

## ESTUDIOS SOBRE SISTEMAS DE DETECCIÓN DE LA BIOLUMINISCENCIA ASOCIADA A LA PRESENCIA DE DINOFLAGELADOS TÓXICOS CAUSANTES DE MAREA ROJA EN LOS CANALES Y FIORDOS DE LA XI REGIÓN

Paulina Uribe C.  
Universidad de Chile

### INTRODUCCIÓN

Los fenómenos de Florecimientos Algales Nocivos (FAN) son cada vez más frecuentes y las áreas geográficas afectadas se han extendido en los últimos años. Las toxinas producidas por los dinoflagelados en estas FAN, principalmente las paralizantes o VDM, son causantes de problemas graves y crecientes para la salud pública y economía en nuestro país, particularmente entre las Regiones X y XII. Existe un gran interés en todo el mundo en el desarrollo de técnicas y sistemas de detección temprana de los FAN y de sus consecuencias en los mariscos de consumo humano.

La bioluminiscencia es una propiedad única de los dinoflagelados que los distingue de los demás integrantes del fitoplancton y que puede reflejar su estado o actividad metabólica (Sweeney, 1987). Esta notable característica se ha observado en algunas especies, entre ellas las del género *Alexandrium*, conocidas por producir toxinas paralizantes o VDM.

La bioluminiscencia consiste en la emisión de destellos de luz azul-verdosa con una emisión máxima entre los 474- 476 nm, observables en los florecimientos en aguas costeras y en cultivos (Wilson y Hastings, 1998). La luminiscencia se produce por estímulo mecánico, o movimiento del agua circundante, que es detectado en la membrana externa (Hamman and Seliger 1972, 1982), y además está determinada por el ritmo circadiano, y su máximo ocurre en la mitad de la fase nocturna y el mínimo en la mitad de la fase diurna.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la presencia de dinoflagelados en la columna de agua se puede determinar cualitativamente mediante el registro de la luminiscencia tanto en muestra de fitoplancton como directamente mediante en la columna de agua.

En nuestros estudios preliminares en fitoplancton de red de la zona de Magallanes, hemos determinado y registrado la bioluminiscencia de diferentes especies de dinoflagelados mediante la metodología descrita (Uribe y Espejo, 2003). Durante el crucero CIMAR 7 Fiordos, registramos por primera vez la luminiscencia *in situ* o directa mediante el uso de un cuantómetro. Esta fue la primera aplicación de este instrumento fotosensible para registrar luminiscencia. Este instrumento es lo suficientemente sensible para determinar la luz emitida por los organismos luminiscentes en diferentes etapas del ciclo circadiano, y para determinar la ubicación de estos organismos en la columna de agua mediante registro de perfiles de la luz emitida. En las estaciones medidas, la bioluminiscencia correlacionó con la presencia de dinoflagelados totales en la muestra de fitoplancton de red. En una de estas estaciones se logró aislar *Alexandrium catenella*. Nuestros resultados preliminares sugieren que los registros de luminiscencia tanto en muestras de fitoplancton como “*in situ*” podrían ser una herramienta

importante en la detección temprana de la presencia y ubicación de dinoflagelados luminiscentes y tóxicos como los del género *Alexandrium* en zonas donde los fenómenos de floraciones nocivas son recurrentes como las aguas de los canales y fiordos de la XI región. Recientemente, se ha determinado además que la integración entre las mediciones de bioluminiscencia y determinación de clorofila por es uno de los métodos bio-ópticos más exactos para la localización de la distribución de organismos primarios en el océano (Heine *et al.*, 2002).

## **OBJETIVO GENERAL**

En el presente proyecto queremos explorar el posible desarrollo de un sistema de localización o detección temprana de la presencia de diferentes dinoflagelados asociados a eventos de floraciones nocivas (FAN) o mareas rojas en los fiordos y canales exteriores de la XI Región, mediante la determinación entre la luminiscencia registrada directamente o "in situ" y en muestras fitoplanctónicas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras de Agua de Roseta**

Se utilizaron muestras de agua recogidas con roseta en profundidades de 5, 10, y 25 metros en algunas estaciones.

### **Muestras de Fitoplancton**

Se tomaron muestras de fitoplancton en red de 23  $\mu\text{m}$  en lances verticales hasta 30 m de profundidad, se filtraron posteriormente en malla de Nylon de 100  $\mu\text{m}$ , para eliminar el zooplancton, se concentraron en malla de 11 $\mu\text{m}$ . Se conservaron refrigeradas y en oscuridad para el registro de la luminiscencia.

### **Registro de luminiscencia en terreno**

La luminiscencia emitida en las muestras de agua de roseta y de muestras de fitoplancton se registró mediante un luminómetro portátil, o contador de fotones (Figura 1), en alícuotas de 1 ml, antes, llamado registro inicial, y después de una estimulación química. La luminiscencia total fue aquella registrada después de estimulación química agregando Acido acético suficiente para la obtención de un pH final de 4.0. Se calculó la razón  $R_L$  entre la luminiscencia total con estimulación y la luminiscencia inicial.

$$R_L = L_T / L_i$$

Se compararon estos valores entre los registros de las diferentes muestras y se relacionó con la presencia de dinoflagelados en especial con la presencia de *Alexandrium catenella*.

Se optimizó el horario de registro según el ciclo circadiano, haciendo los registros en la media noche o mitad de la fase oscura y de mayor intensidad de la luminiscencia (Hamman and Seliger, 1982). Las muestras positivas se guardaron refrigeradas y en oscuridad por un máximo de 8 horas para la observación, análisis cualitativo de su contenido y el análisis de la luminiscencia en laboratorio.

### **Registro de luminiscencia *in situ***

Los registros se realizaron mediante lances cada 1 metro y hasta una profundidad máxima de 30 m con un cuantómetro marca Li-cor, usando un sensor esférico, orientado hacia abajo.

### **Observación y recuento**

50 ml de las muestras con luminiscencia positiva, se conservaron para la determinación de abundancia relativa de las especies de dinoflagelados tóxicos mediante la observación de una alícuota (0.1 ml) en tres réplicas, bajo un cubreobjetos de 18 x 18mm y mediante un microscopio óptico, usando un aumento de 10X. La mitad de estas muestras se mantuvo en refrigeración y en oscuridad, y se puso en cultivo con medio en f/2 (Guillard et al 1995) a 16 °C y con fotoperíodo de 10:14 h.

### **Aislamiento de dinoflagelados tóxicos**

Se aislaron en el laboratorio mediante el método de “fishing”, y se mantuvieron en cultivo en frascos estériles en f/2 a 16° C con fotoperíodo de 14: 10 horas. (Guillard et al 1995).

## **RESULTADOS**

### **Registro de luminiscencia**

En un estudio preliminar, en el Crucero CIMAR 7 Fiordos etapa II, se comparó la luminiscencia de las muestras de fitoplancton de red, con la obtenida en las muestras de roseta, y se determinó que en ambos tipos de muestras la condición fisiológica del fitoplancton era óptima obteniéndose valores de luminiscencia similares a los obtenidos en dinoflagelados en cultivo. Aunque la luminiscencia puede ser detectada en muestra de agua de roseta, en las muestras de red puede aumentarse la sensibilidad de la detección por la concentración de la muestra, la magnitudes de la emisión en las muestras de fitoplancton de red es de Figura 1.

Los mayores valores en la razón  $R_L$  se obtuvieron en aquellas muestras y/o alícuotas en que se observó la presencia de dinoflagelados por microscopía, en la Tabla I y en la Figura 4 se señalan especialmente las muestras en que se detectó la presencia de *A. catenella*. Por ejemplo, en la muestra obtenida de la estación 34 del crucero CIMAR 7 Fiordos etapa II se logró aislar *A. catenella*. Este resultado es muy importante porque permite contar con nuevos clones para la continuación de estos estudios de luminiscencia en laboratorio, con el fin de

determinar posteriormente las características fisiológicas de su emisión en mayor detalle, y en diferentes condiciones.

Tabla I. Razón entre luminiscencia estimulada / luminiscencia inicial  $R_L$  en muestras de fitoplancton de red.

SIN DINOFLAGELADOS	CON DINOFLAGELADOS	CON ALEXANDRIUM	
18.28	318.54	318.54	
5.26	97.48	97.48	
23.93	330.13	330.13	
0.94	657.02	657.02	
4.56	112.87		
29.51	210.90		
12.62	265.34		
	125.88		
	132.36		
	49.94		
	222.42		
	67.89		
<b>13.59</b>	<b>215.90</b>	<b>114.74</b>	<b>promedio</b>

### Registro de luminiscencia *in situ*

El uso de un sensor esférico Li-cor permitió detectar la luminiscencia emitida directamente en la columna de agua, en lances verticales o *in situ*. Estos registros se realizaron en total oscuridad desde la toldilla del AGOR Vidal Gormaz. Este instrumento se utiliza normalmente para determinar el decaimiento de la luz solar en la columna de agua, porque es capaz de contar los fotones que llegan al sensor fotoeléctrico. Mediante este instrumento se logró establecer la profundidad en la que se localiza la mayor cantidad de emisión luminiscente. El instrumento es suficientemente sensible para detectar luminiscencia emitida incluso durante el día, a profundidades en las que no hay interferencia de la luz solar. En esta etapa del ciclo circadiano la emisión de luminiscencia es más baja, como se determinó, por ejemplo, en E. Elefantes, durante el CIMAR 7 Fiordos-II en profundidades bajas estos valores están sumando la radiación solar, por lo tanto no puede ser determinada la verdadera emisión. (Figuras 3 y 4).

En los registros nocturnos obtenidos en el Crucero CIMAR 8 Fiordos-II se pudo observar además diferencias en las profundidades de las emisiones máximas en las estaciones donde se encontró presencia de *Alexandrium* y dinoflagelados por microscopía de las muestras de fitoplancton, en forma coincidente con lo observado en los registros de luminómetro. La emisión de luminiscencia detectada a profundidades mayores pensamos que corresponde mayormente a la emitida por organismos del zooplancton, debido a que en muestras de estas profundidades (superiores a los 20 m.) se encontraron variedades de copépodos y otros organismos luminiscentes y fueron observados en el microscopio invertido.

## DISCUSIÓN

La exploración de las características de la luminiscencia en especies de dinoflagelados tóxicos, en los canales y fiordos de la región de Aysén, es de gran importancia porque podría permitir el desarrollo de sistemas de detección dinoflagelados. Los resultados preliminares que se muestran sugieren, en estas primeras etapas que podría ser importante desarrollar esta línea de investigación aplicada en el futuro acompañando investigaciones en las características específicas de la emisión de luminiscencia de los dinoflagelados tóxicos de nuestras costas australes, con el fin de diseñar técnicas específicas y complementarias a las existentes, para su detección temprana. Por ejemplo parece especialmente relevante poder establecer experimentalmente las diferencias en frecuencia, ritmos, intensidades, tiempo de respuesta y pulsos de la luminiscencia de diferentes especies tóxicas y no tóxicas de dinoflagelados en diferentes condiciones y estímulos.

Es posible que las señales de luminiscencia tengan rasgos específicos que sean propios de grupos y especies de dinoflagelados, en forma análoga a lo que se observa en la comunicación coordinada mediante sonido en los vertebrados como aves y anfibios que, aunque son emitidos en rangos de longitud de onda similar, al hacer un análisis más detallado, con los instrumentos apropiados, se pueden distinguir patrones de frecuencias, ritmos, tonos, que los hace característicos para una especie o grupo. La luminiscencia de los insectos por ejemplo, es un mecanismo de comunicación entre individuos de un grupo o especie durante el cortejo y apareamiento (Knaust, 1988, Lloyd, 1983; Levandowsky 1987).

Estos sistemas podrían llegar a ser un aporte a los programas de monitoreo de mareas rojas. La perspectiva de una aplicación o desarrollo de estas nuevas técnicas para la detección de dinoflagelados tóxicos nos parece de gran relevancia, dada la importancia e impacto económico y de salud pública de los florecimientos algales nocivos en la XI Región. La exploración de la emisión de luminiscencia realizada permitió, en conjunto con la observación microscópica de muestras de fitoplancton vivo a bordo, nos permitió adaptar un instrumento sencillo y de uso común en la bio-óptica como el cuantómetro, que se puede modificar y complementar para hacer registros de áreas o cortes de la columna de agua para obtener una mejor localización de los dinoflagelados luminiscentes. Por otra parte se pudieron observar diferencias en los registros directos en las estaciones con presencia de *Alexandrium* con las estaciones en las que no se observó este dinoflagelado tóxico, estos datos coincidieron con lo obtenido al comparar los valores de  $R_L$  de estaciones con dinoflagelados y sin dinoflagelados, y con *Alexandrium*.

En estudios recientes se ha logrado identificar la emisión luminiscente de grupos de organismos diferentes como celenterados y dinoflagelados mediante un registros de la respuesta al estímulo de la agitación del agua simultáneo al registro de la emisión luminiscente en cortes de cortes y transectos de la columna de agua, y mediante el uso de un equipo especialmente diseñado para este propósito con la adición de cámaras especiales de video. La determinación de la diferencia en la emisión se basa en el tiempo de la respuesta luminiscente de estos organismos, siendo en el caso de los dinoflagelados, los tiempos más cortos en el rango de 30 a 300 milisegundos. También en estudios de escala más detallada se ha podido registrar la emisión de luminiscencia de diferentes especies de dinoflagelados (Widder et al

1993, Wider, 2001). Los registros obtenidos en algunas estaciones de los canales y fiordos de la Región de Aysén, nos han permitido establecer el rango de intensidad de la luminiscencia *in situ*, y o sugieren que la razón entre la luminiscencia estimulada químicamente y la luminiscencia basal en las muestras de fitoplancton que se puede utilizarse como un indicador de la presencia de dinoflagelados en una muestra de fitoplancton de red vivo. Esperamos que estos datos preliminares puedan ser complementados con futuros estudios tanto experimentales como de campo en las aguas de la zona de Aysén, de frecuente presencia de dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* .

## REFERENCIAS

- Hamman J.P., and H. H. Seliger. 1972. The Mechanical Triggering of Bioluminescence in Marine Dinoflagellates: Chemical Basis. J. Cell. Physiol. 80: 397-408.
- Hamman J.P. and H. H. Seliger. 1982. The Chemical Mimicking of the Mechanical Stimulation, Photoinhibition of Bioluminescence in the marine Dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. J. Cell. Physiol. 111: 315-319.
- Heine, E L., Herren, C M., Widder, E A 2002. Distribution of Bioluminescence Across an Optical Front at LEO-15. Ocean Sciences Meeting ASLO. Hawaii, USA.
- Knaust, R. Urbig., T, Li, L.. Taylor, W. Hastings, J. W. 1988. The circadian rythm of bioluminescence in *Pyrocystis* is not due to differences in the amount of luciferase: a comparative study of thee luminescent marine dinoflagellates. J. of Phycol. 34: 167- 172.
- Levandowsky, M. y Kaneta, P. J. 1987. Behaviour in dinoflagellates. In :The Biology of Dinoflagellates. Botanical Monographs Vol 21. Taylor FJR (ed). Blackwell Scientific Publications. Oxford London.pp. 360-397.
- Lloyd , J. E. 1983. Bioluminescence and communication in insects. Annu. Rev. Entomol. 28: 131-160
- Sweeney, B. M. 1987. In :The Biology of Dinoflagellates. Botanical Monographs Vol 21. Taylor FJR (ed). Blackwell Scientific Publications. Oxford London. Pp. 269-281.
- Uribe P., y Espejo, R. 2003. Enrichment by culturing allows the detection of *Alexandrium catenella* in field samples considered negative by conventional monitoring methods. Mar. and Freshwater Res. (en revisión).
- Widder,E.A.,Case,J.F.,Bernstein,S.A.,MacIntyre,S.,Lowenstine,M.R.,Bowlby,M.R.and Cook,D.P.1993.A new large volume bioluminescence bathyphotometer with defined turbulence excitation.Deep-Sea Res.,40 ,607 –627.
- Edith A.Widder. 2001. Bioluminescence And The Pelagic visual Environment. Mar.Fresh.Behav.Physiol., Vol.35: 1 –26

Wilson T., and J. W. Hastings. 1998. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 197-230.

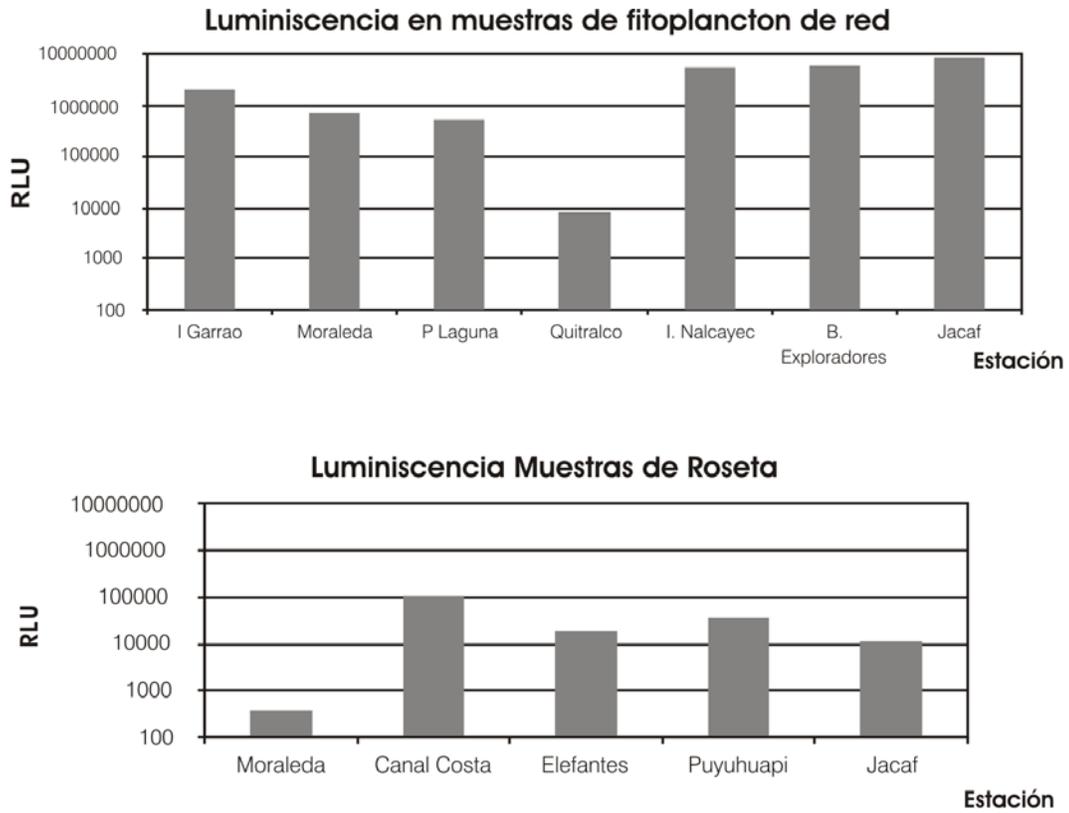


Figura 1. Registro de Luminiscencia en unidades relativas de luz (RLU), en muestras de fitoplancton de red y de agua de roseta.

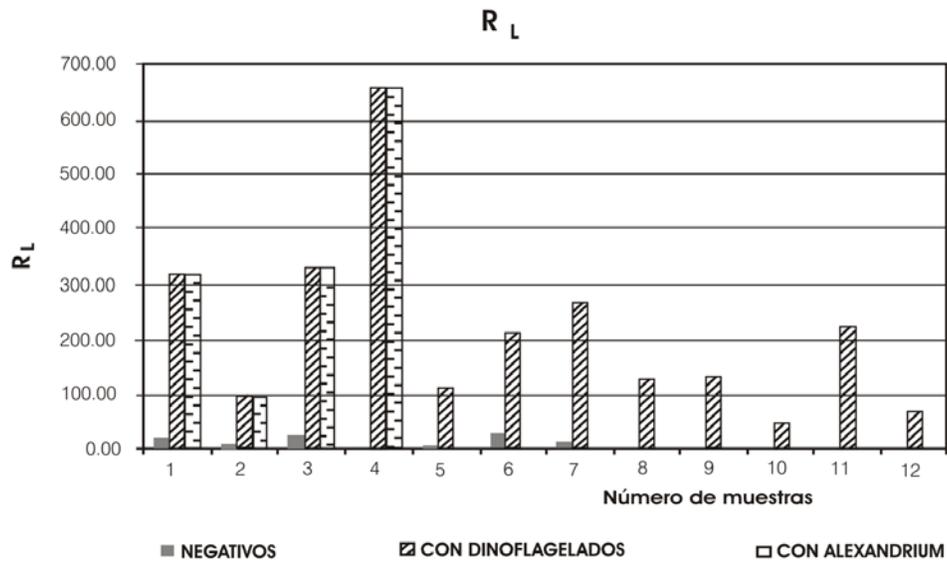


Figura 2. Valores de la razón  $R_L$  obtenidos en muestras de fitoplancton de red.

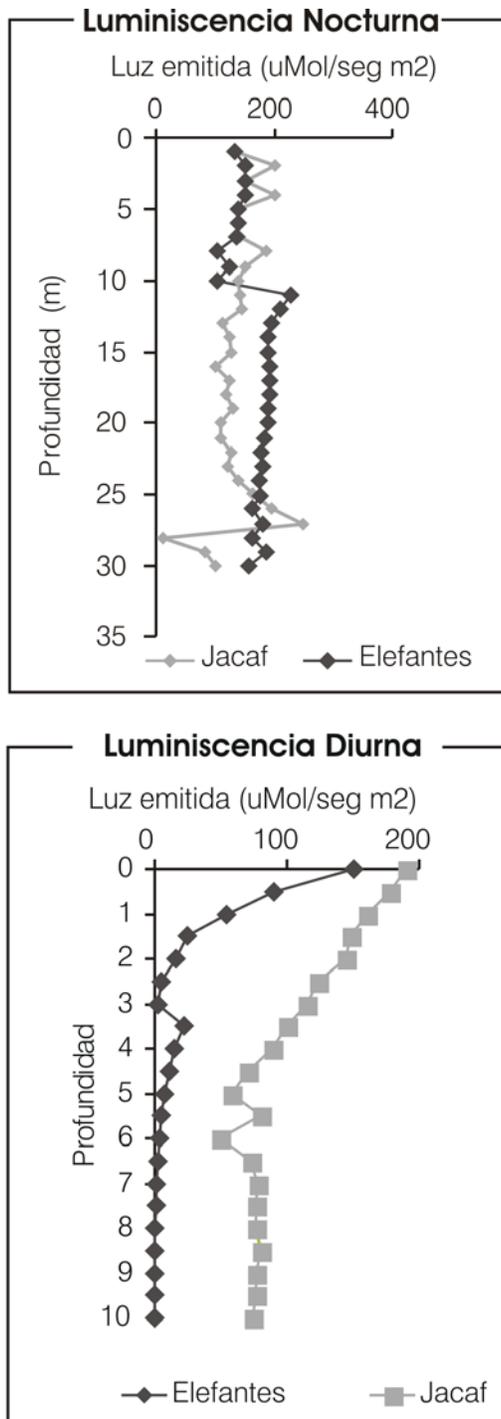


Figura 3. Registros de luminiscencia directa nocturna y diurna en estaciones de esteros Elefantes y Jacaf. (CIMAR 7 Fiordos (2)).

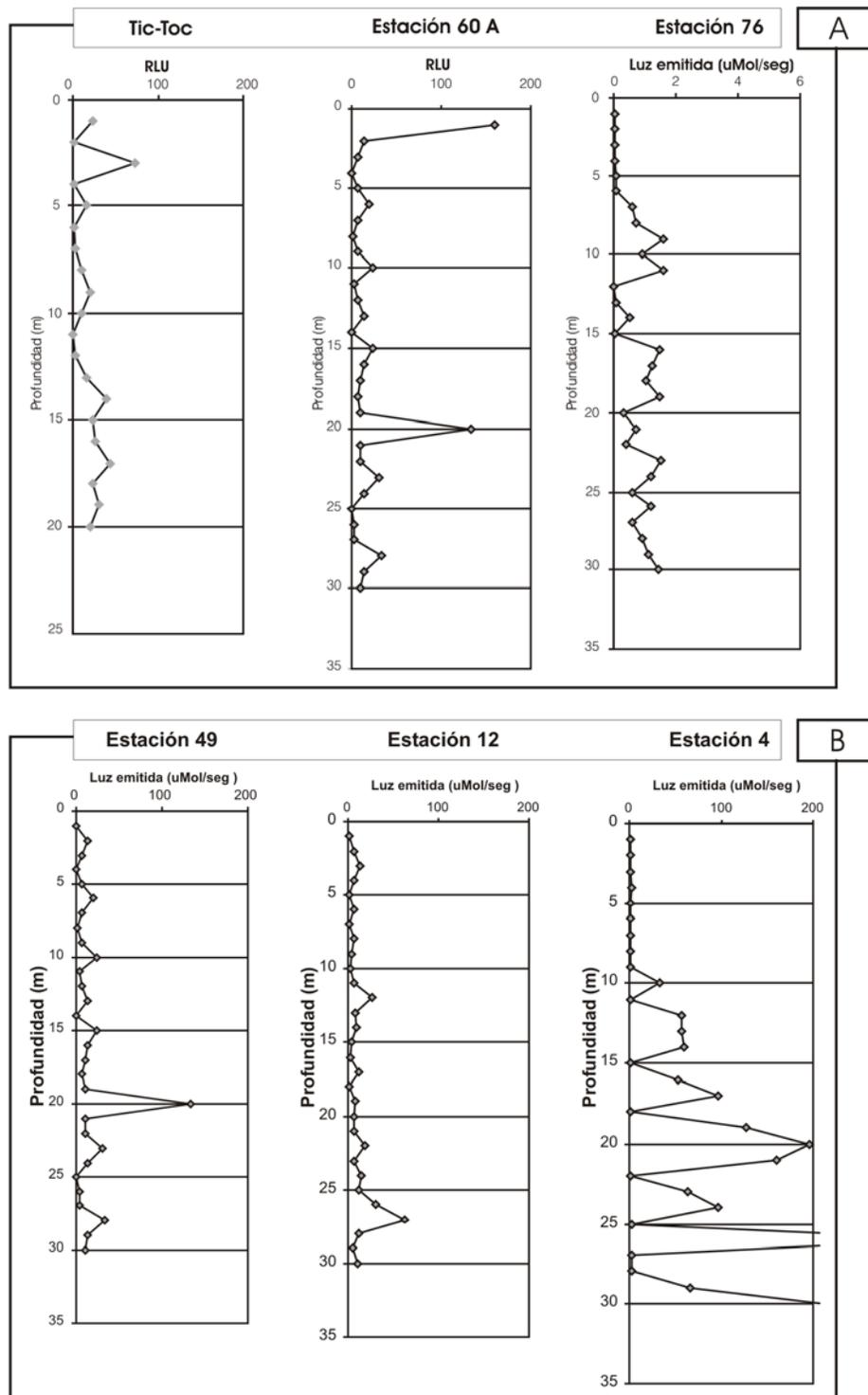


Figura 4. Luminiscencia en estaciones con presencia de *Alexandrium* (A) y sin *Alexandrium* (B).