

Las microalgas nocivas de México

Actualmente en México se enfrentan a las proliferaciones nocivas de los fitoplancton tales como el enteromorfo, las mareas rojas, las mareas azules, se han reportado taxonógicamente.

José Luis Ochoa y Berta Olivia Arredondo Vega

RESUMEN

El interés por estudiar los componentes nocivos del fitoplancton marino (organismos vegetales) adquiere sentido cuando nos percatamos del impacto que las “proliferaciones microalgales nocivas” (*harmful algal blooms*), frecuentemente asociados a mareas rojas tóxicas, tienen sobre el medio ambiente, las actividades socio-económicas y la salud del hombre. México, al igual que el resto de los países del mundo, viene experimentando un importante reto para el aprovechamiento sustentable de sus recursos marinos. El incremento explosivo de la población en las regiones costeras, la actividad pesquera, y la contaminación y degradación de lagunas, estuarios y humedales se ha traducido en un serio impacto tanto sobre el medio ambiente como sobre el ámbito socio-económico.

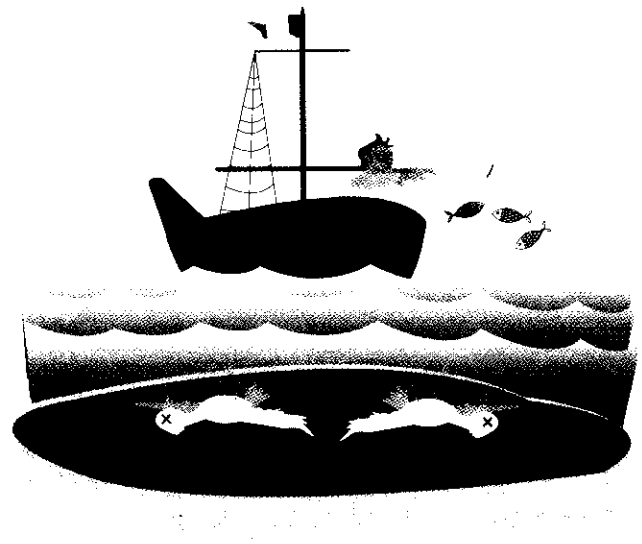
Ahora reconocemos y nos enfrentamos a numerosos eventos considerados contingencias ambientales en que la fauna marina y la salud de la población humana se ven expuestas a los desarrollos súbitos de microalgas consideradas nocivas, dañinas o tóxicas, y es necesario implantar medidas para su mitigación y control.

Haciendo un recuento de los esfuerzos realizados en el estudio del fitoplancton tóxico y sus manifestaciones como mareas rojas, destacamos aquí el aislamiento y cultivo de un dinoflagelado béntico (*Prorocentrum lima*), que a la fecha es el primer caso en México.

INTRODUCCIÓN

La primera experiencia exitosa de nuestro grupo en el tema de fitoplancton tóxico fue el esclarecimiento de la morbilidad de aves marinas (*Pelecanus occidentalis*) que se registró en Cabo San Lucas, Baja California Sur, en 1996 (Ochoa y colaboradores, 1996). Las autoridades de la Procuraduría Federal de Protección al Medio Ambiente (Profepa), de la Secretaría de Eco-

logía, Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (Semarnap), solicitaron el auxilio del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, ante lo que se consideraba era resultado de la intensa actividad turística de la zona que ha favorecido la instalación de numerosos hoteles, sitios de esparcimiento, etcétera, algunos de los cuales no han cumplido satisfactoriamente con las normas recomendadas para el tratamiento de las aguas de desecho de sus instalaciones. En esa ocasión se tomaron en cuenta las observaciones de los pescadores, que aseguraron un comportamiento "extraño" de las aves antes de sucumbir, como pista para la solución del problema. Algunas, por ejemplo, estando en el agua nadaban con la cabeza sumergida, otras se mostraban "desorientadas" y algunas regurgitaban el alimento. Se colectaron algunas aves muertas y vivas con claros signos de intoxicación, lo que facilitó su captura. Las aves fueron trasladadas al laboratorio y se efectuaron diversos análisis de evaluación. En un par de casos se obtuvieron incluso muestras de los contenidos estomacales. Los estudios permitieron concluir que efectivamente se trataba de una intoxicación por consumo de macarela (*Scomber japonicus*) que estaba contaminada con ácido domoico, una toxina asociada al síndrome de Envenenamiento Amnésico (*amnesic shellfish poisoning*) que había sido reportado por primera vez en Canadá (Bird y colaboradores, 1988) y poco más tarde en los Estados Unidos (Work y colaboradores, 1991). En Canadá, más de un centenar de personas que consumieron almejas colectadas en la Isla Príncipe Eduardo tuvieron que ser hospitalizadas, y un par de ellas murieron. Los investigadores canadienses lograron rastrear la causa y el origen de la intoxicación por la diatomea *Pseudonitzschia pungens*. Fue ésta la primera vez que se demostraba que las diatomeas podían ser tóxicas. En el caso de la costa occidental de los Estados Unidos, el impacto de la presencia de la diatomea *Pseudonitzschia australis* se asoció con la mortandad masiva de aves y mamíferos marinos. En este evento, los organismos afectados habían consumido anchoas contaminadas con la toxina ácido domoico que fue detectada en los tejidos de los animales muertos. Regresando al caso de Cabo San Lucas, se concluyó que los pelícanos se habían alimentado sobre una mancha de macarela que había estado expuesta a un desarrollo masivo de una diatomea del género *Pseudonitzschia sp.*, cuyas frústulas fueron observadas en peces sin digerir obtenidos en los estómagos de las aves. La toxina de ácido domoico pudo ser detectada tanto en tejidos y órganos de los pelícanos como de los peces, pero la





● <i>Prorocentrum lima</i>	● <i>Alexandrium spp.</i>	<i>Gymnodinium breve</i>
● <i>Dinophysis ssp.</i>	● <i>Pfiesteria piscicida</i>	<i>Gambierdiscus toxicus</i>
● <i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	● <i>Pyrodinium bahamense</i>	
● <i>Gymnodinium catenatum</i>		

Figura 1. Registros de proliferaciones microalgales nocivas en la República Mexicana.

diatomea causante desafortunadamente no fue identificada plenamente.

INCIDENCIA DE EVENTOS DE "MAREA ROJA" EN MÉXICO

Los eventos asociados a mareas rojas tóxicas no son exclusivos de México, y están ocurriendo en todas partes (Figura 1). Los países con suficientes medios económicos han implantado programas nacionales para prestar atención a dichos eventos naturales y proteger sus recursos y a la población. Desafortunadamente, en México aún no existe un programa similar. El trabajo en México sobre el tema de mareas rojas tóxicas lo ha realizado un pequeño grupo de investigadores dispersos en diferentes instituciones que son insuficientes para abarcar todo el litoral del país y prestar atención oportuna a las contingencias que se presentan año con año. Las aportaciones de varios investigadores mexicanos al conocimiento del fitoplancton tóxico de México es encomiable, pero aún escaso para dar respuesta a preguntas relacionadas con los mecanismos que disparan el desarrollo masivo de especies de fitoplancton nocivo, las condiciones que las favorecen y su distribución, las estrategias de adaptación desarrolladas para

subsistir en el medio marino que caracteriza nuestro litoral, y la producción, regulación, composición, grado de toxicidad y especificidad de las toxinas que contienen, así como de procedimientos para su control, mitigación o erradicación.

Se puede considerar que actualmente en México existe una acertada aproximación a la problemática que encierran las proliferaciones masivas de fitoplancton tóxico, al menos respecto a la posible identificación de los principales componentes de una marea roja tóxica; sin embargo, se ha hecho muy poco para procurar el cultivo de los organismos implicados y, por ende, desconocemos los aspectos de su variabilidad genética o toxicológica. Por ejemplo, los estudios actuales no son suficientes para confirmar si las especies de organismos fitoplanctónicos tóxicos aislados en México son idénticos a los aislados de otras regiones en el mundo. Los trabajos de Cortés-Altamirano y co-

laboradores (2000), al igual que estudios propios (Heredia-Tapia y colaboradores, 2002), indican cierto grado de variabilidad expresada en diferencias de tamaño, formas, toxicidad y perfil de componentes tóxicos, lo que confirma la sospecha de que las condiciones ambientales de la zona de transición que caracteriza al Pacífico mexicano influyen en las propiedades de los organismos obtenidos en dicha zona. Todo ello apunta a la necesidad de procurar la realización de estudios de más fondo, y no sólo taxonómicos, que permitan establecer si las variaciones son resultado de la adaptación de estos organismos a nuestro particular ambiente marino (Plumley, 1997).

El propósito de nuestro grupo ha sido dar pasos en la dirección señalada. Hemos aprovechado la circunstancia de un evento de intoxicación de varios pescadores de la isla El Pardito, en el golfo de California, que al consumir peces capturados en la zona mostraron los signos de un cuadro "ciguatérico" o de envenenamiento diarreico (*diarrhetic shellfish poisoning*), para dirigir el trabajo de manera adecuada. Las muestras de los peces colectados mostraron ser positivas a la prueba de toxicidad mediante el bioensayo de ratón, y en éstos los signos de la intoxicación confirmaron los síndromes que son comunes para la "ciguatera" o el envenenamiento diarreico. Dado que estos tipos de envenenamiento son usualmente generados por exposición a las toxinas producidas por dinoflagelados bénticos, nos concentramos en buscar los indicios del organismo causante en el fondo marino. El esfuerzo rindió sus frutos y se logró aislar un dinoflagelado béntico identificado como *Prorocentrum lima*, por lo cual se procedió a llevar a cabo su purificación y cultivo como se describe enseguida. Una vez logrado el cultivo, se evaluó su toxicidad en diferentes modelos experimentales y se identificó su composición o perfil de toxinas en extractos obtenidos del organismo mediante técnicas convencionales.

AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL DINOFLAGELADO TÓXICO MARINO *PROROCENTRUM LIMA*

De 1992 a 1996 han sido 37 los casos de envenenamiento "ciguatérico" reportados solamente en Baja California Sur. Éstos ocurrieron al norte de la Bahía de La Paz, en la isla El Pardito y en Punta San Evaristo y en Rocas Alijos, al oeste de Bahía Magdalena (Figura 1). Posterior a un evento de tipo "ciguatérico", en el área de la isla de El Pardito, BCS, a finales de agosto de 1997, se colectaron 20 muestras de los sustratos bénticos: piso (arena y gravita), algas (algas calcáreas y *Cauler-*

pa sp.), coral (fitobentos asociado a cabezas de coral muerto de *Pocillopora verrucosa*), rocas de canto rodado (biomasa verde formando tapetes sobre rocas medianas y pequeñas), y detritus (biomasa verde en arrecife rocoso). Las muestras fueron homogenizadas separadamente en bolsas de plástico y filtradas sucesivamente por tamices con una abertura de malla de 500, 250 y 100 micrómetros. De cada filtrado se tomó 1 mililitro que se fijó con glutaraldehído para su posterior identificación; otros 3 mililitros se adicionaron a frascos de vidrio estériles con 100 mililitros de medio ES-Si (Harrison y colaboradores, 1980). Todas las muestras fueron trasladadas al laboratorio para su ulterior análisis.

En el laboratorio, las muestras en medio de cultivo ES-Si se mantuvieron por espacio de cuatro meses como cultivos mixtos, proporcionando agitación constante (130 revoluciones por minuto) en una incubadora a 22 ± 2 grados centígrados, con luz

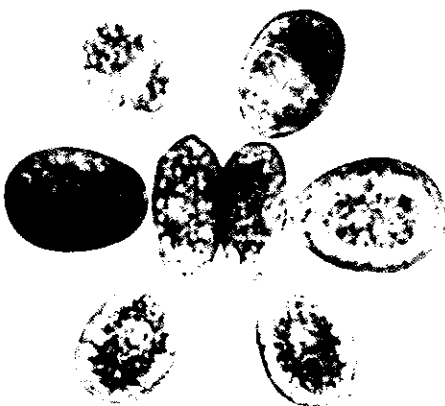
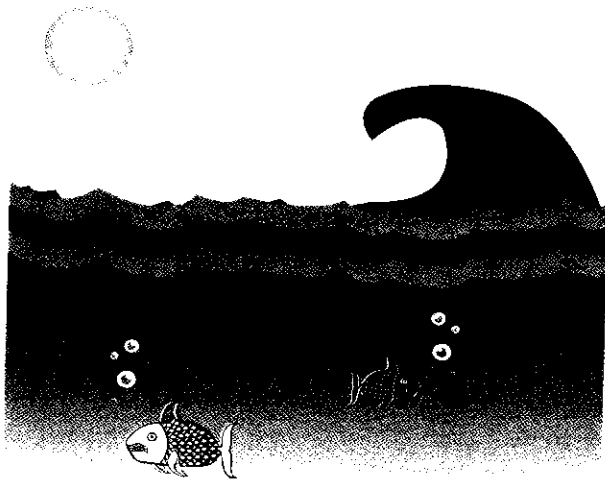


Figura 2. *Prorocentrum lima*, dinoflagelado tóxico marino aislado de la isla El Pardito, Baja California Sur.

continua, usando una lámpara de luz blanca (40 Watts). Periódicamente las muestras se examinaron por medio de microscopía óptica para identificar las especies presentes destacando, siempre viable, constante y predominante, el dinoflagelado identificado como *Prorocentrum lima*. Los recambios del medio de cultivo se realizaron cada 28 días, utilizando tamices para tratar de obtener cultivos unialgales del dinoflagelado predominante. También se recurrió en repetidas ocasiones a la purificación del dinoflagelado mediante tamizados, sonicaciones leves y mediante la técnica de micropipeta. Para la eliminación de cianobacterias se utilizaron mezclas de antibióticos y, para inhibir el crecimiento de diatomeas (importantes competidores de dinoflagelados), se eliminó la fuente de silicatos en el medio de cultivo, preparándolo con agua de mar artificial. Finalmente, por el método de micropipeta se intentó el establecimiento del cultivo unialgal del dinoflagelado, aislando de 10 a 20 células en cada ocasión y utilizando un microscopio invertido. Los organismos se colocaron en matraces Erlenmeyer con 50 mililitros de medio ES-Si y en agitación para promover su desarrollo, sin conseguir el resultado deseado. Modificando el tamaño de inóculo, tomando sólo cinco células que se colocaron en un tubo de vidrio con 5 ml de medio ES-Si y sin movimiento, se consiguió un cultivo en las siguientes condiciones: temperatura de 22 ± 1 grados centígrados, luz blanca y un fotoperiodo de 12/12 horas (luz/oscuridad). En consecuencia, para el establecimiento de un cultivo de *P. lima* se recomienda la inoculación en tubos de vidrio de volumen pequeño, sin agitación, bajo condiciones de luz apropiada y la aplicación de un fotoperiodo.

Aunque desde el inicio las observaciones al microscopio permitieron la identificación parcial del dinoflagelado, su identidad y características pudieron ser corroboradas al establecerse el cultivo unialgal. Se trata pues de un dinoflagelado béntico, ahora plenamente identificado como *Prorocentrum lima*, cuya longitud varía de 31 a 47 micrómetros y cuyo ancho está entre 22 y 40 micrómetros (Figura 2). Posee cloroplastos, un núcleo posterior y dos flagelos que emergen de la parte anterior de la célula. Presenta dos valvas (izquierda y derecha) con formas de oblongas a ovaladas. El final anterior de la valva izquierda está ligeramente curvado o aplanado, mientras que la valva derecha tiene una depresión triangular en forma de V donde se encuentra el área del poro apical. Esta área está formada por ocho placas de forma y tamaño iguales. Las valvas son lisas y presentan poros tricoquísticos con un arreglo de 57 a 72

poros marginales y de 58 a 85 poros valvares, los cuales evitan el área central de la célula donde se presenta el pirenoide central. La especie en cuestión, que corresponde a la descripción de *Prorocentrum lima* (Faust, 1991), puede reproducirse tanto asexualmente (Faust, 1993a) como sexualmente por formación de quistes (Faust, 1993b).

La descripción dada corresponde a un organismo en cultivo unialgal, no-axénico, y en general estos microorganismos crecen mejor en presencia de bacterias, sugiriendo un sinergismo que pudiera influir en sus propiedades. Para confirmar esta hipótesis y para posibilitar la realización de estudios más profundos de carácter bioquímico, fisiológico y biológico-molecular, estamos actualmente aplicando esfuerzos para la obtención del cultivo axénico correspondiente.

Otros estudios complementarios realizados con el cultivo unialgal se relacionaron con la determinación de la curva de crecimiento de este dinoflagelado en tres medios de cultivo: ES-Si (8), f/2-Si y K-Si (Séller, 1987), que nos permitieron concluir que f/2-Si es el medio que favorece la mayor densidad celular (Figura 3). Asimismo, en este cultivo se cuantificó el contenido de pigmentos y ácidos grasos de la cepa mediante cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases-espectrometría de masas, identificándose al pigmento de mayor concentración como clorofila c, seguido de peridinina y clorofila a. Cabe señalar que este último pigmento no se detectó en el medio de cultivo K, lo que también sugiere la importancia de emplear un medio de cultivo adecuado. Por lo que respecta a la composición y concentración de ácidos grasos, el de mayor concentración en los tres medios de cultivo probados fue el C_{16:1}, seguido del C_{14:1}.

Respecto a la composición de toxinas de extractos obtenidos de un cultivo unialgal destaca la proporción relativa de los principales componentes (ácido okadáico y la dinofisistoxina-1) (Figura 4), que muestran una relación inversa a la encontrada en la mayoría de las cepas de *P. lima* aisladas en otras regiones del mundo. Además, el bioensayo de ratón y la determinación cuantitativa por cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrometría de masas, indican la posible presencia de un tercer componente tóxico que por el método cromatográfico empleado no puede ser detectado y que podría ser

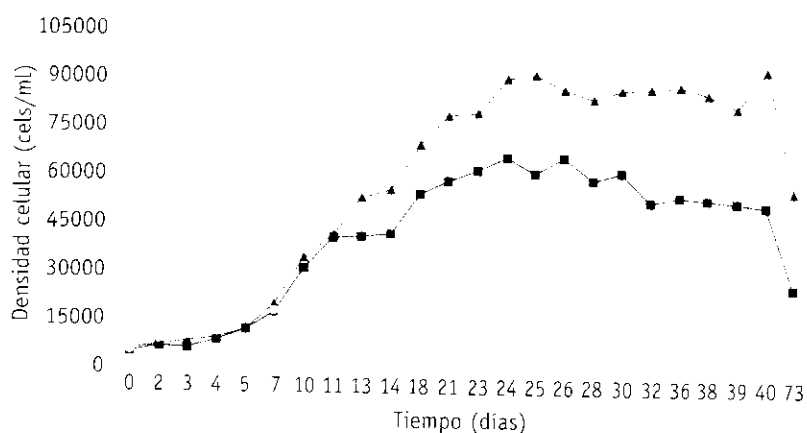


Figura 3. Curva de crecimiento del dinoflagelado tóxico marino *Prorocentrum lima* en diferentes medios de cultivo (f/2-Si; ES-Si; y K-Si).

la toxina denominada *prorocentrumuro*, lo cual, de ser confirmado, explicaría la diferencia en toxicidad observada entre el bioensayo y el método analítico.

CONCLUSIONES

El aislamiento y cultivo *Prorocentrum lima* constituye, hasta donde sabemos, el primer caso de un dinoflagelado tóxico aislado en México. Reconociendo el trabajo pionero de B.E. Osorio-Tafall, quien en 1946 reportó el aislamiento de *Oxyrrhis marina* como responsable de la tinción o coloración rosada del agua de mar en una laguna costera de Isla Natividad en Baja California, es conveniente admitir que la sola sobrevivencia del organismo, aunque activo y en multiplicación por espacio de dos meses en el laboratorio, no puede ser juzgada como un cultivo exitoso.

Hemos justificado la importancia de este tipo de esfuerzo con base en el impacto de los afloramientos microalgales nocivos observados en nuestro país. Debemos insistir que adquirir un mayor conocimiento sobre nuestros recursos nos permitirá la adopción de medidas preventivas, de control y mitigación apropiadas. El costo de una veda como la aplicada en el Estado de Tamaulipas de octubre 16 del 2000 hasta el 15 de febrero del 2001 (www.tamaulipas.gob.mx/sedeem/sectores/pesca/ultimos_bol.htm), seguramente ha sido considerable.

Agradecimientos

Proyectos Conacyt 4017P y 31958B; Fiscales abm1, pac1 y pac19. Alejandra Heredia Tapia y Erick Núñez Vázquez realizaron el aislamiento y cultivo de *P. lima* como tesis de licenciatura.

Bibliografía

- Ochoa, J. L., A. Sierra-Beltrán, A. Cruz-Villacorta, y E. Núñez-Vázquez (1996), "Domoic acid in México", *Can. Tec. Rep. Fish. Aquatic Sci.* 2138, 82-90.
- Bird, C. K., R. K. Boyd, D. Brewer, et al. (1988), "Identification of Domoic Acid as the toxic agent responsible for the P. E. I. contaminated mussel incident", *Atlantic Res. Lab. Tech. Rep.* 56, NRCC/29083, págs. 86.
- Work, T. M., M. A. Beale, L. Fritz, M. A. Quilliam, M. Silver, K. Buck y J.L.C. Wright (1991), "Domoic acid intoxication of brown peli-

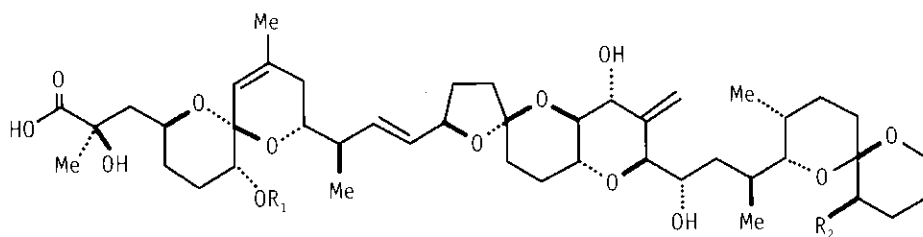


Figura 4. Grupo de toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum lima* aislado de isla El Pardito, Baja California Sur, México: ácido okadáico cuando R₁= H y R₂= H; dinofisistoxina DTX-1, cuando R₁= H y R₂= CH₃; y dinofisistoxina DTX-3, cuando R₁= un ácido graso y R₂= CH₃. (Me) es, en todos los casos, un grupo metilo (CH₃-).

- cans (*Pelecanus occidentalis*) in California, Newport RI", resumen en: 5th Int. Conf. Toxic Marine Phytoplankton, October 28-November 1, pág. 33.
- Cortés-Altamirano, R., y A. Nuñez-Pastén (2000), "*Prorocentrum mexicanum* TAFALL 1942 o sp. nov.?", en: *Estudios sobre plancton en México y el Caribe*, E. Ríos-Jara, E. Juárez-Carrillo, M. Pérez-Peña, E. López-Uriarte, E. G. Robles-Jarero, D. U. Hernández-Becerril y M. Silva-Briano (editores), Sociedad Mexicana de Planctonología-Universidad de Guadalajara, págs. 89-90.
- Heredia-Tapia, A., B. O. Arredondo-Vega, E. Núñez-Vázquez, T. Yasumoto, M. Yasuda y J. L. Ochoa (2002), "Isolation of *Prorocentrum lima* and DSP risk assessment in the Gulf of California, México", *Toxicon* 40, 1121-1127.
- Plumley, F. G. (1997), "Marine algal toxins. Biochemistry, genetics and Molecular Biology", *Limnol. Oceanogr.*, 42, 1252-1264.
- Harrison, P. J., R. E. Waters y F. J. R. Taylor (1980), "A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton", *J. Phycology*, 16, 28-35.
- Faust, M. (1991) "Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites", *J. Phycology*, 27, 642-648.
- Faust, M. (1993a), "Alternate asexual reproduction of *Prorocentrum lima* in culture", en Smayda, T. J. y Y. Shimizu (editores), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, Países Bajos, págs. 115-120.
- Faust, M. (1993b), "Sexuality in a toxic dinoflagellate, *Prorocentrum lima*", en Smayda, T. J. y Y. Shimizu (editores), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, Países Bajos, págs. 121-126.
- Keller, D. K., R. C. Selvin, W. Claus y R. R. L. Guillard (1987), "Media for the culture of oceanic Ultraphytoplankton", *J. Phycology*, 23, 633-638.
- Osorio-Tafall, B. E. (1946), "Nuevos datos sobre la distribución del dinoflagelado *Oxyrrhis marina* Duj", *Rev. Mex. Historia Nat.*, 7, 44-44.

Berta O. Arredondo Vega nació en Tijuana, Baja California. Estudió la carrera de químico en la Universidad Autónoma de Baja California y la maestría en biología en la Universidad de Guanajuato, obteniendo el doctorado en biología por parte de la Universidad de Santiago de Compostela, España. Actualmente es investigadora en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Ha publicado diversos trabajos en el campo de su especialidad y dictado cursos y dirigido tesis de nivel licenciatura y posgrado en diversas instituciones del país. Es responsable y curadora de la Colección de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
kitty@cibnor.mx

José Luis Ochoa nació en Chihuahua, Chihuahua. Es egresado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Obtuvo el doctorado en Química-Bioquímica en la Universidad de Uppsala, Suecia. Actualmente es investigador en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias, de la Sociedad Mexicana de Bioquímica y del Sistema Nacional de Investigadores. Ha publicado más de 70 trabajos en revistas científicas y de divulgación de circulación nacional e internacional.
Correo electrónico: jlochoa@pop.cibnor.mx