

Dinoflagelados tóxicos marinos: Aspectos ecológicos, sanitarios y filogenéticos

Irma Marín Universidad Autónoma de Madrid

Beatriz Reguera Instituto Español de Oceanografía (Vigo)

El término *Harmful Algal Blooms* (HAB) ó Floraciones Algales Nocivas (FANs en lo sucesivo) fue acuñado por la UNESCO en la década de los 90 para denominar cualquier proliferación de microalgas, independientemente de su concentración, que fuera percibida como un daño por el hombre. Se trata, pues, de un término socio-económico que abarca eventos causados por un amplio espectro de grupos microalgales. Con la excepción de las floraciones de cianobacterias, principales causantes de contaminación por ficotoxinas en los suministros de agua potable, el resto de las FANs están constituidas por proliferaciones de microalgas—eucariotas unicelulares—que forman parte de comunidades microbianas marinas planctónicas y bentónicas.

Hasta la fecha se han identificado al menos 100 especies de microalgas marinas productoras de distintas clases de toxinas que causan mortandades de organismos marinos, irritaciones respiratorias y cutáneas, o que se transfieren a través de la cadena trófica hasta el hombre, constituyendo un riesgo para la salud pública. La “Lista de Especies Tóxicas” (<http://www.marinespecies.org/hab/index.php>) incluye 13 especies de diatomeas, 9 haptofitas, 7 rafidofíceas, 2 dictyocofíceas, y 73 dinoflagelados. Esta gran diversidad de especies va asociada a una diversidad de las condiciones ambientales—específicas de especie (o incluso de cepa)—que promueven su crecimiento óptimo (nicho ecológico), por lo que se debe evitar caer en generalizaciones simplistas tales como “*hay un incremento global en la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de floraciones algales nocivas*”.

Entre las FANs productoras de toxinas que se transfieren a través de la cadena trófica, las de especies productoras de toxinas amnésicas (diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*), neurotoxinas paralizantes (dinoflagelados *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* y distintas especies del género *Alexandrium*), y sobretodo las productoras de toxinas diarreicas (dinoflagelados del género *Dinophysis*), constituyen el principal riesgo natural para la explotación de bivalvos en la Unión Europea, cuyas directivas exigen a los países-miembro el establecimiento de costosos programas de seguimiento (*monitoring*) de la presencia de especies potencialmente tóxicas y sus toxinas en las zonas de cultivo. Cada vez que la concentración de toxinas en los bivalvos explotados comercialmente alcanza niveles superiores a los de regulación—establecidos en las directivas europeas—las autoridades sanitario-pesqueras imponen vedas o cierres de extracción del producto que implican cuantiosas pérdidas económicas para el sector marisquero/acuicultor. El objetivo último de los investigadores es alcanzar el desarrollo de modelos acoplados físico-biológicos que permitan aplicar los avances de la oceanografía operacional a la aparición de los eventos tóxicos. Dicho de forma más sencilla: desarrollar sistemas de alerta temprana que avisen a los usuarios finales sobre el inicio, desarrollo y mantenimiento de las floraciones de microalgas nocivas como si de un servicio meteorológico se tratara. Esto requiere un conocimiento sólido de la biología—taxonomía, ciclo de vida, variabilidad morfológica y genética, dinámica de poblaciones—y de las interacciones físico-biológicas de las especies diana con la hidrodinámica local.

El grupo de *Fitoplancton Tóxico* del Instituto Español de Oceanografía (IEO) en Vigo—cuyos orígenes se remontan al año 1977, tras el primer caso de intoxicación paralizante por bivalvos gallegos—ha llevado a cabo proyectos de investigación y control de fitoplancton potencialmente tóxico en las costas gallegas entre 1977 y 1991. En este período se consiguieron importantes avances en la identificación taxonómica y toxinológica de las especies problema, así como de las condiciones ambientales asociadas a su proliferación. A partir de 1992, el control en aguas costeras pasó a ser competencia del gobierno de la Xunta de Galicia, y desde entonces el grupo dedica todos sus esfuerzos al desarrollo de proyectos centrados en la biología, fisiología y dinámica de poblaciones de especies de interés, financiados por diversos programas del plan nacional y de la Unión Europea.

Desde la identificación en 1980 del dinoflagelado *Dinophysis fortii* como el responsable de las intoxicaciones diarreogénicas por bivalvo en el noreste de Japón, las especies *Dinophysis* se convirtieron en diana para los programas de seguimiento de fitoplancton potencialmente tóxicas. Desde el punto de vista científico, *Dinophysis* planteaba considerables retos a los investigadores. El género incluye especies heterótrofas y especies fotótrofas en las que destaca su contenido en ficoeritrinas—pigmentos dominantes en cianobacterias, criptofíceas y en el ciliado *Myrionecta rubra* (antes *Mesodinium rubrum*)—. No

obstante, durante muchos años los esfuerzos por establecer cultivos de especies pigmentadas de *Dinophysis* resultaron infructuosos lo que llevó a sospechar que se trataba de especies mixótrofas, es decir, organismo capaces de obtener energía metabólica tanto a partir de la fotosíntesis (fototrofia), como de la digestión de otros organismos (heterotrofia). Para el personal especializado en observar poblaciones de *Dinophysis* “*in vivo*”, una de las complicaciones a las que se enfrentan es la gran variabilidad en la morfología de su contorno celular (tamaño y forma de las grandes placas que forman su hipoteca) y de su contenido. A lo largo de su temporada de crecimiento (que puede durar 6-7 meses en el caso de algunas especies costeras, tales como *D. acuminata* y *D. acuta*), las células pueden aparecer delgadas y con escaso contenido citoplasmático, o hinchadas, rojizas y repletas de vacuolas digestivas. La distribución de tallas de la población puede ser bimodal (células pequeñas y células grandes), unimodal (sólo células vegetativas “normales”) o un continuo de formas. Además, las poblaciones de *Dinophysis* pueden estar presentes todo el año en las zonas de cultivos marinos—pero en concentraciones ínfimas (< 20 cel/L) que escapan al nivel de detección de los controles rutinarios—y sólo en cortos períodos de tiempo, íntimamente relacionados con la hidrodinámica local, alcanzan concentraciones superiores a las 10³ cel/L. A pesar de su escasez, se ha observado que unos pocos cientos de células por litro son suficientes para convertir a los bivalvos en no aptos para el consumo. Por todo ello, podemos definir las floraciones de *Dinophysis* como FANs de baja biomasa que, sin formar “mareas rojas” (tipo especial de FAN donde la excesiva proliferación de organismos pigmentados producen una coloración en el agua), transmiten toxinas a través de la cadena trófica.

La biología molecular se ha revelado como una poderosa herramienta en los estudios de filogenia, taxonomía molecular y biodiversidad del fitoplancton y ha permitido abrir nuevos caminos en situaciones donde las herramientas tradicionales de microscopía óptica y fisiología celular resultaban claramente insuficientes. En los últimos 10 años, varios expertos del grupo de Fitoplancton Tóxico del IEO-Vigo—en la actualidad, *Unidad Asociada CSIC-IEO de Fitoplancton Tóxico*—concentraron sus esfuerzos en distintos aspectos de la biología, dinámica de poblaciones y toxicología de las principales especies de *Dinophysis* productoras de toxinas diarreicas en el noroeste Ibérico. El acercamiento entre el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y el IEO-Vigo a finales de los 90, permitió acometer retos pendientes combinando las valiosas herramientas moleculares desarrolladas en la UAM y los años de experiencia sobre estudios de campo del IEO-Vigo. Así comenzó una fructífera colaboración, amistosa primero y formalizada después durante el desarrollo de 3 proyectos de investigación (dos de ellos coordinados) del plan nacional de I+D: *DINOPHYSIS 2000* (1999-2002); *PHYCODISIS* (2003-2006) y el actual proyecto en curso *DIGEDINO* (2009-2012). Fue necesario desarrollar estrategias de muestreo apropiadas para poder concentrar las escasas células de campo de *Dinophysis* spp. y aislarlas por micromanipulación. Las incubaciones de ejemplares aislados suplieron la falta de cultivos de laboratorio y combinadas con observaciones de campo permitieron dilucidar el ciclo de vida de estas especies (¡consideradas hasta entonces carentes de procesos sexuales!) (Reguera & Gonzalez-Gil 2001; Escalera & Reguera 2008). Las técnicas moleculares aplicadas por la UAM, sobre una o pocas células, permitieron obtener los primeros resultados sobre secuencias del DNA ribosomal de distintas especies de *Dinophysis* de las costas gallegas (Marín et al. 2001a, b) al igual que los avances de la cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas permitieron determinar sus perfiles de toxinas (Pizarro et al. 2008). Estos estudios revelaron que las secuencias del rDNA no eran las más adecuadas para poder separar molecularmente las distintas especies de *Dinophysis* y que sería necesario explorar nuevas regiones del genoma. La secuencia del DNA mitocondrial (gen *cox1*) se reveló como una herramienta apropiada para separar *Dinophysis acuminata* (principal productor de toxinas diarreicas en Galicia) de una especie muy próxima, *Dinophysis ovum*, responsable de eventos tóxicos en la costa suratlántica de Iberia, Golfo de México y Mar Egeo (Raho et al. 2008).

En 2006, un grupo de investigadores coreanos consiguió establecer cultivos mixótrofos de *Dinophysis acuminata* alimentados con el ciliado *Myrionecta rubra*, que a su vez era cultivado con adiciones de criptofíceas del género *Teleaulax*. Los *Dinophysis* cultivados han sido identificados como predadores secundarios y como mixótrofos obligados requiriendo luz y nutrientes para fotosintetizar, así como presa viva que fagocitan por mizocitosis. Estos resultados constituyeron un importante hito en los estudios de comportamiento nutricional de *Dinophysis* que obligó a replantearse muchas interpretaciones previas de los resultados de campo. Además, las técnicas de última generación de microscopía electrónica de transmisión, aplicadas a células individuales, han mostrado que en ocasiones es necesario recurrir a los estudios de ultraestructura para dilucidar si los orgánulos celulares observados corresponden a vacuolas digestivas (presa identificada por pigmentos y biología molecular) o a endosimbiosis en curso (Escalera et

al. en prensa). A partir de 2006, se han ido estableciendo cultivos de nuevas especies de *Dinophysis* en nuestro país, tales como *D. acuta* en Huelva (Jaén et al. 2009) y *D. tripos* en Galicia (Rodríguez et al. 2010) y se ha allanado el camino para testar nuevas hipótesis sobre el comportamiento nutricional de *Dinophysis*, su ciclo de vida y producción de toxinas, y la posible existencia de una población de microorganismos acompañantes a las proliferaciones de *Dinophysis* (Raho et al. 2010a, b. Enviados). La utilización de cultivos de laboratorio de *D. acuta* está permitiendo estudiar el controvertido origen de los cloroplastos. Mediante métodos de biología molecular se ha determinado el origen de los cloroplastos presentes en células de *Dinophysis* alimentadas con distintos ciliados los cuales a su vez fueron alimentados con distintas criptofitas. Los resultados apoyan la hipótesis de un origen ancestral de los mismos (Raho et al. 2010a y b).

En la actualidad, además de seguir con los estudios que se han explicitado anteriormente estamos investigando la biodiversidad de protistas presentes en medios ambientes extremos, tanto ácidos como hipersalinos y aislando y caracterizando molecularmente algunas especies nuevas. Así mismo estudiamos la posible relación entre dinoflagelados y otros microorganismos que los acompañan en el crecimiento, producción de toxinas, etc. Y finalmente, estamos desarrollando nuevas herramientas moleculares para la identificación específica de dinoflagelados que son difícilmente identificables por los métodos conocidos.

Algunas publicaciones relevantes sobre *Dinophysis* de los dos grupos de investigación

Escalera, L. & Reguera, B. (2008). Planozygote division and other observations on the sexual cycle of several species of *Dinophysis* (*Dinophyceae*, *Dinophysiales*). *J. Phycol.* **44**:1425-36.

Marín, I., Aguilera, A., Reguera, B. & Abad, J.P. (2001a). A method for preparation of DNA suitable for molecular biology applications from single cell of dinoflagelates. *Biotechniques* **30**(1): 88-93.

Marín, I., Aguilera, A., González-Gil, S., Reguera, B. & Abad, J. P. (2001). Genetic analysis of three species of *Dinophysis* causing diarrhetic shellfish outbreaks in Galicia (NW Spain). In: Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. L., Bolch, C. J. & Lewis, R. J. [Eds.] Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 222-25.

Reguera, B. & González-Gil, S. (2001). Small cell and intermediate cell formation in species of *Dinophysis* (*Dinophyceae*, *Dinophysiales*). *J. Phycol.* **37**:318-33.

Reguera, B., González-Gil, S. & Delgado, M. (2007). *Dinophysis diegensis* is a life history stage of *Dinophysis caudata* (*Dinophyceae*, *Dinophysiales*). *J. Phycol.* **43**:1083-93.

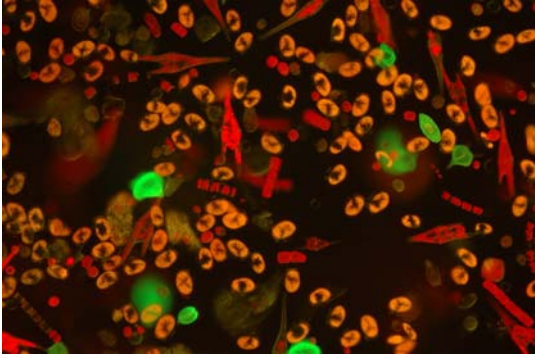
Reguera, B. & Pizarro, G. 2008. Planktonic dinoflagellates which produce polyether toxins of the old "DSP Complex". In: Botana, L. M. [Ed.] Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection. 2nd ed. CRC Press, London. 798 pp., pp. 257-84.

Pizarro-Nova G., Escalera, L., González-Gil, S., Franco, JM & Reguera, B. (2008). Growth, behaviour and cell toxin quota of *Dinophysis acuta* Ehrenberg during a daily cycle. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **353**: 89-105.

Raho, N., Pizarro, G., Escalera, L., Reguera, B. & Marín, I. (2008). Morphology, toxin composition and molecular analysis of *Dinophysis ovum* Schütt, a dinoflagellate of the "*Dinophysis acuminata* complex" *Harmful Algae* **7**(6): 839-848.

Raho, N., Jaén, D., Mamán, L., Rial, P. & Marín, I. (2010a). Molecular analysis of chloroplasts of *Dinophysis acuta* from Huelva (Spain) chloroplasts fed with different cryptophytes. Enviado *J. Phycol.*

Raho, N., Rodríguez, F., Reguera, B. & Marín, I. (2010b). Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (*Dinophyceae*) from single cell analysis of mitochondrial *cox1* gene. Enviado a *Harmful Algae*



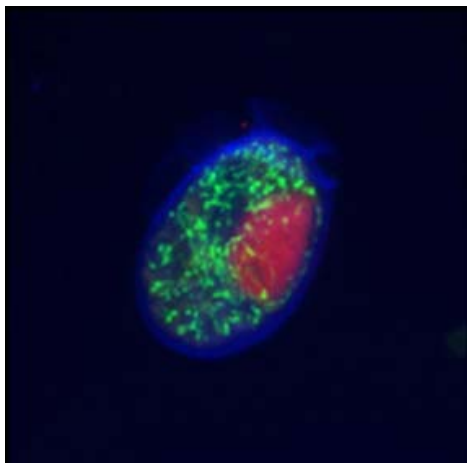
Muestra de campo viva (arrastre de red, 100 X) observada al microscopio de epifluorescencia. *Dinophysis acuminata* tienen autofluorescencia color naranja por su contenido en ficoeritrinas.



Ría de Pontevedra, Octubre de 2007.

Micrografía de campo claro (400X) de *Dinophysis caudata* aislados de la costa de Galicia.

Pictograma (CLMS) de hibridación in situ con sonda fluorescente (TSA-FISH) marcada con alexa 488 dirigida a bacterias en el interior de *Dinophysis ovum*. En verde se observa la señal de hibridación, en rojo el núcleo teñido con ioduro de propidio y en azul la teca teñida con calcoflúor





Miembros del Grupo de Fitoplancton Tóxico. De izqda. a dcha. Francisco Rodríguez (Investigador I+D), Pilar Rial (Ayudante de Investigación), Beatriz Reguera (Investigadora I+D), Laura Escalera (contrato pre-doctoral).



Grupo UAM: De izda a drcha Nicolás Raho (contrato pre-doctoral), Ana Isabel Morato (Ayudante de Investigación), Carlotta Vizioli (contrato pre-doctoral), Irma Marín (Profesora Titular de Universidad), Jose P. Abad (Profesor Titular de Universidad).