

## Proliferaciones algales de la diatomea toxigénica *Pseudo-Nitzschia* (Bacillariophyceae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica

Maribelle Vargas-Montero<sup>1</sup> & Enrique Freer<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas, Universidad de Costa Rica, Apdo. Postal 2060, San José, Costa Rica.

<sup>2</sup> Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica, Apdo. Postal 2060, San José, Costa Rica. Fax: (506) 207-3182; vmontero@cariari.ucr.ac.cr

Recibido 31-X-2002. Corregido 14-X-2003. Aceptado 11-XII-2003.

**Abstract:** Water samples were collected during a red tide event in November 2001, near San Lucas Island (Gulf of Nicoya, Costa Rica). Superficial temperature was 27°C and water was turbid, with no fetid smell. One sample was treated with negative staining and observed using a transmission electron microscope (TEM); another sample was observed using a scanning electron microscope (SEM). Samples had high concentrations of the diatom *Pseudo-Nitzschia pungens f. pungens* (characterized by two rows of poroids in the external channel), and lower concentrations of *Skeletonema costatum* (chains joined by external microtubules) and *Chaetoceros lorenzianus* (oval apertures and long chains, having setae with distinctive transverse rows and spines). This is the first time that the first species was described producing red tides in Costa Rica. However, reports about red tides with high concentration of species like *P. pungens* (variety *multiseriis*) are increasing. These species have been related to the production of domoic acid, a low molecular weight amino acid which in humans can cause amnesic intoxications with seafood. Previously, Costa Rican reports of toxic accidents only referred to seafood contaminated with *Pyrodinium bahamense var. compressum* and *Gymnodinium catenatum* dinoflagellates. The increase in the number of *Pseudo-Nitzschia* causing harmful algae blooms is of interest for scientists around the world and must be documented. Similarly, some *Chaetoceros* species have been reported to be harmful to fish. We strongly recommend the establishment of a permanent surveillance program monitoring the presence of these species new at Costa Rican Pacific coast. Since the amnesic toxin is soluble in water and heat-resistant, we want to stress the possibility of having human cases of amnesic intoxication.

**Key words:** Bacillariophyceae, *Pseudo-Nitzschia*, harmful algae blooms, Gulf of Nicoya.

**Palabras clave:** Bacillariophyceae, *Pseudo-Nitzschia*, proliferaciones algales nocivas, Golfo de Nicoya.

El primer caso de intoxicación amnésica por mariscos (IAM) fue observado en la Isla Príncipe Eduardo (Canadá) en 1987 (Yasumoto *et al.* 1996) donde resultaron más de 100 personas enfermas y muchas murieron por la ingestión de moluscos bivalvos contaminados.

Las diatomeas *Nitzschia pseudodelicatissima* Hasle, *Pseudo-Nitzschia pungens f. multiseriis*, y *P. australis*, han sido asociadas con pérdidas económicas en el Golfo de California, a pesar de que esta toxina (ácido domóico) no ha sido detectada en las especies de mariscos en ese lugar (Ochoa *et al.* 1998). Sin embargo, en varios lugares alrededor del mundo, entre ellos,

Galicia (España), Japón, Nueva Zelanda, Hong Kong, Canadá y Dinamarca, se ha detectado la presencia de ácido domóico producido por *Pseudo-Nitzschia* spp. (Yasumoto *et al.* 1996).

En noviembre de 1994 en el Canal de Hood en California, se encontraron altos niveles de ácido domóico en muestras de moluscos (Horner *et al.* en Yasumoto *et al.* 1996). Asimismo, estos autores documentaron que una proliferación causada por *Pseudo-Nitzschia* spp. ocurrió de nuevo entre marzo y abril del año siguiente, pero no fue hasta que se implementó un programa de monitoreo cuando se encontró ácido domóico en los moluscos.

Este fenómeno ha despertado el interés de muchos investigadores debido al impacto negativo que causa en la economía de los países productores de moluscos (Glibert y Pitcher 2001).

Es conocido que esta toxina puede afectar a moluscos bivalvos como los mejillones, a los camarones y a las sardinas, que son organismos filtradores y se alimentan del fitoplancton (Yasumoto *et al.* 1996). El ácido domóico es una toxina amnésica que pertenece al grupo de los aminoácidos cuyos compuestos están clasificados como neuroexcitadores que interfieren en los mecanismos de neurotransmisión en el cerebro (Wright y Quilliam en Hallegraeff *et al.* 1995). Tienen una estructura similar al glutamato, compitiendo con éste y permitiendo la entrada de cloruros, calcio y agua a la célula, lo que induce la ruptura y muerte de neuronas en el hipocampo, en los sitios de aprendizaje y memoria, produciendo la pérdida de la memoria (OPS 1997). Estas toxinas son hidrosolubles y termoestables por lo que la cocción de los alimentos no las destruyen. El cuadro clínico producido por la intoxicación amnésica por mariscos es una gastroenteritis seguida por un cuadro neurotóxico. En una intoxicación leve, después de los primeros 15 min a 38 h de la ingestión del vector, se presentan cuadros de gastroenteritis, náuseas, vómito, cefalea intensa, dolor y cólico abdominal y diarrea acuosa; en una intoxicación severa se producen síntomas como confusión, mutismo, pérdida de la concentración y pérdida de la memoria reciente. Después de los síntomas anteriores el paciente presenta convulsiones, estado de coma y muerte. Si el paciente sobrevive los cuadros neurológicos cognitivos pueden persistir durante años.

Durante mucho tiempo se creía que las fitocoxinas eran solo producidas por dinoflagelados, sin embargo después del incidente en la Isla Príncipe Eduardo en Canadá durante 1987, se detectó a la diatomea *Pseudo-Nitzschia pungens* como la fuente de este tipo de toxinas.

Se han reportado muertes de pelícanos por la ingesta de anchovetas y cangrejos que contenían en sus vísceras altas concentraciones de ácido domóico (Hallegraeff *et al.* 1995). Las proliferaciones algales nocivas o mareas rojas

en el Golfo de Nicoya son un fenómeno bastante común, pero no fue hasta 1981 que Hargraves y Víquez lo reportaron como tal, siendo en este momento el dinoflagelado *Cochlodinium catenatum* la primer microalga involucrada en estos fenómenos.

En 1990 Mata *et al.* informaron sobre el primer caso conocido por intoxicación parálitica por mariscos (IPM) que afectó en 1989 a un grupo de personas en la costa Pacífica de Costa Rica, siendo el principal transvector el ostión vaca (*Spondylus calcifer*).

Eventualmente se han producido este tipo de fenómenos a lo largo de la costa Pacífica de Costa Rica, dominados algunas veces por dinoflagelados, en alguno de estos casos dominados por especies tóxicas, o por diatomeas. En la actualidad las especies que más frecuentemente producen mareas rojas en el Golfo de Nicoya son *C. catenatum* (Hargraves y Víquez 1981, Víquez y Hargraves 1995), *Alexandrium monilatum* (Víquez y Hargraves 1995) y *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

A principios del mes de noviembre de 2001 se recolectó una muestra de fitoplancton de una proliferación algal, cerca de la Isla San Lucas, ubicada en el Golfo de Nicoya. La muestra se fijó con glutaraldehído al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M, pH 7.4. Para su observación con el microscopio electrónico de transmisión (MET) la muestra se lavó varias veces con amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M y se colocaron gotas de la misma sobre rejillas de 1 mesh previamente cubiertas con membrana de Formvar®.

Las rejillas se observaron con un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-7000) operando a un voltaje de aceleración de 100 kv. Para la observación con el microscopio electrónico de barrido (MEB) se colocó una gota de la muestra sobre una membrana previamente recubierta con poli-L-lisina y se dejó secar al aire. Una vez seca la muestra se recubrió con 30 nm de grosor de platino en un

cobertor iónico marca Hitachi IB-5. Finalmente se observó con un microscopio electrónico de rastreo (Hitachi, S-2360N) a un voltaje de aceleración de 15 kv.

## RESULTADOS

La muestra analizada fue dominada por diatomeas. La que presentó mayor concentración (con una densidad aproximadamente de  $10^2$  células/ml) fue *P. pungens f. pungens* (Fig. 1A y B), y en menor concentración las diatomeas *Skeletonema costatum* (Fig. 1C), *Chaetoceros lorenzianus* (Fig. 1D) y diatomeas del género *Coscinodiscus* spp.

Mediante la observación de *P. pungens* con el MET, se localizó el sistema de rafe característico y una serie de poroides distribuidos en la pared del canal externo. Algunas de las especies tienen estrías con filas de 2 o más poroides como se observa en la Fig. 1A y B. Estas diatomeas tienen forma fusiforme y las bandas intercalares están abiertas, distintivamente punteadas, son angostas y en su mayor parte estriadas. Las células de *S. costatum* se observaron formando cadenas unidas por tubos externos o procesos acomodados en un anillo marginal (Fig. 1C). *C. lorenzianus* se caracteriza por formarse en cadenas derechas y firmes, la apertura o forámen generalmente es entre elíptico y oval. Las setas tienen poros y pequeñas espinas (Fig. 1D).

## DISCUSIÓN

Las diatomeas del género *Nitzschia* o *Pseudo-Nitzschia*, pertenecen a la clase Bacillariophyceae y han sido descritas produciendo proliferaciones tóxicas en las costas de estado de Washington (Trainer *et al.* 1998), Argentina (Negri e Inza 1998) y en otras partes del mundo (Hallegraeff *et al.* 2000).

Algunas de estas diatomeas tienen forma fusiforme, angostas, y las bandas intercalares están abiertas, mostrando sus distintivos poros (Tomas 1997).

El aumento en el número de especies de *Pseudo-Nitzschia* capaces de producir proliferaciones algales, es un tema de mucho interés para los investigadores en el ámbito mundial. En este caso, la concentración de estas microalgas es significativa ( $10^2$  cel/ml), por lo que debe ponerse mucha atención a estos fenómenos, siendo esta la primera vez que se describe esta especie tóxica produciendo eventos de proliferaciones algales nocivas en el Golfo de Nicoya.

Estos episodios naturales y su impacto en la salud pública y en el sector pesquero, se controlan hoy día en los países desarrollados mediante el establecimiento de programas de seguimiento (monitoreos) de la calidad del medio y de los productos marinos dedicados al consumo humano (Hallegraeff *et al.* 1995).

Por lo tanto, es importante mantener un sistema de vigilancia constante en las zonas de mayor extracción de bivalvos, para prevenir la aparición del fenómeno y alertar a las autoridades de salud.

Es importante destacar que para identificar este tipo de diatomeas es necesario el uso del microscopio electrónico de transmisión, dado a que su pequeño tamaño y su ultraestructura caracterizada por poroides de aproximadamente  $0.5 \mu\text{m}$  de grosor, no pueden resolverse utilizando un microscopio de luz convencional.

A pesar de que tenemos conocimiento de proliferaciones algales producidas en el Golfo de Nicoya, este es el primer reporte de PAN dominadas por diatomeas que se conoce para el área, por lo que destacamos la importancia del mismo para colaborar con investigaciones posteriores.

A pesar de ser comunes en Costa Rica, en los últimos años se han presentado serios problemas por la permanencia y toxicidad producida a causa de los fenómenos PAN. En Costa Rica se desconoce si ha existido algún efecto dañino por parte de las proliferaciones producidas por diatomeas, por lo que es importante analizar la presencia de algunas diatomeas que podrían ser dañinas tanto para la salud pública como para la fauna existente en nuestras costas. Algunas especies de *Chaetoceros* están documentadas como responsables de la muerte

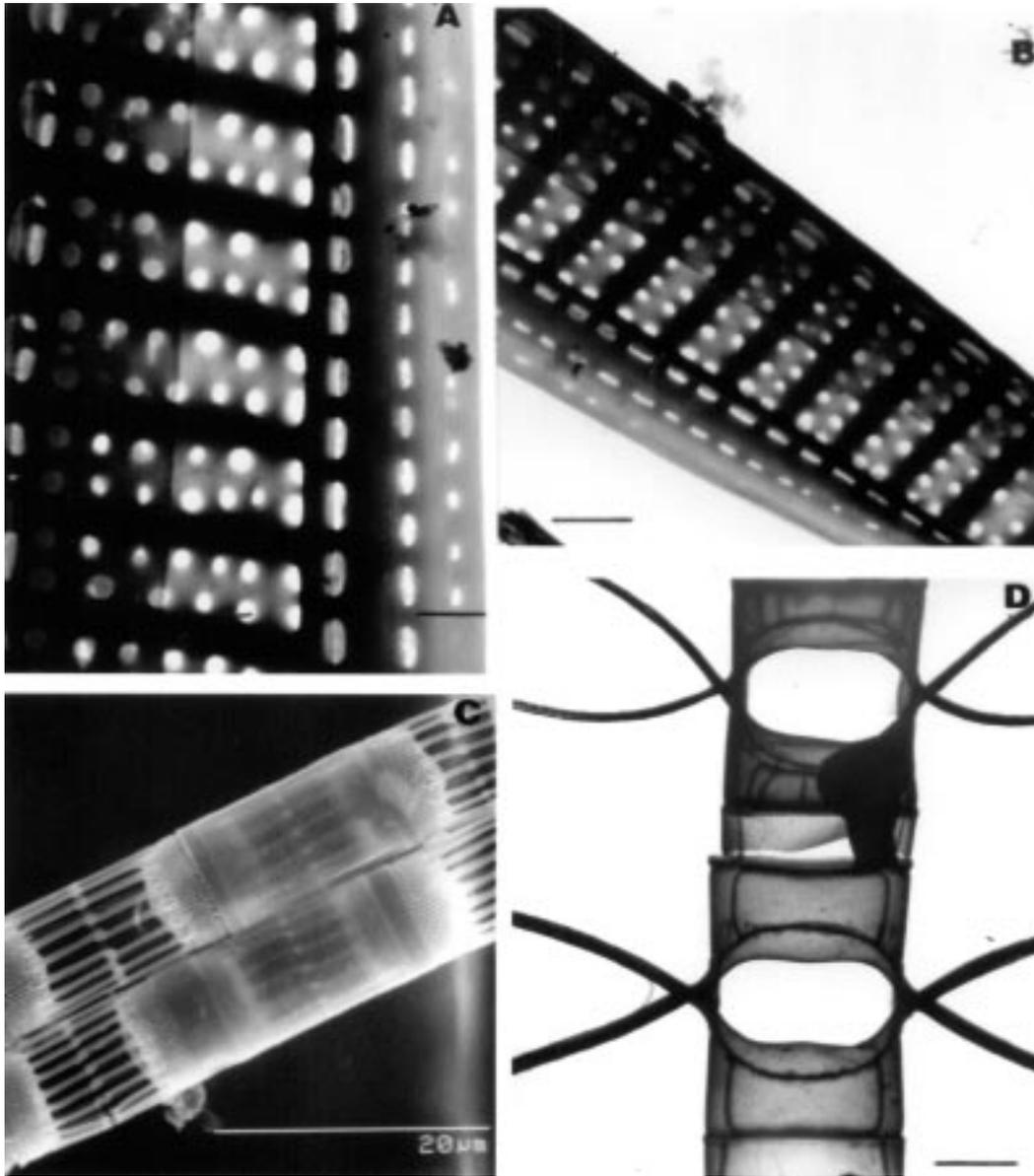


Fig. 1. Detalles de las valvas de las diatomeas. **A.** *Pseudo-Nitzschia pungens f. pungens* con dos membranas de poroides (MET). Barra 0.7  $\mu\text{m}$ . **B.** Idem. (MET) Barra 1  $\mu\text{m}$ . **C.** *Skeletonema costatum*, 2 cadenas cilíndricas (MEB). Barra 1  $\mu\text{m}$ . **D.** *Chaetoceros lorenzianus*. Barra 7  $\mu\text{m}$ .

Fig. 1. Details from the valves of diatoms. **A.** *Pseudo-Nitzschia pungens f. pungens* with two membranes of poroids (SEM). Scale bar 0.7  $\mu\text{m}$ . **B.** Idem. (SEM) Scale bar 1  $\mu\text{m}$ . **C.** *Skeletonema costatum*, 2 cylindrical chains (SEM). Scale bar 1  $\mu\text{m}$ . **D.** *Chaetoceros lorenzianus*. Scale bar 7  $\mu\text{m}$ .

de peces debido a la sofocación que producen sus largas setas sílicas en sus branquias (Clement y Lembeye en Smayda y Shimizu 1991). Se debe crear conciencia del problema que representan las mareas rojas, pues el impacto más obvio son los internamientos debidos a las neurointoxicaciones, que afortunadamente son pocos en Costa Rica, gracias a las campañas de prevención y a los períodos de veda decretados, que prohíben la extracción de mariscos bivalvos mientras perdure el fenómeno. Sin embargo, el mayor impacto se relaciona con el detrimento económico, que incide principalmente en las familias de pescadores artesanales, cuyo sustento depende de la comercialización de moluscos bivalvos. Ante este problema, el gobierno ha tenido que hacer derogaciones importantes para subvencionar a esas familias; no obstante, otras personas que indirectamente también dependen de la comercialización de moluscos, como empresarios, dueños de restaurantes, y el turismo en general, también son afectados, aunque ese impacto no se ha cuantificado en Costa Rica.

Actualmente la distribución de especies de *Pseudo-Nitzschia* en el Golfo de Nicoya se desconoce, por lo que se sugiere desarrollar un programa de monitoreo para determinar la distribución de las mismas.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Juan Torres y su familia, por su valiosa colaboración para la recolecta de la muestra de marea roja.

#### RESUMEN

En el mes de noviembre de 2001, se aisló de una marea roja cerca de la Isla San Lucas, las diatomeas *Pseudo-Nitzschia pungens f. pungens* seguida por *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros lorenzianus* y en menor concentración *Thalassiosira* spp. las cuales fueron caracterizadas por microscopía electrónica de rastreo y transmisión, siendo esta la primera vez que se describe la presencia de estas especies produciendo proliferaciones en Costa Rica. Actualmente existe un aumento en el reporte de mareas rojas donde predominan las diatomeas, y los conteos celulares

indican el aumento en el número de las especies conocidas como *Pseudo-nitzschia pungens f. multiseriis*. A estas se les atribuye la producción del ácido domóico, un aminoácido de bajo peso molecular. Las intoxicaciones amnésicas por mariscos (IAM) que afectan a los humanos, se producen por la ingesta de mariscos contaminados con este ácido. En Costa Rica, hasta la fecha, solo se han reportado casos de intoxicación parálitica por mariscos contaminados por los dinoflagelados *Pyrodinium bahamense var. compressum* y *Gymnodinium catenatum*, sin embargo existe la posibilidad de producirse intoxicaciones humanas por la ingesta de mariscos y peces contaminados con toxinas amnésicas las cuales son hidrosolubles y termoestables. Debe entonces considerarse el peligro potencial de aparición de casos de intoxicaciones amnésicas y se sugiere la inclusión de estas especies en los programas de monitoreo permanente para tomar las medidas preventivas de salud pública.

#### REFERENCIAS

- Glibert, P.M. & G. Pitcher. 2001. Global Ecology and Oceanography of harmful algal blooms. Science Plan. An International Programme sponsored by the Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR) and the Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO). 86 p.
- Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella. 1995. Manual of Harmful Marine Microalgae. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO). 551 p.
- Hallegraeff, G.M., S. Blackburn, C. Bolch & R. Lewis. 2001. Harmful Algal Blooms 2000. Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algae Blooms, Hobart, Australia, 7-11 February 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO). 518 p.
- Hargraves, P. & R. Viquez. 1981. The dinoflagellate red tide in Golfo de Nicoya, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 29: 31-38.
- Horner, R., L. Hanson, C. Hatfield & J. Newton. Domoic Acid in Hood Canal, Washington, USA. In T. Yasumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo. 1996. Harmful and Toxic Algal Blooms. Proceedings of the Seventh International Conference on Toxic Phytoplankton Sendai, Japan, 12-16 July 1995, UNESCO.
- Mata L., G. Abarca, L. Marranghello & R. Viquez. 1990. Intoxicación parálitica por mariscos (IPM) por *Spondylus calcifer* contaminado con *Pyrodinium bahamense*, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 38: 129-136.
- Negri, R. & D. Inza. 1998. Some potentially toxic species of *Pseudo-Nitzschia* in the Argentine sea (35°-39° S).

- Harmful Algae, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1998. pp. 84-85.
- Ochoa, J.I., A.P. Sierra-Beltran, G. Olaiz-Fernández & L.M. Del Villar-Ponce. 1998. Should mollusk toxicity in Mexico be considered a public health issue? *J. Shellf. Res.* 17(5): 1671-1673.
- OPS 1997. Manual para el Control de las Enfermedades Transmisibles. Organización Panamericana de la Salud.
- Smayda, T.J. & Y. Shimizu. 1991. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Newport, Rhode Island.
- Tomas, C.R. (ed.). 1997. Identifying marine phytoplankton. Academic, New York. 858 p.
- Trainer, V., J. Wekell, R. Horner, C. Hatfield & J. Stein. 1998. Domoic acid production by *Pseudo-Nitzschia pungens*, pp. 337-339. In B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt. 1997 Harmful Algae, VIII International Conference, Vigo 1997. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Viquez, R. & P. Hargraves. 1995. Annual cycle of potentially harmful dinoflagellates in the Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Bull. Mar. Sci.* 57(2): 467-475.
- Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo. 1996. Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO. Proceedings of the Seventh International Conference on Toxic Phytoplankton. 586 p.