

## ESTUDIO DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE TOXINAS EN TRES ESPECIES DE *ALEXANDRIUM*: *A. CATENELLA*, *A. PERUVIANUM* Y *A. OSTENFELDII*.

Díaz del Río D, Riobó P, Franco JM, Fernández-Villamarín A, Bravo I

<sup>1</sup>Unidad Asociada Fitoplancton Tóxico (CSIC-IEO), Instituto Español de Oceanografía (IEO). Subida a Radio Faro 50, 36390 Vigo, Spain

email: isabel.bravo@vi.ieo.es

### RESUMEN

Se estudió el crecimiento y el contenido en toxinas de 3 especies de dinoflagelados: *Alexandrium catenella*, *A. peruvianum* y *A. ostenfeldii*. *A. catenella* mostró tasas de crecimiento más elevadas que las otras dos especies. Las tres especies crecieron más rápidamente a 26°C y menos a 15°C aunque las tasas de crecimiento no mostraron grandes diferencias. Se observaron diferentes ventanas óptimas de crecimiento en relación a la salinidad en las tres especies. Las máximas tasas de crecimiento fueron a 32 y 37 de salinidad para *A. catenella*, a 25 de salinidad para *A. peruvianum* y a 10 de salinidad para *A. ostenfeldii*. Las tres especies produjeron toxinas PSP pero en muy diferentes cantidades, mostrando notables diferencias en el perfil de toxinas: (10 componentes *A. catenella*: C1, C2, GTX1-6, neoSTX y STX; 3 componentes *A. ostenfeldii* y *A. peruvianum*: GTX2-3 y STX). La concentración de toxinas PSP en *A. peruvianum* fue muy baja. Se detectó también presencia de espirólidos (13-Des metil-SPX C) en *A. peruvianum* y Gymnodimina-A en *A. ostenfeldii*.

### 1. INTRODUCCIÓN

Varias especies del género *Alexandrium* son conocidas por causar Floraciones Algales Nocivas (FANs o HABs en inglés). Entre estas especies se encuentran *A. catenella* que produce toxinas paralizantes, *A. ostenfeldii* y *A. peruvianum* que se han citado de una forma variable como productores de espirólidos y/o toxinas paralizantes [1-3]. Al igual que otras especies de este género, estas tres especies muestran controversias a la hora de su definición taxonómica. En el caso de *A. catenella*, la configuración de las placas tecales usadas en su identificación no se corresponde con la diferenciación genética. Se ha demostrado usando marcadores moleculares que el morfotipo *A. catenella* engloba en realidad varias especies y que genéticamente pertenece al “complejo tamarense/catenella/fundyense” [4]. Por otro lado, se ha sugerido que *A. ostenfeldii* y *A. peruvianum*, primeramente descritas como especies diferentes por pequeñas diferencias en sus placas tecales, podrían ser la misma especie [3]. Además de las características morfológicas es importante determinar cuantas más características fenotípicas mejor. Por ello, la caracterización del crecimiento según factores ambientales y la producción de toxinas pueden ayudar a la definición de estas especies.

### 2. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo con las cepas que se indican en la Tabla 1. Los experimentos se llevaron a cabo en medio de cultivo L1 y en fotoperíodo 12:12 L:O. Se realizaron dos experimentos de crecimiento a diferentes temperaturas: 1) en cámara isotérmica a 15°C, 19°C y 26°C con irradiancia de ~100  $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en erlenmeyers con 25 mL de cultivo, midiéndose el número de células y la fluorescencia en vivo con fluorímetro cada 2-3 días; 2) en barra de gradiente térmico desde 9°C a 28°C a intervalos de 2°C, en tubos con 25 mL de cultivo midiéndose la fluorescencia en vivo cada 2-3 días. Las salinidades para este experimento se indican en la Tabla 1.

El experimento de crecimiento a distintas salinidades se realizó en las mismas condiciones que el 1<sup>er</sup> experimento mencionado anteriormente. Las salinidades fueron: 10, 18, 25, 32 y 37 y las temperaturas para este experimento se indican en la Tabla 1. Se realizaron conteos de células cada 2-3 días durante los primeros 8 días de la curva de crecimiento. Las cepas se acondicionaron a las respectivas temperaturas y salinidades durante al menos 3 generaciones. La tasa de crecimiento ( $K_e$ ) se calculó en base a las concentraciones celulares durante la fase de crecimiento exponencial, mediante la fórmula:

$$K_e = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{T}$$

(N2=concentración de células final, N1= concentración de células inicial, T=días).

**Table 1.** Código de las cepas y procedencia geográfica

| Especie               | Cepa    | Procedencia  | T <sup>a</sup> * | S** |
|-----------------------|---------|--------------|------------------|-----|
| <i>A. catenella</i>   | AC2C    | Mediterráneo | 26°C             | 32  |
| <i>A. peruvianum</i>  | VGO956  | Mediterráneo | 26°C             | 32  |
| <i>A. ostenfeldii</i> | AOTVB4A | Mar Báltico  | 19°C             | 10  |

\*T<sup>a</sup> a la que se realizó el experimento de salinidad

\*\*Salinidad a la que se realizaron los experimentos de T<sup>a</sup>

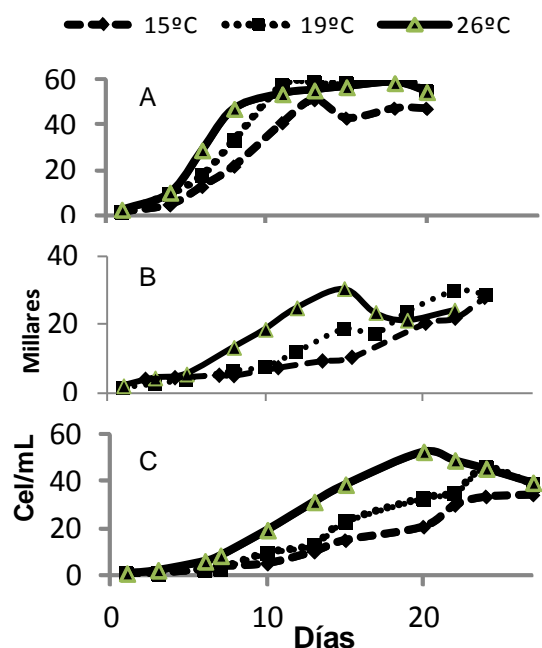
El estudio de contenido en toxinas se centró en análisis de toxinas PSP e Iminas Cíclicas (CIs): espirólidos (SPXs) y gymnodiminas (GYMs). Se realizó en las muestras provenientes de la barra de gradiente térmico y del experimento de salinidades. Cada muestra de 25 mL se repartió: 5 mL para realizar el conteo de células y 20 mL para el extracto de toxinas.

Las muestras para toxinas se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio (GF/C) y se conservaron a -20°C. Para extraer las toxinas PSP se utilizó ácido acético 0.05 M y para la extracción de CIs metanol 100%. El análisis de toxinas PSP se realizó según el método de [5] (UPLC, Waters), en el cual se lleva a cabo una derivatización mediante reacción post-columna de las toxinas para su posterior detección por fluorescencia. Se empleó una columna Zorbax Bonus RP 3.5 µm (4.6 x 150 mm) a 30°C y como fases móviles: A) Fosfato amónico 5.5 mM, 11 mM Heptansulfónico pH 7.1 y B) 88.5 % (16.5 mM fosfato amónico, 11 mM Heptansulfónico pH 7.1), 11.5 % Acetonitrilo, a un flujo de 0.8 mL/min. Las condiciones del gradiente fueron: T0:100%A; T8:100%A; T16:0%A; T25:0%A; T25.01:100%A; T30:100%A.

Para la determinación de CIs (SPXs y GYMs) se utilizó un equipo UPLC (Dionex) acoplado a un detector MS (Thermo Finnigan Orbitrap Exactive Plus). En este caso la separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Acquity BEH C18 MS 1.7µ (50 mm x 2,1 mm i.d.) a 40°C utilizando como fases móviles : A) acetato amónico 2 mM, pH 5,8 y B) MeOH, a un flujo de 300 µL/min. Las condiciones del gradiente fueron: T0:90%A; T3:50%A; T6.5:0%A; T9.5:0%A; T9.6:10%A; T12:10%A. Detección en modo positivo.

**Tabla 2.** Tasas de crecimiento Ke a diferentes T<sup>as</sup>

| Especie               | 15°C | 19°C | 26°C |
|-----------------------|------|------|------|
| <i>A. catenella</i>   | 0,34 | 0,37 | 0,40 |
| <i>A. peruvianum</i>  | 0,16 | 0,17 | 0,18 |
| <i>A. ostenfeldii</i> | 0,17 | 0,19 | 0,21 |



**Fig. 1.** Curvas de crecimiento de *Alexandrium catenella* (A), *A. peruvianum* (B) y *A. ostenfeldii* (C) a distintas temperaturas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Crecimiento en relación a la temperatura

En la Fig. 1 se muestran las curvas de crecimiento de las tres especies obtenidas a partir de las concentraciones celulares a 15°C, 19°C y 26°C. Las tasas máximas de crecimiento se obtuvieron a 26°C y las mínimas a 15°C en las tres especies (Tabla 2), aunque las diferencias fueron pequeñas principalmente en *A. peruvianum*.

Los datos de fluorescencia por célula mostraron que este parámetro no es constante a lo largo de la curva de crecimiento por lo que los datos de crecimiento en la barra de gradiente no valen para calcular tasas de crecimiento en términos de número de células. Las fluorescencias y las concentraciones celulares mostraron que para *Alexandrium catenella* la fluorescencia/célula aumentaba en el cultivo en la fase estacionaria. Sin embargo en *A. peruvianum* y *A. ostenfeldii* se observó una fluorescencia/célula mayor en la fase inicial del cultivo.

Los datos de crecimiento en la barra de gradiente térmico mostraron los siguientes resultados: 1) *A. catenella* no mostró diferencias significativas entre 13°C y 24°C. El crecimiento decayó por debajo de 13°C y por encima de 25°C. Como ya mencionamos, estos datos no se corresponden con los obtenidos en el experimento anterior

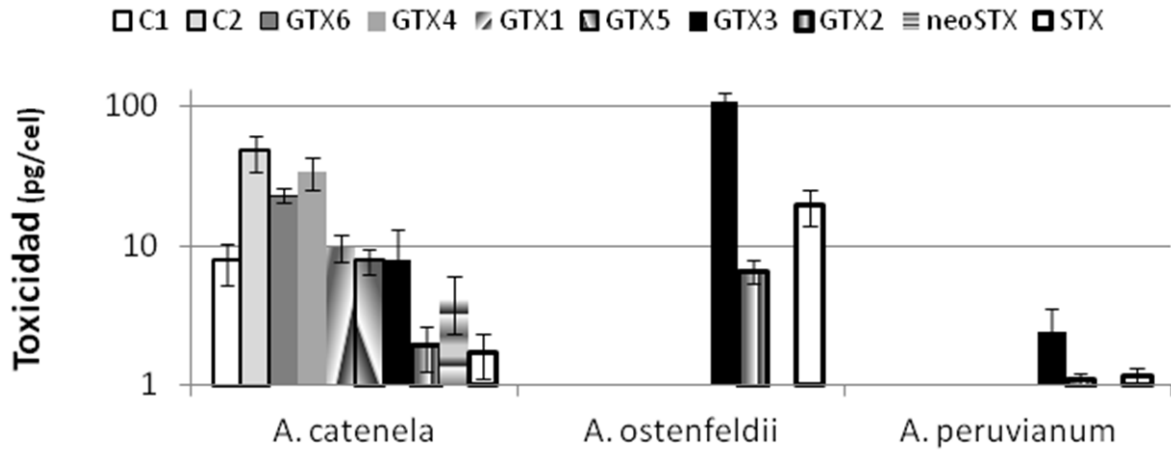


Fig. 2. Perfil de toxinas para cada especie (A. cat=A. catenella, A. ost=A. ostenfeldii, A. per=A. peruvianum).

debido a que la fluorescencia/célula no es constante a lo largo de la curva de crecimiento. 2) Para *A. peruvianum*, el crecimiento fue máximo a 17°C-22°C y decreció drásticamente por debajo de 13°C y por encima de 26°C. Estos datos tampoco se corresponden con los obtenidos en el 1<sup>er</sup> experimento debido probablemente a la misma razón mencionada para la especie anterior. 3) *A. ostenfeldii* mostró un crecimiento máximo entre 20°C-24°C. La tasa de crecimiento disminuyó significativamente por debajo de 15°C y por encima de 26°C.

### 3.2. Crecimiento en relación a la salinidad

En la tabla 3 se muestran las tasas de crecimiento a las diferentes salinidades estudiadas. Las tres especies mostraron resultados diferentes. *A. catenella* fue la especie que creció más rápidamente en salinidades mayores (32 y 37), mientras que *A. ostenfeldii* no creció a esas salinidades. Para *Alexandrium peruvianum* el crecimiento fue máximo a 25 de salinidad y no creció a 10 de salinidad.

Tabla 3. Tasas de crecimiento (Ke) a diferentes salinidades

| Especie               | 10   | 18   | 25   | 32   | 37   |
|-----------------------|------|------|------|------|------|
| <i>A. catenella</i>   | 0    | 0,27 | 0,28 | 0,45 | 0,40 |
| <i>A. peruvianum</i>  | 0    | 0,18 | 0,27 | 0,19 | 0,20 |
| <i>A. ostenfeldii</i> | 0,16 | 0,12 | 0,12 | 0    | 0    |

### 3.3. Toxinas

Todas las especies presentaron toxinas paralizantes pero en muy diferente proporción y con diferente perfil toxinológico (Fig. 2). En *A. catenella* se detectaron 10 componentes: C1, C2, GTX1-6, neoSTX y STX. Mientras

que en *A. ostenfeldii* y *A. peruvianum* sólo se detectaron 3 componentes: GTX2-3 y STX.

En la figura 2 se muestra la media y desviación estándar de la concentración de cada toxina en conjunto de todos los experimentos en los que se detectaron toxinas. En *A. catenella* y *A. ostenfeldii* se detectaron toxinas en todas las muestras analizadas tanto del experimento de temperatura como de salinidad. En las dos especies se conservó el perfil de toxinas en todas las muestras. Sin embargo, en *A. peruvianum* sólo se detectaron toxinas en el experimento de temperatura y en muy pequeña cantidad.

En relación a la presencia de CIs. Se detectó 13-Desmetil-SPX-C en *A. peruvianum* (4,943 fg/cel) y Gymnodimina-A en *A. ostenfeldii*.

## 4. CONCLUSIONES

*A. catenella* mostró tasas de crecimiento mayores que *A. peruvianum* y *A. ostenfeldii*. Las tres especies crecieron más rápidamente a 26°C y menos a 15°C aunque las tasas de crecimiento no mostraron grandes diferencias.

Las tres especies mostraron diferentes ventanas óptimas de crecimiento en relación a la salinidad. *A. catenella* a salinidades de 32 y 37, *A. peruvianum* a 25 de salinidad y *A. ostenfeldii* a 10 de salinidad.

Las tres especies produjeron toxinas PSP pero en muy diferentes cantidades y perfil toxinológico. En *A. peruvianum* la concentración de esas toxinas fue muy baja. Se detectaron además espirólidos (13-Desmetil-SPX C) en *A. peruvianum* y Gymnodimina-A en *A. ostenfeldii*.

## 5. REFERENCIAS

- [1] A.D. Cembella, "Ecophysiology and Metabolism of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Microalgae", en *Physiological Ecology of Harmful Bloom*, Springer, Heidelberg, pp. 381-403,1998.

- [2] C.R. Tomas, R. van Wagoner, A.O. Tatters, K. D. White, S. Hall, J.L.C, “*Alexandrium peruvianum* (Balech and Mendiola) Balech and Tangen a new toxic for coastal North Carolina”, *Harmful Algae*, vol. 17, pp. 54-63, 2009.
- [3] A Kremp, T. Lindholm, N. Dreßler, K. Erler, G. Gerdt, S. Eirtovaara, E. Leskinen, “Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the Åland Archipelago, Northern Baltic Sea”, *Harmful Algae*, vol. 8, pp. 318–328, 2009.
- [4] U. John, R.A. Fensome, L.K. Medlin, “The application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* ‘species complex’ (Dinophyceae)”, *J. Mol. Evol.*, vol. 20, pp. 1015–1027, 2009.
- [5] W. A. Rourke, C. J. Murphy, G. Pitcher, J. M. Van Deriet, B. G. Burns, K. M. Thomas, M. A. Quilliam, “Rapid Postcolumn Methodology for Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish Tissue” *JAOC International*, vol. 91, pp. 589-597, 2008.