



I Congreso Internacional de Ciencias Exactas y Naturales

Editado por
Yuri Morales López



Universidad Nacional
Costa Rica, 2019.

Título: Crecimiento bajo condiciones controladas de laboratorio y determinación del perfil de toxinas del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

Lic. Karen Berrocal Artavia, Universidad Nacional, Costa Rica.

M.Sc. Emilia Calvo Vargas, Universidad Nacional, Costa Rica.

M.Sc. Jorge Boza Abarca, Universidad Nacional, Costa Rica.

TEMA Y REFERENTES TEÓRICOS:

El Golfo de Nicoya es un estuario altamente productivo, especialmente debido a la influencia directa de los ríos Grande de Tárcoles, Tempisque y Barranca, que anualmente depositan grandes cantidades de nutrientes a esta área. Su estudio, en diferentes disciplinas ha sido de gran interés por parte de la comunidad científica, entre ellos, la dinámica del fitoplancton. La presencia de microalgas potencialmente tóxicas, principalmente dinoflagelados que producen toxinas muy potentes podrían causar riesgos severos a la salud pública, las pesquerías, la maricultura y el turismo, con una gran repercusión socio-económica para el país.

Entre las ficotoxinas, las de tipo paralizante constituyen la principal amenaza para la salud pública (Reguera, 2002). Además, este grupo de toxinas es el que tiene la distribución más amplia en todo América Latina (Lagos, 2002) y es la intoxicación que se ha presentado en la costa pacífica de Costa Rica desde hace más de 20 años (Mata, Abarca, Marranghelo & Viquez, 1990), causada por el dinoflagelado tóxico *Pyrodinium bahamense var. compressum*. En el Golfo de Nicoya, también se observa a *Gymnodinium catenatum* otro dinoflagelado que ha sido reportado a nivel mundial como productor de toxinas paralizantes, por lo tanto, es de vital importancia conocer el perfil toxicológico de esta especie para así poder determinar el potencial tóxico que representa, aunque todas estas toxinas se derivan de una estructura común, no todas presentan el mismo grado de toxicidad. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de toxinas de tipo paralizante mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica (LC-FLD) y derivatización postcolumna, en el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* cultivado bajo condiciones controladas de laboratorio.

METODOLOGÍA:

1. Sitio de estudio:

Se recolectaron muestras frescas de fitoplancton en diferentes áreas del Golfo de Nicoya. Las estaciones de muestreo fueron: 1. Tárcoles, 2. Caldera, 3. Muelle de Puntarenas y 4. Isla Pajarita (Fig. 1). Las muestras fueron tomadas con una red de 20 µm de abertura de malla. El periodo de la recolecta fue de abril del 2008 a junio del 2009, las cuales se analizaron en el Laboratorio de Fitoplancton Marino, Estación de Biología Marina Juan Bertoglio Richards, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Puntarenas, Costa Rica.

2. Aislamiento y condiciones de cultivo:

G. catenatum fue aislado mediante la técnica de micromanipulación capilar (Reguera, 2002) con algunas modificaciones, de la estación de muestreo Caldera. Se cultivó por duplicado (cepas Gc1 y Gc2) en medio de cultivo L1 (Guillard & Hargraves, 1993), con un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad, a una temperatura de 26±1 °C, una salinidad de 31 PSU y una intensidad lumínica de aproximadamente 68 µmol fotón m⁻² s⁻¹.

La confirmación de la identidad taxonómica se realizó en el Centro Oceanográfico de Vigo, España.

El crecimiento celular se expresó como el número de células por mililitro (células/mL) y se graficaron sus fases de crecimiento en forma logarítmica, la tasa específica de crecimiento (µ) expresada en divisiones por día, se calculó utilizando la siguiente fórmula: $\text{Log}_2(N_2/N_1) / (t_2 - t_1)$.

3. Extracción de las toxinas

Se tomaron muestras de 25 mL de los cultivos en diferentes puntos de las curvas de crecimiento y se transfirieron a tubos de centrifuga. Se centrifugó durante 15 minutos a 1 500 rpm, luego se eliminó el sobrenadante y al concentrado celular se le añadió 1/3 del volumen celular de HCl 0.1 N. Los tubos se sellaron bien con papel parafilm, se rotularon adecuadamente y se mantuvieron en congelación (-30°C) hasta su análisis (Franco 2005 com. per.).

4. Metodología empleada para la detección de las toxinas paralizantes.

Para la determinación del perfil de las toxinas paralizantes, las muestras fueron analizadas mediante la Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detección Fluorimétrica (LC-LFD) y derivatización post-columna (Franco & Fernández, 1993) en el Centro Oceanográfico de Vigo, España. Los patrones de las toxinas paralizantes se adquirieron del National Research Council (NCR) de Canadá.

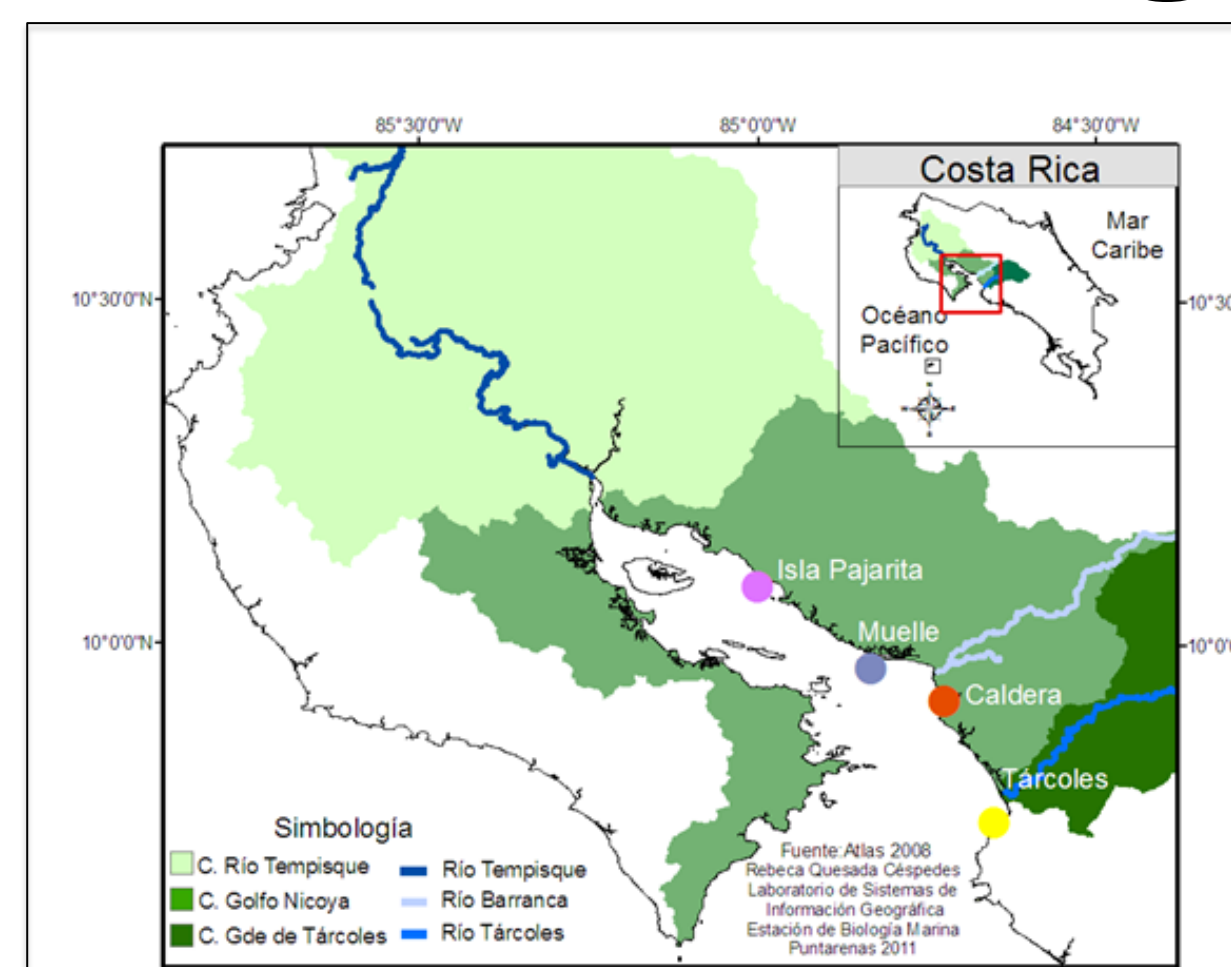


Figura 1. Estaciones de muestreo: Tárcoles, Caldera, Muelle de Puntarenas e Isla Pajarita. Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica. Fuente: Atlas 2008. Elaborado por: Rebeca Quesada Céspedes, Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica, Estación de Biología Marina, Juan Bertoglio Richards, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Puntarenas.

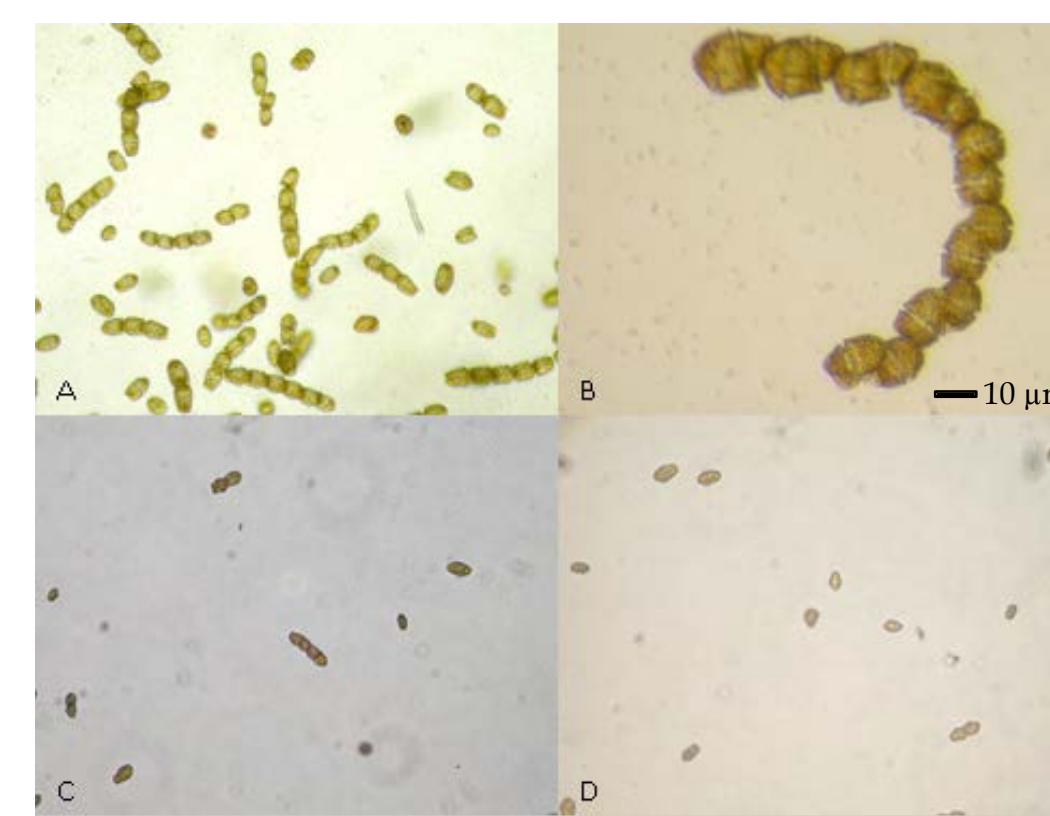


Figura 3. *G. catenatum*. A cadenas de 2, 4 y 6 células y células solitarias, B célula en etapa de división celular en ángulo oblicuo, C cadenas de 2 y 4 células y células solitarias, D cadenas de 2 células y células solitarias en la fase de muerte.

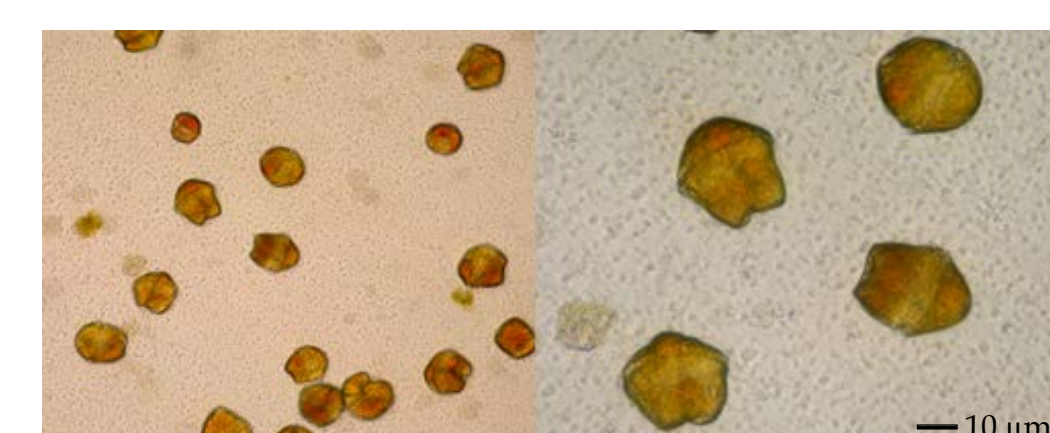


Figura 4. *G. catenatum*, células de apariencia similar a la célula vegetativa con una pigmentación rojiza cerca del epicono.

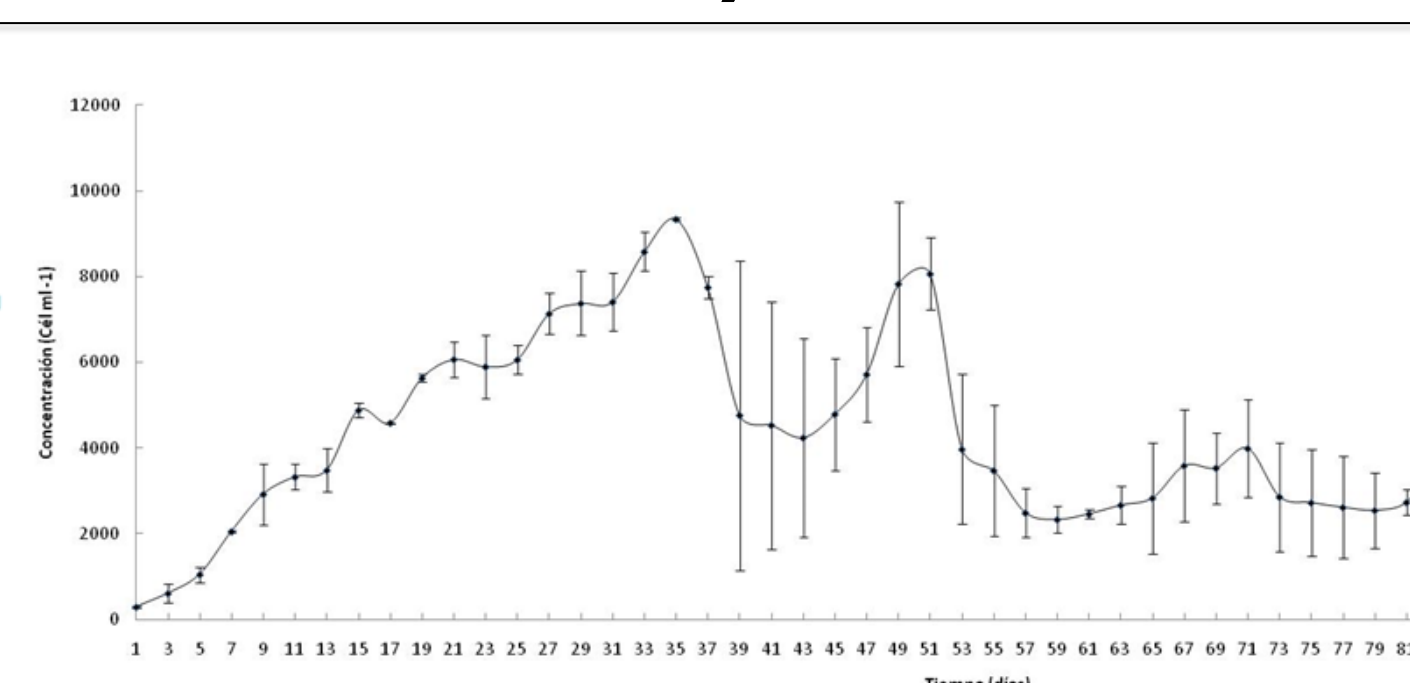


Figura 2. Curva de crecimiento del dinoflagelado *G. catenatum* cultivado a una temperatura de 26±1°C, salinidad de 31 PSU y 12 h luz:12 h oscuridad.

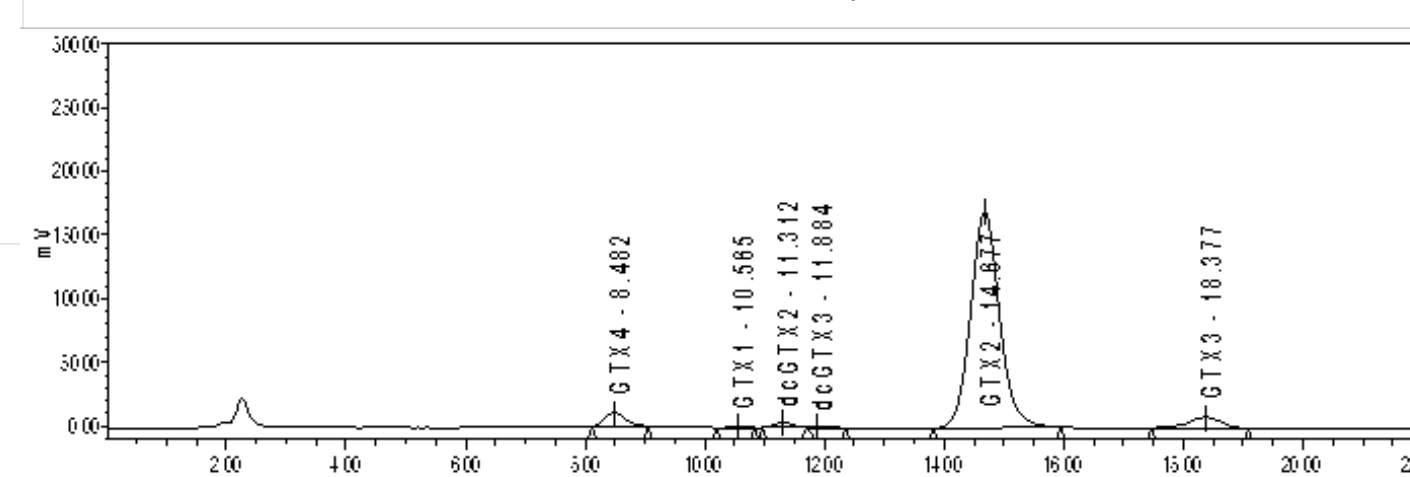


Figura 5. Perfil de las toxinas GTXs y sus derivados para *G. catenatum* cultivado de la primera fase de crecimiento de la cepa Gc 1, mediante LC-LFD y derivatización post-columna.

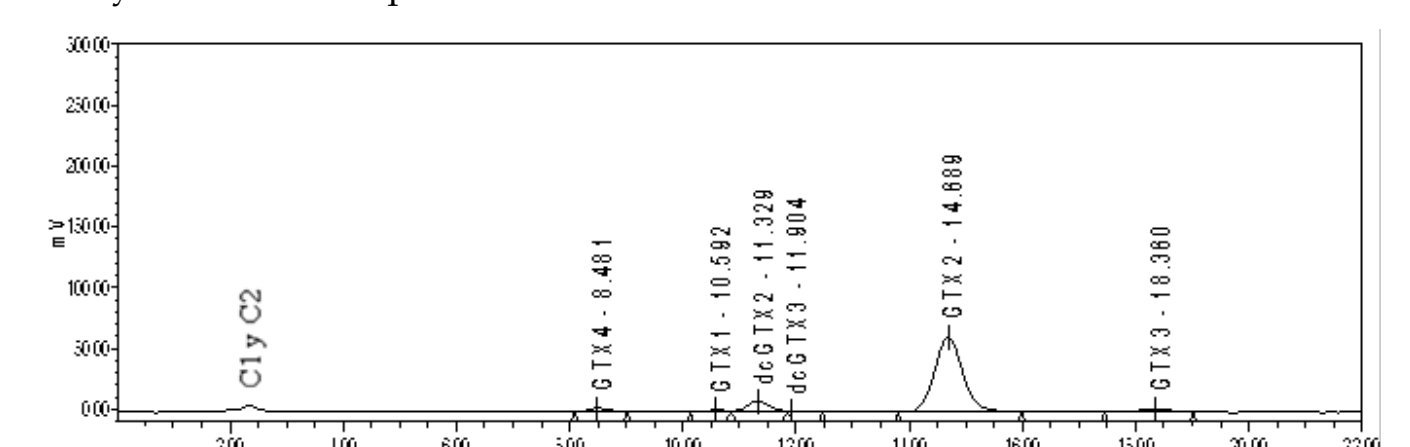


Figura 6. Perfil de las toxinas GTXs y sus derivados para *G. catenatum* cultivado de la segunda fase de crecimiento de la cepa Gc 1, mediante LC-LFD y derivatización post-columna.

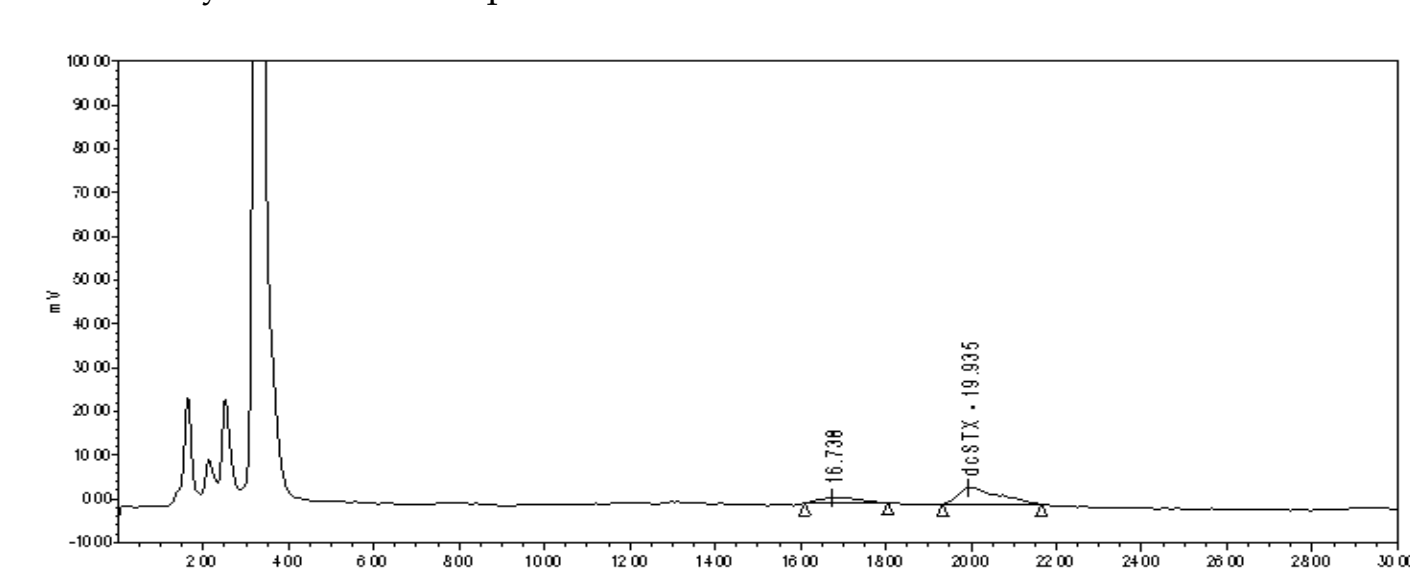


Figura 7. Perfil de las toxinas STXs y sus derivados para *G. catenatum* cultivado de la primera fase de crecimiento de la cepa Gc 1, mediante LC-LFD y derivatización post-columna.

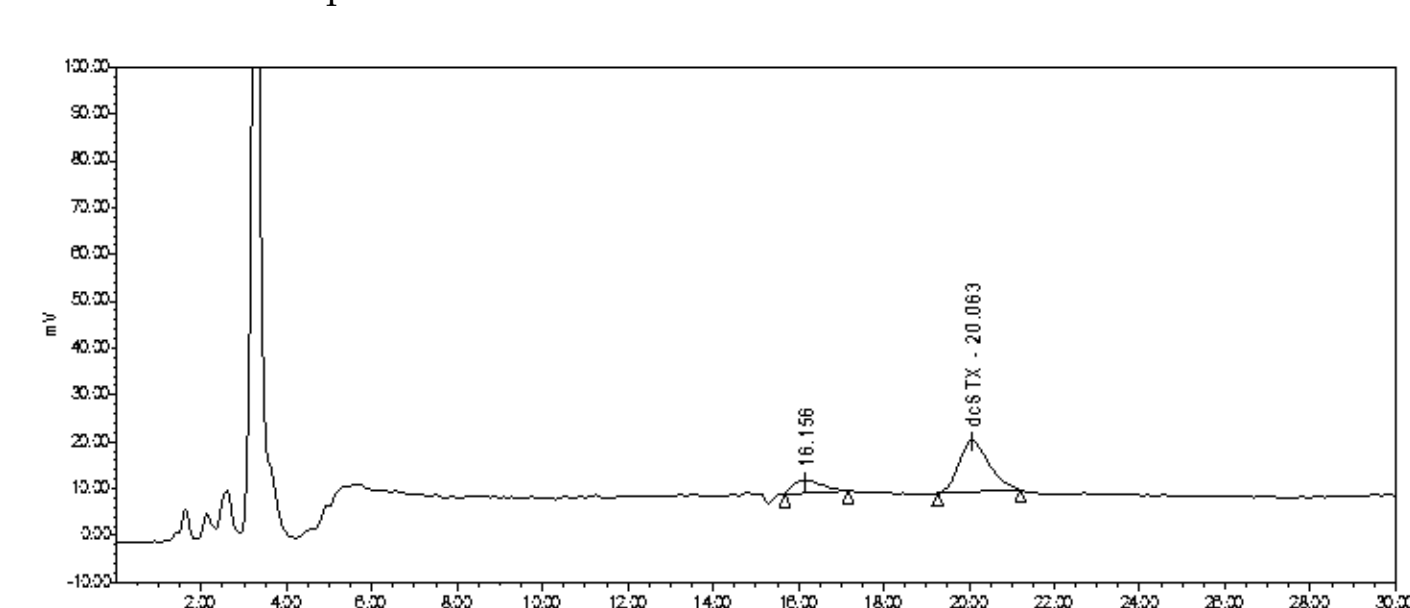


Figura 8. Perfil de las toxinas STXs y sus derivados para *G. catenatum* cultivado de la segunda fase de crecimiento de la cepa Gc 1, mediante LC-LFD y derivatización post-columna.

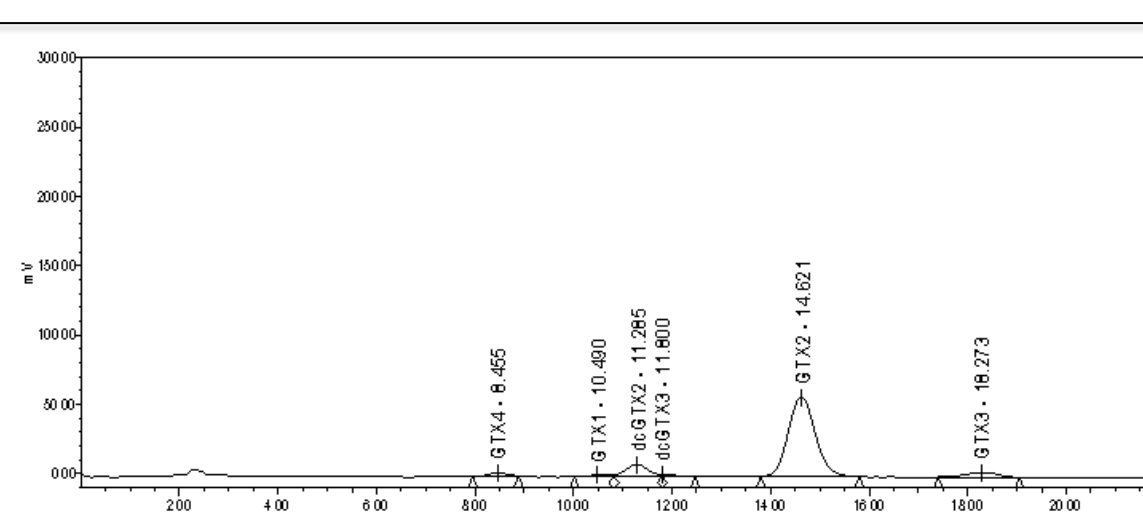


Figura 9. Perfil de las toxinas GTXs y sus derivados para *G. catenatum* cultivado de la primera fase de crecimiento de la cepa Gc 2, mediante LC-LFD y derivatización post-columna.

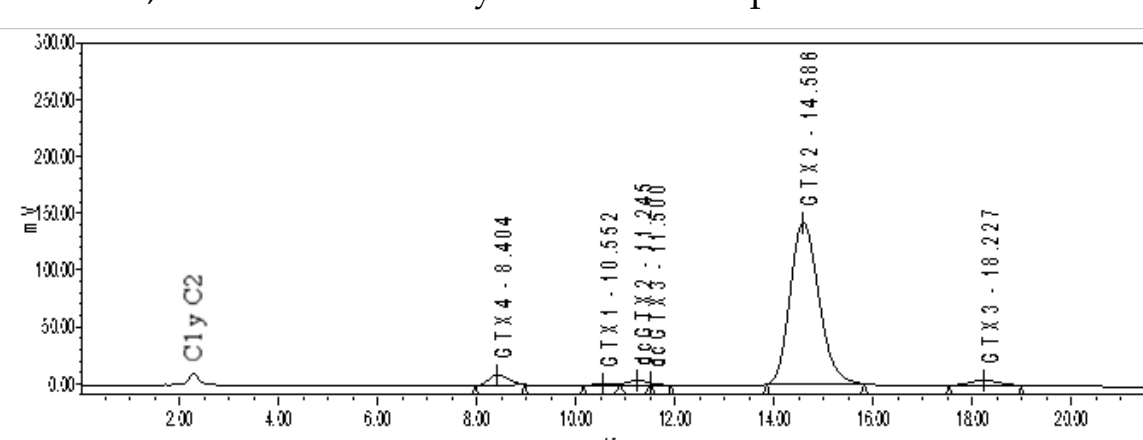


Figura 10. Perfil de las toxinas GTXs y sus derivados para *G. catenatum* cultivado de la segunda fase de crecimiento de la cepa Gc 2, mediante LC-LFD y derivatización post-columna.

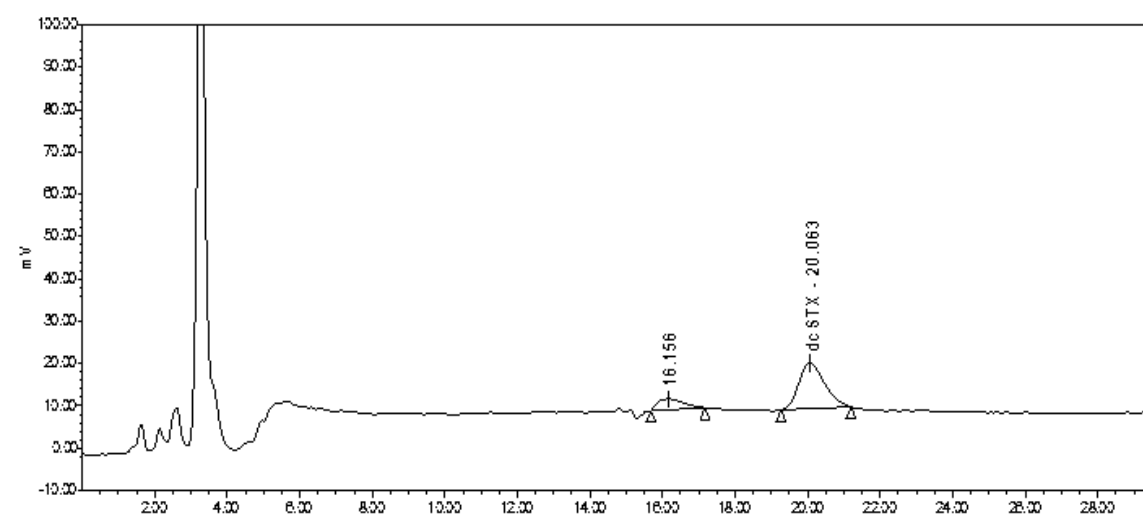


Figura 11. Perfil de las toxinas STXs y sus derivados para *G. catenatum* cultivado de la primera fase de crecimiento de la cepa Gc 2, mediante LC-LFD y derivatización post-columna.

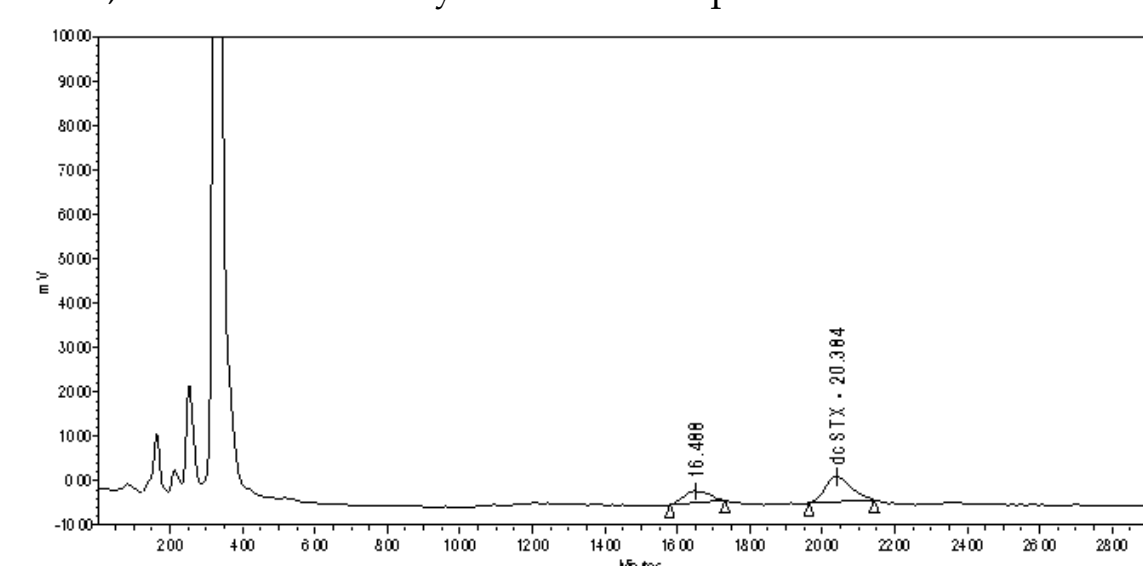


Figura 12. Perfil de las toxinas STXs y sus derivados para *G. catenatum* cultivado de la segunda fase de crecimiento de la cepa Gc 2, mediante LC-LFD y derivatización post-columna.

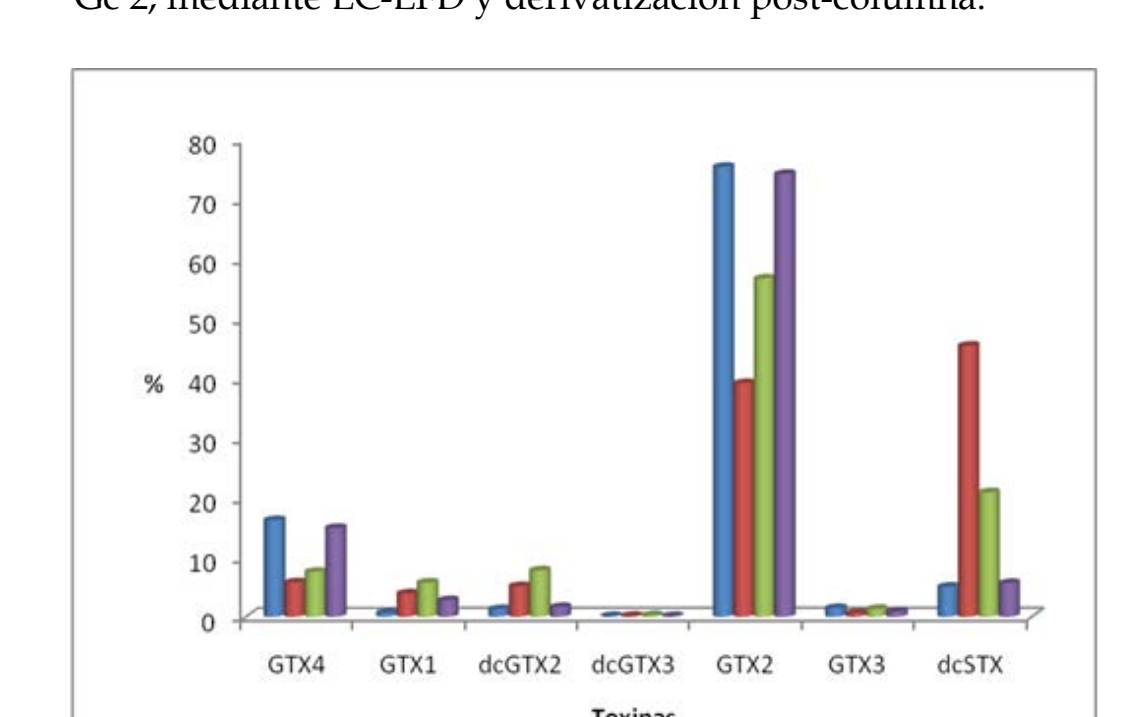


Figura 13. Porcentaje (%) de cada toxina de las cepas de *G. catenatum* cultivado, Gc 1 (■ primera y ■ segunda fase de crecimiento), Gc 2 (■ primera y ■ segunda fase de crecimiento).

RESULTADOS :

1. Crecimiento en cultivo

G. catenatum presentó dos curvas de crecimiento, en ambas no se observó una fase lag, la primera curva con una fase exponencial máxima al día 9, continuó creciendo hasta alcanzar una concentración máxima de 9 305 células/mL para el día 35, la cual cayó el día 39 y posteriormente creció nuevamente alcanzando una concentración de 7 230 células/mL para el día 51, ésta continuó con una fase de muerte que fue suspendida el día 107 (Fig. 2). La tasa de crecimiento se calculó para la primera curva y se obtuvo un valor de 0.4 divisiones/día.

Esta especie fue muy activa y de movimientos serpenteantes, de crecimiento rápido al inicio de ambas fases exponenciales. Al comienzo de la primera curva de crecimiento predominaron las cadenas de 2, 4, 6, 8, 10 y 16 células (Fig. 3 A) y la presencia de células en división celular en ángulos oblicuos (Fig. 3 B), y cadenas de 8 células en la fase de crecimiento máxima, posteriormente predominaron las cadenas de 2 y 4 células, y células solitarias en la fase de muerte. En el inicio de la segunda fase exponencial predominaron las cadenas de 2, 4 y 6 células (Fig. 3 C) y en la fase de muerte fueron mayores las cadenas de 2 células y solitarias (Fig. 3 D).

En los pocillos de cultivo, se observó la presencia de células solitarias con movimientos vibratorios, fusión de éstas, así como, células de mayor tamaño a las vegetativas (Fig. 4), estas células de mayor tamaño una vez en el fondo perdieron su coloración y al poco tiempo murieron. No se observó ningún tipo de quistes.

2. Toxicidad

En las cepas Gc 1 (Fig. 5 y 6) y Gc 2 (Fig. 9 y 10), no variaron los perfiles toxicológicos para las GTXs y sus derivados en la primera y segunda fase de crecimiento. Las toxinas presentes fueron GTXs 1, 2, 3 y 4 y dGTXs 2 y 3 y dGTX. Sin embargo, el porcentaje de toxinas GTXs 2, 3 y 4 fue mayor en la primera fase de crecimiento en la cepa Gc 1 y las toxinas GTX 1, dGTX 2 y dGTX en la segunda fase de crecimiento (Fig. 13). En la cepa Gc 2 los porcentajes de las toxinas GTXs 1 y 3, dGTX 2 y dGTX fueron mayores en la primera fase de crecimiento y GTXs 2 y 4 en la segunda fase de crecimiento, siendo GTX 2 la toxina que aportó más del 70 % y dGTX 3 la que se encontró en menor cantidad en ambas cepas (0.13%). Además, en ambas cepas solo se encontraron toxinas del grupo de las dGTX (Fig. 7, 8, 11 y 12) con un porcentaje mayor de éstas en la primera fase de crecimiento para la cepa Gc 1 y en la segunda fase de crecimiento para la cepa Gc 2 (Fig. 13). Por otro lado, se encontraron en cantidades muy pequeñas las toxinas C1 y C2 en ambas cepas (Fig. 5, 6, 9 y 10).

RETOS Y ACCIONES A SEGUIR:

Se continuará trabajando con *G. catenatum*, con el fin de estudiar su crecimiento y la producción de toxinas paralizantes bajo diferentes rangos de temperatura, salinidad y fotoperiodo, es decir, simulando diferentes escenarios del cambio climático para observar su comportamiento y comprender mejor su dinámica para determinar si las variaciones en los parámetros mencionados podrían afectar a esta especie y poder implementar planes de manejo para mitigar sus efectos en la zonas costeras.

Información de Contacto

Correo electrónico: artaviak@gmail.com

RECURSOS Y REFERENCIAS:

Franco, J. & Fernández-Vila, P. (1993). Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Chromatographia* 35, 613-620.

Guillard, R.R.L. & Hargraves P.E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234-236.

Lagos, N. (2002). Principales toxinas de origen fitoplanctónico: Identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En: Sar E.A., Ferrario M.E. & Reguera B. (Eds), *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano* (pp. 57-76). Madrid: Instituto Español de Oceanografía.

Mata L., Abarca G., Marranghelo L. & Viquez R. (1990). Intoxicación paralítica por mariscos (IPM) por *Spondylus califer* contaminado con *Pyrodinium bahamense*, Costa Rica, 1989-1990. *Rev. Biol. Trop.* 38, 129-136.

Reguera, B. (2002). Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. En: Sar E.A., Ferrario M.E. & Reguera B. (Eds), *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano* (pp. 21-53). Madrid: Instituto Español de Oceanografía.

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoplancton Marino, Estación de Biología Marina Juan Bertoglio Richards, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica y en el Centro Oceanográfico, Instituto Español de Oceanografía, Vigo, España. Los autores agradecen a la Escuela de Ciencias Biológicas, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, la Federación de Estudiantes (FEUNA) y al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICT) por el aporte económico para culminar con éxito este trabajo.