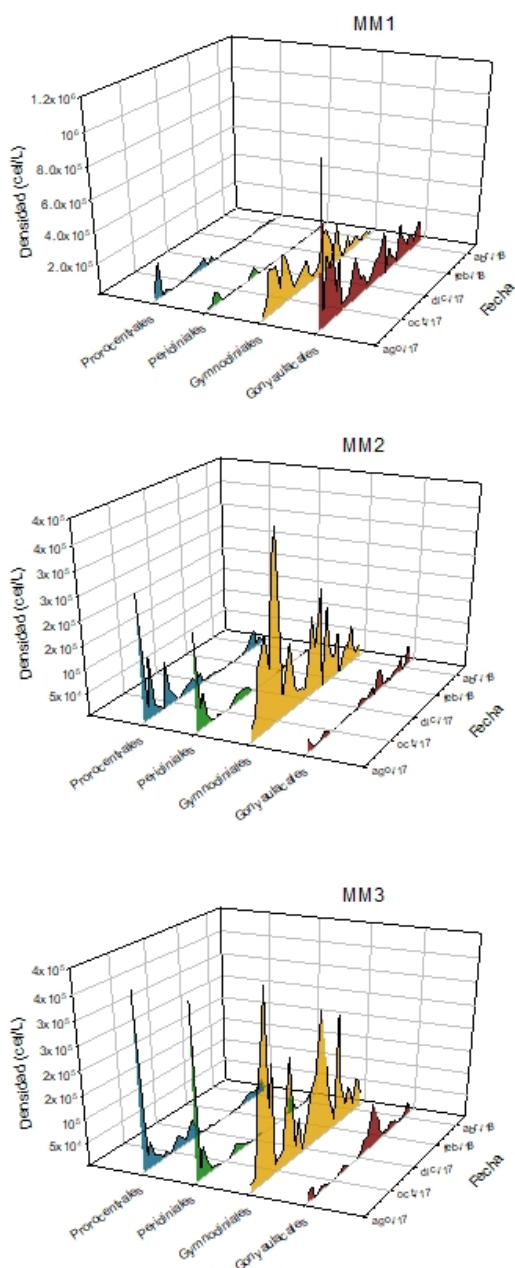


Figura 4. Evolución de los órdenes de dinoflageladas en las tres estaciones del interior del Mar Menor.

3.2.4. Distribución espacio temporal de los principales taxones potencialmente tóxicos encontrados

En esta sección se han agrupado los taxones potencialmente tóxicos encontrados al nivel más detallado posible

Las Figuras 5 a 7 muestran la evolución de cada taxon en las tres estaciones del interior del Mar Menor respectivamente.

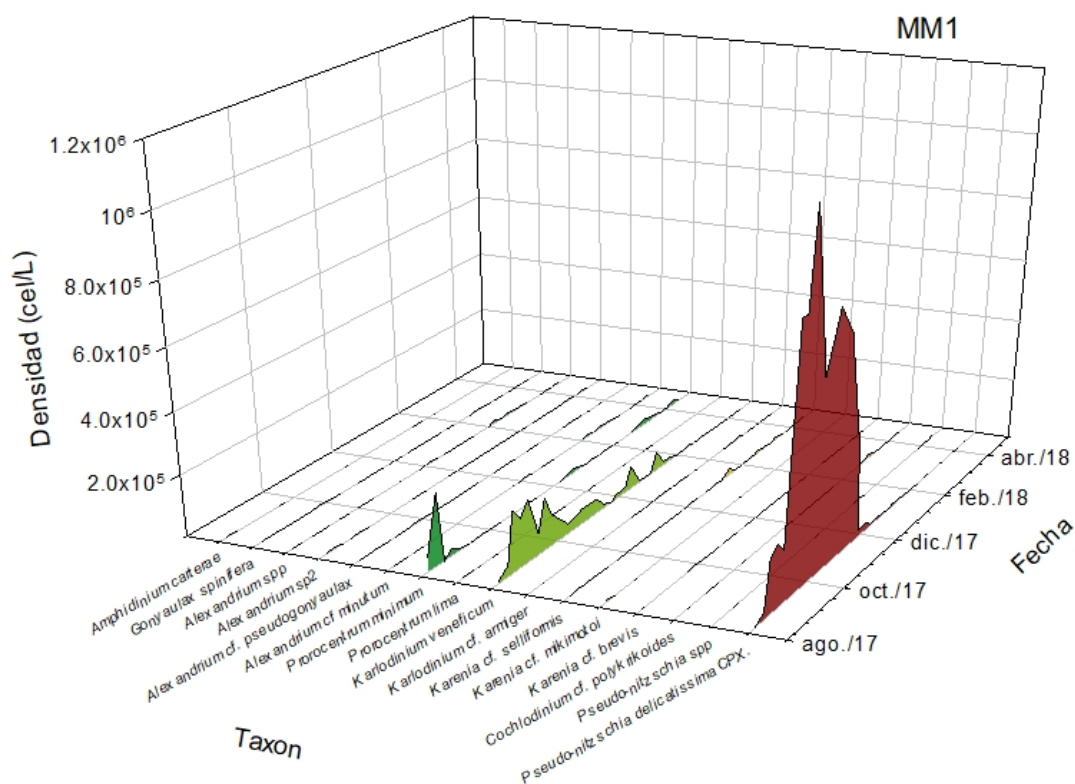


Figura 5. Evolución de los principales taxones potencialmente tóxicos en la estación MM1

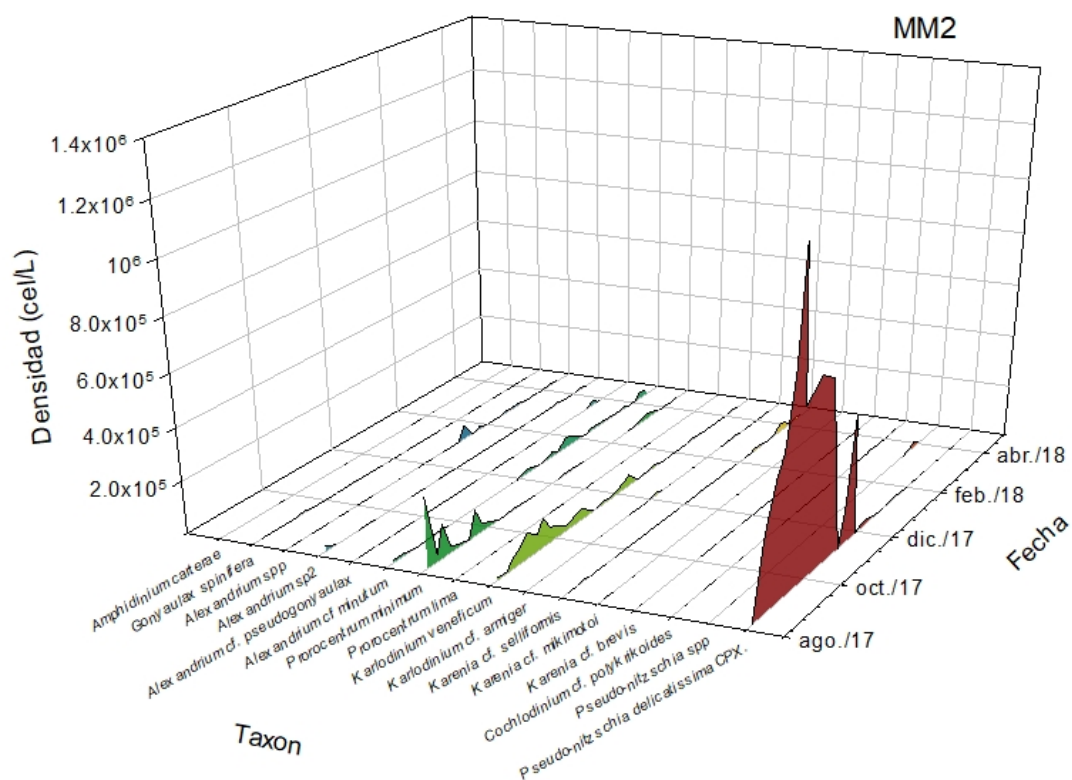


Figura 6. Evolución de los principales taxones potencialmente tóxicos en la estación MM2

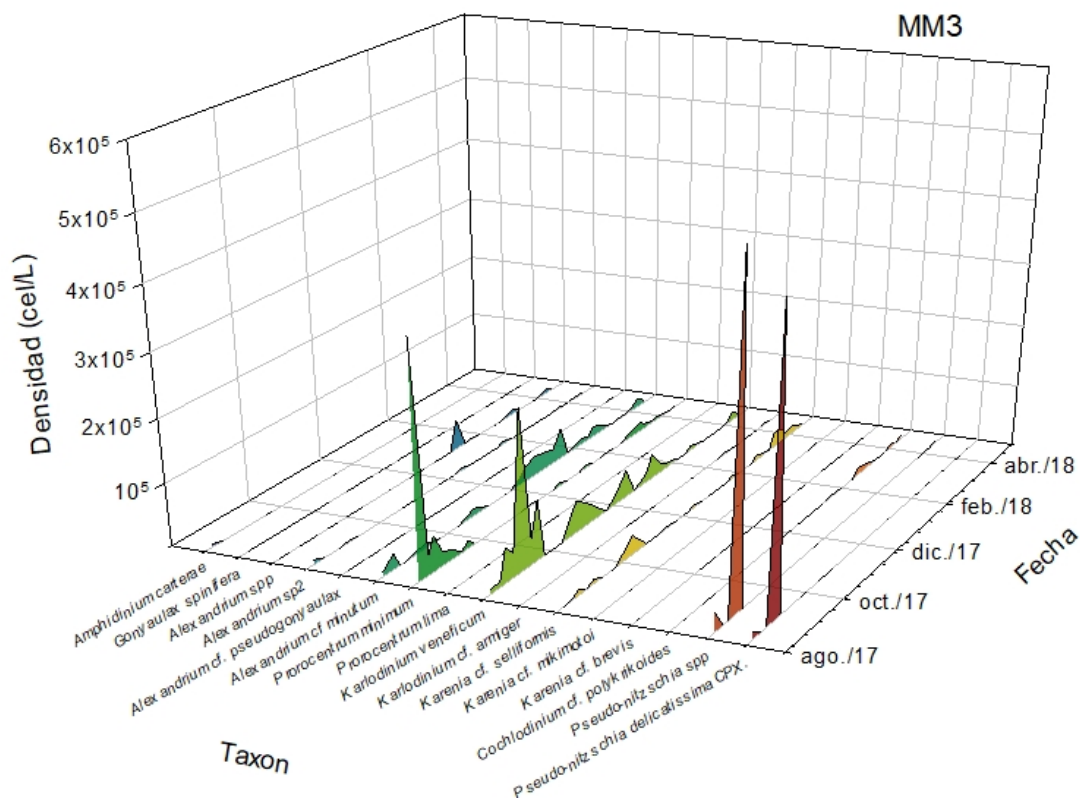


Figura 7. Evolución de los principales taxones potencialmente tóxicos en la estación MM3.

3.3. TOXINAS

De todas las toxinas analizadas, la única que ha dado positivo en los análisis ha sido el Ácido domoico. Esta toxina amnésica la producen las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, si bien también se han descrito otras especies del genero *Nitzschia* que también la pueden producir. De entre estas células se han identificado la especie *Pseudo-nitzschia delicatissima* CPX (CPX indica que se trata de un complejo de especies que no se puede distinguir fácilmente por métodos que no sean genéticos) u

otras especies de Pseudo-nitzschia que no se han podido determinar por le momento a nivel de especie.

3.3.1. Toxinas en playas

La Tabla VIII muestra las densidades de células del género Pseudo-nitzschia encontradas, junto con la concentración de Ácido domoico encontrado en el agua y los niveles de detección y cuantificación para cada muestra.

Tabla VIII. Densidades de células del género Pseudo-nitzschia encontradas, junto con la concentración de Ácido domoico encontrado en el agua y los niveles de detección y cuantificación para cada playa y fecha analizada.

Lugar	Fecha de muestreo	Densidad de Pseudo-nitzschia delicatissima CPX (cel/L)	Densidad de Pseudo-nitzschia spp (cel/L)	LD DA (ng/L)	LQ DA (ng/L)	Concentración de DA en agua (ng/L)
Aliseos	20/03/2018	-	3.32E+03	25.2	75.7	46.9
	03/04/2018	-	3.65E+03	19.3	58.0	NQ
Playa Honda	20/03/2018	-	-	23.2	69.7	56.8
	03/04/2018	-	1.22E+03	19.3	58.0	NQ
Los Urrutias	20/03/2018	-	-	12.0	35.9	812
	03/04/2018	-	-	19.9	59.6	534
Manzanares	20/03/2018	-	-	22.9	68.7	169
	03/04/2018	-	-	36.9	111	179
Castillico	20/03/2018	-	3.16E+02	13.6	40.8	335
	03/04/2018	-	-	29.1	87.3	127

La Figura 8 muestra tres imágenes de células del género *Pseudo-nitzschia* encontradas, indicando las playas y fechas encontradas. Ninguna de las tres corresponde a *Pseudo-nitzschia delicatissima*. La fotografía del centro muestra estas células formando cadenas típicas de este género.

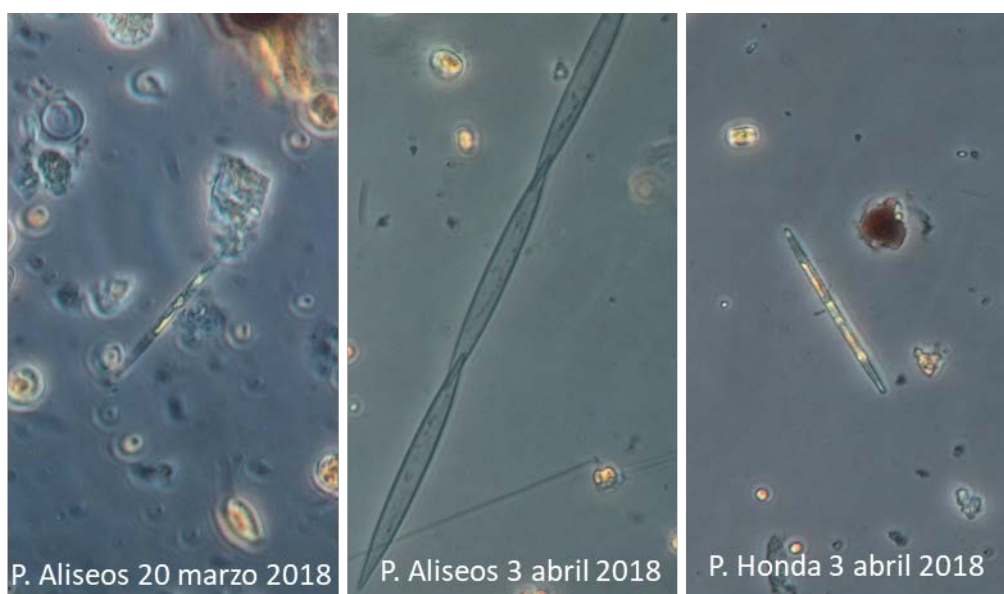


Figura 8. Fotografías al microscopio invertido de contraste de fases de células del género *Pseudo-nitzschia* encontradas en la Playa de los Aliseos (el 20 de marzo y el 3 de abril de 2018) y en Playa Honda (el 3 de abril de 2018).

3.3.2. Toxinas en muestras del interior

Al igual que en el apartado anterior, la Tabla VIII muestra la densidad de *Pseudo-nitzschia delicatissima* y de otras especies de este género no identificadas a nivel de especie junto con el nivel de toxina encontrado y los niveles de detección y cuantificación para el ácido domoico en la estación del interior del Mar Menor denominada MM1 para cada fecha analizada.

Tabla IX. Densidad de diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* (cel/L), nivel de Ácido domoico (ng/L) y niveles de detección (LD) y cuantificación (LQ) para el ácido domoico en la estación del interior del Mar Menor denominada MM1 para cada fecha analizada.

MM1	Pseudo-nitzschia delicatissima (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp1 (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp2 (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp3 (cel/L)	AD (ng/L)	LD DA (ng/L)	LQ DA (ng/L)
23/11/2017	3.16E+05	-	-	-	ND	26.1	78.3
28/11/2017	1.94E+04	-	-	-	NQ	31.8	95.5
07/12/2017	2.43E+04	-	-	-	ND	19.3	58
22/12/2017	7.29E+03	-	-	-	NQ	26.5	79.5
07/02/2018	-	-	-	-	ND	123	371
22/03/2018	-	-	-	-	144	27.5	82.5
26/03/2018	-	-	-	-	ND	27.5	82.5
04/04/2018	-	1.22E+03	-	-	107	17.4	52
09/04/2018	-	-	-	-	147	34.4	103
16/04/2018	-	-	4.86E+03	-	117	34.4	103

Se puede apreciar que para esta localidad las 4 fechas donde se encontró la especie *Pseudo-nitzschia delicatissima* no se detectó o no se pudo cuantificar la concentración de ácido domoico. Otras en dos muestras con presencia de una especie de *Pseudo-nitzschia* (sp1 y sp2 respectivamente) se detectó ácido domoico, pero en otras dos muestras donde se detectó esta sustancia no se encontraron células de este género.

Al igual que la Tabla IX, la Tabla X muestra la densidad de *Pseudo-nitzschia delicatissima* y de otras especies de este género no identificadas a nivel de especie junto con el nivel de ácido domoico encontrado y sus niveles de detección y cuantificación en la estación MM2.

Tabla X. Densidad de diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* (cel/L), nivel de ácido domoico (ng/L) y niveles de detección (LD) y cuantificación (LQ) para el ácido domoico en la estación del interior del Mar Menor denominada MM2 para cada fecha analizada.

MM2	Pseudo-nitzschia delicatissima (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp1 (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp2 (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp3 (cel/L)	AD (ng/L)	LD DA (ng/L)	LQ DA (ng/L)
23/11/2017	4.64E+05	-	-	-	102	30.3	90.9
28/11/2017	-	-	-	-	NQ	31.8	95.5
07/12/2017	1.70E+04	-	-	-	82.9	26.5	79.5
22/12/2017	2.43E+03	-	-	-	NQ	26.5	79.5
07/02/2018	2.43E+03	-	-	-	NQ	26.5	79.5
22/03/2018	-	1.22E+04	-	-	NQ	26.5	79.5
26/03/2018	-	-	7.29E+03	1.46E+04	NQ	26.5	79.5
04/04/2018	-	-	-	-	NQ	34.4	103
09/04/2018	-	-	-	-	NQ	34.4	103
16/04/2018	-	-	-	-	NQ	34.4	103

En esta estación, en cambio se ha detectado ácido domoico en dos muestras con presencia de *Pseudo-nitzschia delicatissima* y en cambio no se ha detectado en otras muestras en las que sí estaban presentes tanto esta como otras especies del género.

Igualmente, la Tabla XI muestra estos mismos resultados para la estación MM3 al sur del Mar Menor.

Tabla XI. Densidad de diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* (cel/L), nivel de ácido domoico (ng/L) y niveles de detección (LD) y cuantificación (LQ) para el ácido domoico en la estación del interior del Mar Menor denominada MM3 para cada fecha analizada.

MM3	Pseudo-nitzschia delicatissima (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp1 (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp2 (cel/L)	Pseudo-nitzschia sp3 (cel/L)	AD (ng/L)	LD DA (ng/L)	LQ DA (ng/L)
23/11/2017	1.46E+04	-	-	-	76.1	21.6	64.9
28/11/2017	2.43E+03	-	-	-	NQ	31.8	95.5
07/12/2017	7.29E+03	-	-	-	NQ	26.5	79.5
22/12/2017	2.43E+03	-	-	-	NQ	26.5	79.5
07/02/2018	-	-	-	-	NQ	26.5	79.5
22/03/2018	-	-	-	-	NQ	26.5	79.5
26/03/2018	-	-	-	-	ND	77.5	233
04/04/2018	-	-	-	-	NQ	46.1	138
09/04/2018	-	-	-	-	NQ	34.4	103
16/04/2018	-	-	-	-	NQ	34.4	103

En cambio, en esta estación sólo se detectó ácido domoico en una muestra donde estaba presente *Pseudo-nitzschia delicatissima*.

4. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados anteriormente mostrados señalan que sólo se ha detectado ácido domoico de entre todas las toxinas analizadas. Todos los resultados de este estudio hay que considerarlos con muchas cautelas puesto que se trata de los primeros datos obtenidos con una técnica de laboratorio extremadamente sensible. La presencia de esta toxina, no obstante, debe enmarcarse en el contexto de que este tipo de toxinas pueden encontrarse en el agua, pero su vía de transmisión es a través de la ingesta de alimentos que previamente la han bioacumulado. De hecho, toda la legislación actual hace referencia a la concentración en el animal que la acumula.

Para tener una idea de la concentración equivalente de la densidad en agua con respecto a los límites legales establecidos en ha procedido a realizar las siguientes consideraciones:

Se ha obtenido de la legislación el denominado *nivel de efecto adverso más bajo observado* - **Lowest Observed Adverse Effect Level – LOAEL** que es la menor

concentración o cantidad de una sustancia, hallada experimentalmente o por observación, que provoca una alteración adversa de la morfología, la capacidad funcional, el crecimiento, el desarrollo, o duración de la vida útil de los organismos diana, distinguibles de los observados en organismos normales (control) de la misma especie y cepa, bajo condiciones definidas e idénticas a las de exposición. Se expresa en mg/kg/día.

Seguidamente, y de acuerdo con el *Panel sobre contaminación en la cadena alimenticia* - **Panel on Contaminants in the Food chain (CONTAM)** - de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria - European Food Safety Authority – EFSA -, que es el comité que proporciona asesoramiento científico sobre contaminantes en la cadena alimentaria y sustancias no deseadas como toxinas naturales, y residuos de sustancias no autorizadas, se ha obtenido la *dosis de referencia aguda* - **Acute Reference Dose – ARfD** -, basada en los datos disponibles en humanos sobre toxicidad aguda, sobre casos reales que ha habido. Es la cantidad de compuesto a la que ya se ven unos efectos tóxicos agudos en la persona que lo ha ingerido.

De esta forma, y según la regulación (EC) nº 853/2004 que establece el nivel de toxinas ASP, particularmente el ácido domoico en 20 mg de AD por Kg de carne de marisco (vianda) se podría hacer un cálculo de la cantidad que recibiría una persona de 60 Kg de peso que ingiriera una ración de 0.4 Kg de marisco.

El resultado sería que la persona en cuestión llegaría alcanzar una concentración de 130 ppb:

$$20 \text{ mg / Kg s.m. (shelfish meat) (ppm)} \times 0.4 \text{ Kg s.m. / 60 Kg b.w.} = 130 \text{ } \mu\text{g / Kg b.w. (ppb)}$$

donde s.m. es la abreviatura de shelfish meat (vianda), b.w. es la abreviatura de body weight (peso corporal).

Si multiplicáramos la **ARfD** (30 $\mu\text{g / Kg b.w.}$) por el peso corporal de una persona (60 Kg b.w.) y lo dividiéramos por el peso de una ración de vianda (0.4 Kg s.m.), obtendríamos la concentración que debería tener para que resultara con efecto. De esta manera el alimento ingerido debería tener una concentración de 4.5 ppm:

$$\text{ARfD } 30 \mu\text{g} / \text{Kg b.w.} \times 60 \text{ Kg b.w.} / 0.4 \text{ Kg s.m.} = 4.5 \text{ mg} / \text{Kg s.m. (ppm)}$$

En nuestro caso se han detectado en agua límites de detección (LDs) medios con el procedimiento analítico entre 19.3 y 123 ng/L (ppt) y los niveles en vianda serían del orden de mg/Kg (ppm), es decir se estarían detectando toxinas con un nivel del orden de 10.000 veces por debajo del exigido. No obstante, estos datos son sólo - se insiste sólo, únicamente— aproximativos para ver el orden de magnitud en el que nos estaríamos moviendo.

Puesto que el vector de transmisión de esta toxina es la ingestión de marisco que la ha acumulado, puesto que la legislación hace referencia a cultivos, fundamentalmente de bivalvos, deberíamos hacer algún tipo de cálculo para tener una idea de cuantos litros de agua habría que ingerir, para que se si acumulara la toxina del agua tuviera algún efecto. Para ello se toma la siguiente aproximación – y se insiste, de nuevo estos cálculos no tienen todavía valor en sí mismos, son únicamente para tener una idea de que cantidad de agua habría que ingerir para que pudiera haber algún efecto adverso-: multiplicando el ARfD por el peso corporal de una persona media se obtendría la cantidad de toxina necesaria para que produjera un efecto. Conociendo la concentración de toxina encontrada en el medio (en este caso la máxima encontrada 0.812 $\mu\text{g} / \text{L}$) se podría obtener el volumen de agua que contendría la suficiente toxina para que si fuera ingerido por una persona produjera efecto agudo con un resultado de más de 2000 L.

$$\text{Contenido de DA más alto encontrado hasta ahora} = 812 \text{ ng} / \text{L} = 0.812 \mu\text{g} / \text{L}$$

$$\text{ARfD} = 30 \mu\text{g} / \text{Kg b.w.} \times 60 \text{ Kg b.w.} = 1800 \mu\text{g de DA}$$

$$0.812 \mu\text{g} / \text{L de agua de mar} \times \text{¿? L} = 1800 \mu\text{g de DA} \rightarrow > 2000 \text{ L}$$

Conviene insistir de nuevo que estos datos y cálculos son provisionales y por tanto sujetos a revisión, y que en cualquier caso se han realizado únicamente para tener una estima del orden de magnitud de las cifras tanto obtenidas como legales. Resulta obvio que estos datos no pueden sacarse de contexto y deben considerarse como lo que todavía son, una aproximación y unos primeros resultados preliminares de un estudio

inicial que todavía no ha concluido y que pretende discriminar umbrales de riesgo por proliferaciones de fitoplancton potencialmente tóxico.

Los datos disponibles por el momento muestran una gran variabilidad y todavía no pueden establecerse relaciones consistentes entre las densidades de células encontradas y las concentraciones de toxinas. Puede ocurrir que unas especies incluidas en la relación de especies potencialmente tóxicas del IOC-UNESCO presenten toxicidad en unos lugares y no en otros, o que las toxinas detectadas fueran producidas por otras especies presentes en el agua y no por las que aparecen en la relación. En cualquier caso, existe una amplísima variabilidad que hay que acotar en estudios siguientes, por ejemplo, ¿podía deberse la presencia de toxina en el agua a unas células que la hubieran liberado un tiempo antes o en un lugar diferente?, esta y otras muchas cuestiones requieren de la obtención de muchos más datos para establecer patrones de variabilidad que permitan explicar la discrepancia aparente entre algunos de los resultados encontrados.