



UNIVERSIDAD DEL MAR
Campus Puerto Ángel,
Oaxaca

**Determinación de saxitoxinas en
Synechococcus elongatus (Nägeli
1849) mediante bioensayo en ratón**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA

Miguel Ángel Matus Hernández

M. en C. Alejandra Torres Ariño
Director

Puerto Ángel Oaxaca, agosto de 2010

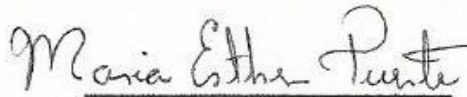
Puerto Ángel, Oaxaca a Agosto de 2010

Después de realizar una revisión detallada de la tesis "**Determinación de saxitoxinas en *Synechococcus elongatus* (Näg 1849) mediante bioensayo en ratón**" presentada por el pasante en Biología Marina Miguel Ángel Matus Hernández, se considera que cumple con los requisitos y la calidad necesarios para ser defendida en el examen profesional.

COMISIÓN REVISORA

M. en C. Alejandra Torres Ariño
Universidad del Mar
Director

M. en C. Ángel Cuevas Aguirre
Universidad del Mar
Sinodal



Dra. María Esther Puente
Centro de Investigaciones Biológicas
del Noroeste, S.C.
Sinodal

M. en C. Amado Shain Mercado
Universidad del Mar
Sinodal

Biól. EIA. Antonio Pineda Alcázar
Laboratorio Estatal de Salud Pública
Sinodal

RESUMEN

Las saxitoxinas y sus derivados son potentes alcaloides neurotóxicos asociados principalmente a dinoflagelados y aunque éstas se presentan en algunas cianobacterias filamentosas dentro de sus metabolitos secundarios, para las unicelulares no existe reporte alguno. La finalidad del presente trabajo fue determinar la presencia de saxitoxinas en *Synechococcus elongatus* (CBS) y su efecto en la alimentación de *Crassostrea gigas*, evaluando su potencial tóxico mediante bioensayo en ratón. Organismos adultos de ostión japonés *C. gigas* de talla 10 ± 2 cm se alimentaron por 23 días con 3 dietas a diferentes concentraciones. Los primeros 15 días las dietas empleadas fueron: una mixta formada por CBS (2%), *Tetraselmis suecica* (TETS) e *Isochrysis galbana* var. Tahitiana (ISGT) al 1%, la dieta control compuesta por TEST e ISGT al 2% y finalmente la dieta de *S. elongatus* al 4%. Las dietas se modificaron a partir del día 16 quedando CBS al 6%, dieta Mixta compuesta por CBS al 4% y TETS al 2% y para la dieta control solamente se empleo TETS al 6%. Asimismo se evaluó la biomasa equivalente a cada una de las dietas, mismas que se obtuvieron mediante centrifugación. A lo largo del experimento se registró una mortalidad considerable que fue constante en cada uno de los tratamientos, presentándose la mayor mortalidad acumulada en el tratamiento control con un 72.56%, seguida de la dieta mixta con 64.41% y finalmente el tratamiento de CBS al 4% con un 48.16%; mientras que los valores promedio del índice de supervivencia finito calculados fueron de 0.277 para la dieta control; 0.409 para la dieta mixta y finalmente 0.530 para la dieta con CBS al 4%. En cuanto al cálculo del índice de condición, se obtuvo que al inicio del experimento fue demasiado bajo con valores que van desde 14.92 hasta los 33.45, mientras que a mitad del experimento aumentó significativamente, principalmente en la dieta mixta con 45.59, seguida de la dieta control con 34.66 y finalmente la dieta de CBS al 4% con 31.52. Para evaluar la toxina almacenada se llevó a cabo la extracción ácida diseñada para saxitoxinas, obteniendo un total de 8 extractos, 3 de biomasa (de cada una de las dietas), 3 a partir de los ostiones alimentados y 2 de los ostiones para determinar las condiciones iniciales antes de iniciar el experimento. Dichos extractos fueron inyectados en ratones albinos (cepa ICR Webster Suiza). Los extractos obtenidos de ostiones alimentados con CBS al 4% y con la dieta mixta mostraron la presencia de saxitoxinas, cuantificándose un promedio de $32 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ de tejido blando de ostión, causando la muerte en un promedio de ± 4 h, no siendo así para los extractos obtenidos de los ostiones alimentados con la dieta control, de la biomasa centrifugada y de los ostiones solos. En ambos casos los signos que presentaron fueron debilidad muscular, descoordinación de los miembros, respiración agitada, temores, eliminación constante de heces, convulsiones y finalmente la muerte. Aunque, el tiempo de muerte y la presencia de otros signos como: debilidad muscular, dificultad para respirar (disnea), temblores y calambres seguidos de fatiga indican la posible presencia de otro tipo de toxina, pudiéndose tratar de una anatoxina-a o bien la posibilidad de una mezcla de toxinas. Si bien, se evidenció la toxina, la concentración a la cual se encuentra no es considerada de alto riesgo para la salud pública.

Palabras clave: Cianobacteria, *C. gigas*, índice de condición, saxitoxinas, *S. elongatus*, mortalidad, toxicidad.

Abstract

Saxitoxins and its derivatives are potent alkaloids neurotoxins mainly associated with dinoflagellates and although they occur in some filaments cyanobacteria in their secondary metabolites, for the unicellular there doesn't exist any report. The purpose of this study was to determine the presence of saxitoxins in *Synechococcus elongatus* (CBS) and its effect on the feeding of *Crassostrea gigas*, by evaluating their toxic potential. This was done by means of bioassay in mice. Adult organisms from Japanese oyster *C. gigas* of size 10 ± 2 cm were fed for 23 days with 3 diets in different concentrations. The first 15 days the diets used were: a mixed diet formed by CBS (2%), *Tetraselmis suecica* (TETS) and *Isochrysis galbana* var. Tahitian (ISGT) at 1%, the control diet composed of TEST and ISGT at 2% and finally the diet of *S. elongatus* at 4%. The diets were modified from day 16 remaining CBS at 6%, mixed diet composed by CBS at 4% and TETS at 2% and for the control diet TETS at 6% was used. Also, the biomass equivalent to each of the diets were evaluated. These were obtained by centrifugation. Throughout the experiment there was a considerable mortality that was constant in each of the treatments, presenting the highest cumulative mortality in the control treatment with a 72.56%, followed by the mixed diet with 64.41% and finally the treatment of CBS at 4% with a 48.16%, while the average values of the finite survival rate and the instantaneous mortality rate calculated were of 0.277 for the control diet; 0.409 for the mixed diet; finally 0.530 for the diet with CBS at 4% respectively. Regarding the calculation of the condition rate, it was obtained that at the beginning of the experiment it was too low with values ranging from 14.92 until 33.45, while in the (middle) of the experiment it increased significantly, mainly in the mixed diet with 45.59, followed by the control diet with 34.66 and finally the diet of CBS at 4% with 31.52. To evaluate the stored toxin, acid extraction designed for the production of saxitoxins was carried out, obtaining a total of 8 extracts, 3 of biomass (for each of the diets), 3 from the oysters fed and 2 of the oysters to determine the initial conditions before starting the experiment. These extracts were injected into albino mice (Webster Switzerland ICR strain strain ICR Switzerland Webster). The extracts obtained from the oysters fed with CBS at 4% and with the mixed diet showed the presence of saxitoxins, the saxitoxins quantified in an average of $32 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ of oysters soft tissue, causing the death in an average of ± 4 h. This was not so for the extracts obtained from the oysters fed with the control diet, from the centrifuged biomass or from the oysters alone. In both cases the signs showed were muscle weakness, uncoordination of the limbs, agitated breathing, tremors, continuous disposal of faeces, convulsions and finally death. Although, the time of death and the presence of other signs such as muscle weakness, difficulty breathing (dyspnea), tremors and cramps followed by fatigue indicate the possible presence of another type of toxin; which could be an anatoxin-a or the possibility of a mixture of toxins. Even though, the toxin was evident, the concentration at which is found is not considered a high risk to public health.

Keywords: Cyanobacteria, *C. gigas*, condition rate, saxitoxins, *S. elongatus*, mortality, toxicity.

DEDICATORIA

A mis padres Mariano y Salus, por haberme dado la vida, la oportunidad de seguir adelante con mis estudios y por su apoyo brindado en cada una de mis decisiones.

A mis hermanos, Naye, Urí, Javí, Toño, Tere, Lucero, que siempre están conmigo a pesar de la distancia y por ser los mejores hermanos.

y a tí Denisse que siempre estarás con nosotros.....

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, de quien aprendí mucho a lo largo de este tiempo, por la dedicación y desvelos, confianza, por su tiempo, pero sobre todo por su valiosa amistad, gracias “*Darlata*”.

*A*gradezco de una manera muy especial a Garo y a Maggi por habernos apoyado en la compra y el envío de los ostiones.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, por las facilidades prestadas para la evaluación de la toxicidad.

A mis sinodales: Ocean. Ángel Cuevas Aguirre, por estar al pendiente de este trabajo (por los desvelos), por todos los consejos, correcciones y sugerencias, al IBQ. Amado Jorge Shain Mercado, por el tiempo dedicado, por sus acertados comentarios y correcciones, a la Dra. María Esther Puente por las enriquecedoras revisiones y la valiosa colaboración con este trabajo, al M. en C. Antonio Pineda Alcázar por sus correcciones, por brindarme su apoyo incondicional y su casa aun sin conocerme. A todos ustedes muchas gracias.

Un profundo agradecimiento a Sabino, Fátima, Cachi, Saraí, Dennise, Omar, Hilda, Nayeli, Lupita y Quero, que amablemente me apoyaron durante la realización del experimento.

Al profe Pablo Pintos Terán por haber facilitado el uso de su multiparámetros.

A Carmen Arrazate Rodríguez por el apoyo en la preparación de las muestras histológicas.

A ti amor gracias por todo tu apoyo, comprensión y que a pesar de que no te gusta nada que tenga que ver con biología hiciste tu mayor esfuerzo para ayudarme jeje!

A mis amigos y compañeros de la carrera gracias por su amistad y por los buenos momentos que pasamos juntos.

Y a todos aquellos que estuvieron cerca de mi muchas gracias...

CONTENIDO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Características de las cianobacterias	1
1.2. Características generales del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i>	3
1.3. Florecimientos algales nocivos (FAN)	4
1.4. Toxicidad de las cianobacterias	6
1.4.1. Neurotoxinas	8
a) Anatoxina-a (ANTX-a)	8
b) Anatoxina-a(s) (ANTX-s)	9
c) Saxitoxinas (STX)	9
1.4.2. Hepatotoxinas	10
a) Microcistinas	10
b) Nodularias	11
1.4.3. Toxinas no específicas	11
a) Cilindrospermosina	11
b) Lipopolisacáridos (LPS)	12
1.5. Métodos para la determinación de toxinas	12
a) Bioensayo en ratón	13
b) Métodos analíticos	14
c) Análisis enzimáticos y técnicas inmunológicas	15
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
5.1. General	21
5.2. Específicos	21
6. MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1. Obtención de muestras	22
a) Ostiones	22
b) Cianobacterias y microalgas	23
6.2. Producción de biomasa para alimento (cianobacterias y microalgas)	23
6.3. Diseño experimental	24
6.4. Tasa de alimentación	24
6.5. Dietas	25
6.6. Medición de las variables fisicoquímicas	26
6.7. Índice de condición	26
6.8. Mortalidad	27
6.9. Evaluación de la toxicidad	27
6.9.1. Obtención del extracto	27
6.9.2. Bioensayo en ratón para la determinación de saxitoxinas	29
6.10. Tratamiento estadístico de los datos	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Distribución inicial de tallas	31
7.2. Medición de los parámetros físico-químicos	32
7.3. Obtención de biomasa	35
7.4. Mortalidad del ostión <i>C. gigas</i>	37
7.5. Índice de condición	38
7.6. Evaluación de la toxicidad en ratón	40
7.6.1. Inyección del extracto ácido en ratones	40

a) Extracto de ostiones recién llegados de la granja acuícola (EAO1)	41
b) Extracto de ostiones antes de iniciar el experimento (EAO2)	41
c) Extracto de la dieta de <i>S. elongatus</i> al 4% (EACBS4%)	42
d) Extracto de la dieta mixta (EADmixta)	42
e) Extracto de la dieta control (EADcontrol)	42
f) Extracto de ostiones alimentados con <i>S. elongatus</i> al 4% (EAOCBS4%)	42
g) Extracto de ostiones alimentados con la dieta mixta (EAOfmixta)	43
h) Extracto de ostiones alimentados con la dieta control (EAOcontrol)	43
8. DISCUSIÓN	45
8.1. Efecto de <i>S. elongatus</i> en <i>C. gigas</i> bajo condiciones de laboratorio	45
8.2. Índice de condición	50
8.3. Bioensayo en ratón	52
9. CONCLUSIONES	54
10. RECOMENDACIONES	56
11. LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Preparación de los ostiones <i>C. gigas</i> antes de iniciar el experimento. A) Limpieza y eliminación de epibiontes B) Biometrías C) Marcaje.	22
2. Niveles de producción de microalgas y cianobacterias generados en el LBM-UMAR A) 5 L. B) 15 L. C) Columna de 160 L.	23
3. Unidades experimentales empleadas durante el experimento. A) Contenedor donde se muestran los niveles y la forma en que se colocaron los ostiones. B) Colocación de los contenedores a lo largo del experimento.	24
4. Pasos realizados para determinar la tasa de alimentación de <i>C. gigas</i> (Thunberg). A) Organismos elegidos al azar. B) Desconchado de los organismos. C) Secado del tejido blando de los ostiones.	25
5. Extracción ácida para la evaluación de saxitoxinas. A) Obtención de los 100 g de tejido blando de ostión. B) Mezclado con HCl. C) Medición del pH. D) Medición de la temperatura. E) Re-suspensión por 24 h F) Obtención del sobrenadante. G) Centrifugado del sobrenadante.	28
6. Bioensayo en ratón para la evaluación de la toxicidad de los extractos obtenidos. A) Inyección del extracto vía intraperitoneal. B) Ratones inoculados y en observación de signos clínicos. C) Muerte del ratón después de la inoculación.	30
7. Distribución de las medidas morfométricas (largo, alto y ancho) y del peso húmedo de los datos obtenidos de <i>C. gigas</i> al inicio del experimento.	32
8. Variables físico-químicas (pH, oxígeno disuelto, salinidad y temperatura) registradas en las unidades experimentales durante la alimentación de ostiones <i>C. gigas</i> , en donde para cada una de las gráficas CBS4%, mixto y control corresponden a los datos obtenidos de cada una de las dietas empleadas en cada tratamiento	34
9. Promedio de la mortalidad registrada a lo largo el experimento en cada uno de los tratamientos.	37
10. Comparación del índice de condición de <i>C. gigas</i> al inicio del experimento (ICI) con respecto a 15 días de alimentación (ICF).	40
11. Necropsias en ratones albinos de la cepa ICR Webster Suiza inyectados con los extractos obtenidos a partir del molusco <i>C. gigas</i> previo al experimento (A) EAO1, B) EAO2), de la biomasa centrifugada de <i>S. elongatus</i> , <i>T. suecica</i> e <i>I. galbana</i> var. Tahitiana (C) EADCBS4%, D) EADmixta, E) EADcontrol) y del molusco alimentado con diferentes dietas de la cianobacteria y microalgas empleadas (F) EAOCBS4% G) EAOMixto H) EAOCcontrol	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página
I. Principales géneros de cianobacterias que desarrollan proliferaciones tóxicas (Chorus & Bartram 1999; De León 2002b).	6
II. Especies de cianobacterias reportadas por presentar propiedades tóxicas. (Tomada de Resson <i>et al.</i> 1994).	7
III. Valores obtenidos de la prueba de normalidad de K-S para el peso húmedo y las medidas morfométricas de <i>C. gigas</i> al inicio del experimento.	31
IV. Volumen de microalgas y cianobacterias correspondientes a la ración alimenticia diaria empleada en cada una de las dietas, relacionado con la concentración celular de cada uno de los cultivos.	36
V. Promedio de índices de supervivencia y de mortalidad instantánea para cada uno de los tratamientos al final del experimento.	38
VI. Relaciones morfométricas e índice de condición de <i>C. gigas</i> al inicio y después de 15 días de experimentación.	39
VII. Evaluación de la toxicidad de los extractos obtenidos a partir de la biomasa centrifugada y de los ostiones alimentados.	41