AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CIANOBACTERIAS CON POTENCIAL TOXICIDAD SOBRE POSTLARVAS DE *Litopenaeus vannamei*

Laurence Massaut[1] y Jacqueline Ortiz[2]
[1]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM)
[2]Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil

Introducción

El fitoplancton es el tipo de plantas que predomina en piscinas acuícolas donde es un componente esencial de la comunidad microbiana por su rol sobre la concentración de oxígeno disuelto y los ciclos de nutrientes (Boyd y Tucker 1998). Está considerado como la principal fuente de oxígeno disuelto en las piscinas sin sistema de aeración, determinando la carga máxima de animales acuáticos que pueden ser cultivados. En asociación con las bacterias, el fitoplancton controla el ciclo de nitrógeno, contribuye al reciclaje de la materia orgánica y constituye la base de la cadena trófica. En estanques que reciben alimento artificial, aún las poblaciones fitoplanctónicas son consideradas beneficiosas manteniendo condiciones adecuadas medio-ambientales para el cultivo.

Al inicio del ciclo de cultivo del camarón se aplican fertilizantes para incrementar la población fitoplanctónica y la disponibilidad de alimentos naturales. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, además del programa de fertilización, se suministra alimento formulado para conseguir una mayor producción. A medida que el cultivo progresa, se incrementa la cantidad de alimento y desechos metabólicos de los camarones, resultando en un incremento de la carga orgánica y concentraciones de nitrógeno y fósforo inorgánicos en la columna de agua. Grandes suministros de nutrientes, altas temperaturas del agua y alta radiación solar estimulan un rápido crecimiento del fitoplancton y el desarrollo de densas biomasas de algas. A medida que se incrementa la concentración de nutrientes disueltos, se incrementa la presencia de cianobacterias tanto en biomasa como en su contribución relativa a la comunidad total del fitoplancton (Paerl y Tucker 1995). Las cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* y *Oscillatoria* pueden formar extensivas y persistentes floraciones en estanques de acuicultura con una salinidad menor a los 10 g/l. Sin embargo, las cianobacterias no representan una buena fuente de producción primaria, forman capas superficiales molestosas, aportan con poco oxígeno al medio, presentan colapso repentino asociado con disminución de oxígeno disuelto, y algunas pueden producir metabolitos olorosos que dan sabores indeseables a los animales cultivados, mientras que otras producen compuestos tóxicos (Paerl y Tucker 1995; Paerl 2000).

En gran parte, toxicidad es un término antropomórfico determinado por impactos negativos de varios metabolitos secundarios (alcaloides, péptidos, organofosforados, ésteres, etc.) causando muerte en mamíferos incluyendo los humanos (Paerl 2000). La mayoría de cianotoxinas (o toxinas de las cianobacterias) pueden probablemente ser consideradas como metabolitos secundarios en la formación de los fotopigmentos que se acumulan en el citoplasma en determinadas situaciones (Dow y Swoboda 2000; Roset *et al*. 2001). Están clasificadas dentro de dos grupos generales: 1) las que causan envenenamiento letal agudo como las neurotoxinas y hepatotoxinas; y 2) las que no son altamente letales en animales pero exhiben más bioactividad selectiva; las citotoxinas. Los factores que contribuyen a la producción de toxina en cianobacterias son poco entendidos. Sin embargo, hay evidencias que la producción de toxinas se incrementa durante la fase de crecimiento exponencial o cuando las condiciones de crecimiento son óptimas (temperatura, pH y luz) (Philip y Jones 1998; Roset *et al*. 2001).

Aunque las cianobacterias son muy comunes en piscinas de camarón, son pocos los reportes de supuestos efectos tóxicos. Lightner (1978) asoció necrosis de la envoltura epitelial del intestino de *Litopenaeus stylirostis* con presencia de un florecimiento de *Spirulina subsalsa* en tanques y raceways de crecimiento y reportó que el contenido estomacal de camarones aparentemente sanos y moribundos revela la ingestión de grandes cantidades de esta alga. El presente estudio está enfocado en aislar, identificar y cultivar las principales especies de cianobacterias encontradas en piscinas camaroneras con baja salinidad para experimentar en condiciones de laboratorio su potencial toxicidad sobre larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Materiales y métodos

De febrero a abril del 2002, en la Provincia del Guayas, se muestreó un total de 32 estanques de cultivo de camarón que presentaron salinidades entre 5 y 15 g/l, de los cuales uno presentó problema de mal sabor (“sabor a choclo”). Las muestras fueron tomadas cerca de la compuerta de salida a unos 15 cm bajo la superficie del agua. En el laboratorio se aislaron seis especies de cianobacterias filamentosas, dentro de las más encontradas en las muestras: *Oscillatoria angustissima*, *Oscillatoria brevis* asociada con producción del olor lodo-tierroso en cultivo (referida como *O. brevis** en este trabajo), *Oscillatoria brevis* **no** asociada con producción del olor lodo-tierroso en cultivo (referida como

O. brevis en este trabajo), *Oscillatoria subtilissima*, una mezcla de *Anabaena circinalis* y *Anabaenopsis circularis* y una *Anabaena* no identificada hasta el nivel de especie (Figura 1).

El cultivo monoespecífico de las algas se mantuvo a una salinidad de 5 g/l, en tubos de ensayo tapados con algodón y colocados en gradilla con iluminación permanente de lámparas fluorescentes (1500 lux) y temperatura ambiente (24-28°C). Para llegar a mayor volumen, las mejores cepas de cada alga fueron transferidas a fiolas de 250 ml con 100 ml del medio de cultivo. Durante la fase exponencial de la curva de crecimiento y una vez que se ha alcanzado suficiente biomasa, se transfirió 100 ml de este cultivo en fiolas de 500 ml con 200 ml de medio de cultivo esterilizado, evitando que las algas sedimentadas pasaran al nuevo medio. A su vez, los cultivos intermedios se emplearon como inóculo para un cultivo en fiolas de 2 l. Estos cultivos intermedios fueron agitados con aire filtrado manteniendo condiciones de luz y temperatura igual que para las cepas aisladas.

El bioensayo de toxicidad consistió en exponer larvas de *L. vannamei* con peso promedio entre 0,22 g y 0,36 g procedentes del Laboratorio de Larvicultura del CENAIM, a las especies de cianobacterias aisladas. Se utilizó la sala de bioensayos de toxicidad en el CENAIM con bandejas cuadradas conteniendo cada una 23 botellas de 2 L. Las larvas fueron transferidas a la sala y aclimatadas a una salinidad de 5 g/l en un tanque de 250 l durante dos días con alimento formulado. Se aseguró que la mortalidad fuera menor al 5% y que las larvas llegaran en buenas condiciones para el bioensayo.

Las larvas fueron expuestas durante 15 días a tres diferentes concentraciones de ciano-bacterias (100 filamentos/ml, 1.000 filamentos/ml y 10.000 filamentos/ml al inicio del bioensayo), con 4 réplicas y 2 controles sin algas a una misma salinidad. Las concentraciones de filamentos de las cianobacterias en los cultivos para iniciar la prueba fueron calculadas mediante conteos en cámara de Sedgewick-Rafter y se realizó diluciones con medio de cultivo esterilizado para asegurar el número de filamentos adecuados. Para comprobar la presencia de toxinas, las larvas fueron también expuestas durante cuatro días a un filtrado del cultivo más concentrado del alga en estudio (10.000 filamentos/ml) con reposición diaria del 80% del volumen. Los filamentos fueron concentrados por medio de centrifugación a una velocidad de 4.500 rpm durante 30 minutos y luego se filtró el sobrenadante con una membrana de nitrato de celulosa (5,0mm). Las pruebas con los filtrados tuvieron dos controles que fueron tratados de la misma manera. Además se adicionó una botella sin camarón para cada concentración de algas para controlar el crecimiento de las cianobacterias en las bandejas de la sala de bioensayo. El diseño fue en bloques con una especie de cianobacteria por bandeja, pero dentro del bloque los diferentes tratamientos fueron repartidos de manera aleatoria.

Las larvas fueron pesadas en grupo de 10 y colocadas en 1,2 L de cultivo de alga o agua. Las larvas fueron alimentadas una vez al día con dieta balanceada comercial (35% de proteínas) a razón de 2% de la biomasa total. Se eliminó la suciedad del fondo (heces, restos de alimento, etc.) de todas las botellas cada 3 días a través de un sifón. Todas las botellas tuvieron aeración y temperatura constante de 28 ± 1°C. Se revisaron las botellas diariamente y se removió las larvas muertas. Con la ayuda de un estereomicroscopio se evaluaron probables adherencias de cianobacterias en cuerpo de las larvas o su presencia en el tracto digestivo. Al final del tiempo de exposición se evaluó la sobrevivencia en cada botella y se estimó el peso promedio de las larvas.

Los datos de los bioensayos de toxicidad no presentaron una distribución normal (prueba Kolmogorov-Smirnov) ni homogeneidad de varianza

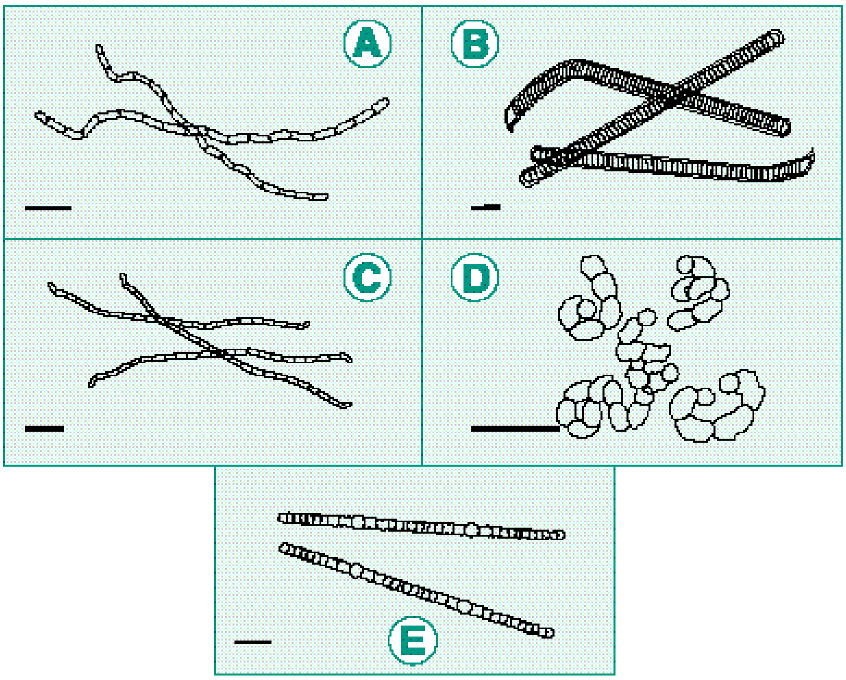

***Figura 1.** Diagrama de las cianobacterias aisladas en el estudio: A)* Oscillatoria angustissima*; B)* Oscillatoria brevis*; C)* Oscillatoria subtilissima*; D) Mezcla de* Anabaena circinalis *y* Anabaenopsis circularis *y E)* Anabaena *sp. En cada diagrama la barra representa 10 µm.*

(prueba de Bartlett) por lo cual fueron considerados non-paramétricos y evaluados con una prueba de Kruskal-Wallis. Cuando se encontraban diferencias significativas (p<0,05) entre las concentraciones de algas, se procedió a analizar dos por dos con la prueba U de Mann-Whitney para diferenciarlas.

Resultados y discusión

Muchas floraciones de cianobacterias son completamente inofensivas pero algunas pueden causar episodios tóxicos (Silke y Jackson 1993). Ocasionalmente, cianobacterias tóxicas causan enfermedad y muerte en animales salvajes, domésticos y el hombre (Paerl 1988; Dow y Swoboda 2000). Aunque dichas toxinas parecen ser más toxicas para mamíferos que para organismos acuáticos, varios experimentos han demostrado que afectan a animales acuáticos incluyendo crustáceos y estadios larvarios en peces (Dow y Swoboda 2000). En algunos casos, la simple identificación de una especie de alga o cianobacteria no es suficiente para determinar su toxicidad ya que cepas con diferente toxicidad pueden pertenecer a la misma especie. En consecuencia, para determinar si la especie identificada contiene cepas tóxicas, se debe caracterizar la toxicidad a través de un bioensayo.

Después de cuatro días de exposición a los filtrados con reposición diaria del 80% para simular una producción continua de las toxinas, la supervivencia promedio de las larvas en cada tratamiento osciló entre 75 y 93% (Tabla 1). Estos resultados no son diferentes a los controles que tuvieron supervivencia promedio entre 85 y 100%. Con base a estos resultados se rechazó la hipótesis de una producción activa de toxina bajo las condiciones del bioensayo por parte de las cepas de cianobacterias aisladas. Sin embargo, varios estudios demostraron que taxones de *Anabaena* y *Oscillatoria* pueden producir cianotoxinas y ser causantes de mortalidades en piscinas acuícolas (Sevrin-Reyssac y Pletikosic 1990; Dow y Swoboda 2000). Una mortalidad masiva de langosta (*Pacifastarus leniusculos*) en el sur de Suecia coincidió con un florecimiento de *Oscillatoria sancta* y muestras de agua analizadas (oxígeno disuelto, amonio y nitrito) no revelaron niveles letales para la langosta (Liras *et al*. 1998). Florecimiento de cianobacterias de la familia de las Oscillatoriales, con predominancia de *Oscillatoria corakiana* (240 a 360 filamentos/ml) y presencia de *Spirulina* sp., *Lyngbya* sp., y *Nodularia* sp., coincidieron con mortalidades de *Penaeus monodon* en estanques de cultivo en Australia (Smith 1996). Probablemente, toxinas solubles en agua y liberadas en concentraciones sub-letales causaron el debilitamiento del camarón haciéndolo propenso a infecciones bacteriales y ocasionándole su muerte como efecto secundario (Smith 1996).

	FILTRADO (10.000 fil/mL)	CONTROL
O. angustissima	$75^a \pm 13$	$95^a \pm 7$
O. brevis*	$93^a \pm 10$	$95^a \pm 7$
O. brevis	$90^a \pm 8$	
O. subtilissima	$80^a \pm 8$	$85^a \pm 7$
A. circinalis y A. circularis	$93^a \pm 10$	90^a
Anabaena sp.	$85^a \pm 13$	$100^a \pm 0$

Tabla 1. *Porcentaje de sobrevivencia de larvas de L. vannamei (promedio ± desviación estándar de cuatro réplicas) después de 4 días de exposición a un filtrado del cultivo de las cianobacterias aisladas. Se incluye un control (2 réplicas) para larvas no sometidas a los filtrados de algas. Promedios con letra diferente indican diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos (Prueba U de Mann Whitney).*

A diferencia de los resultados con los filtrados, la presencia de filamentos de *O. brevis* redujo la sobrevivencia de larvas de *L. vannamei* después de 15 días de exposición (p = 0,0374 para *O. brevis** y p = 0,0073 para *O. brevis*; Tabla 2). Para la cepa asociada con producción del compuesto lodo-tierroso, la mortalidad más alta fue asociada con los tratamientos 100 y 10.000 filamentos por ml, llegando a una sobrevivencia final promedio de 20 y 38%, respectivamente. Para la segunda cepa, la sobrevivencia disminuye en relación con el incremento en concentración de los filamentos, llegando sin sobreviviente en el tratamiento 10.000 filamentos/ml. No se encontraron efectos significativos con las demás cianobacterias para las cuales la sobrevivencia promedio al final del ensayo osciló entre 43 y 90%, comparable a los controles (Tabla 2).

Con la excepción de las dos cepas de *O. brevis*, los conteos de filamentos en las botellas controles incrementaron. Este crecimiento fue exponencial para *O. angustissima*, *O. subtilissima* y *Anabaena* sp., apoyando la observación de un crecimiento rápido durante la fase de preparación de los cultivos. Sin embargo, en las botellas con camarones la biomasa de estas mismas algas bajó indicando una ingestión de las algas por las larvas. Esta ingestión no fue asociada con mortalidad (Tabla 2) y en el caso particular de *O. angustissima* resultó

	100 fil/mL	1.000 fil/mL	10.000 fil/mL	CONTROL
O. angustissima	$43^a \pm 13$	$76^a \pm 19$	$63^a \pm 22$	70^a
O. brevis*	$20^c \pm 0$	$55^b \pm 6$	$38^{b,c} \pm 26$	$90^a \pm 0$
O. brevis	$43^b \pm 12$	$5^c \pm 10$	0^c	$87^a \pm 12$
O. subtilissima	$73^a \pm 68$	$53^a \pm 29$	$63^a \pm 15$	$95^a \pm 7$
A. circinalis y A. circularis	$75^a \pm 17$	$65^a \pm 13$	$90^a \pm 10$	90^a
Anabaena sp.	$80^a \pm 22$	$80^a \pm 20$	$83^a \pm 15$	$90^a \pm 14$

Tabla 2. *Porcentaje de sobrevivencia de larvas de L. vannamei (promedio ± desviación estándar de cuatro réplicas) después de 15 días de exposición a las cianobacterias aisladas. Se incluye un control (2 réplicas) para larvas no sometidas a las cianobacterias. Promedios con letra diferente indican diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos (Pruebas de Kurskal-Wallis y U de Mann Whitney).*

en un incremento estadísticamente mayor del peso las larvas en comparación con el control (p = 0,0337, Prueba de Kruskal-Wallis). Las botellas control para la mezcla de *A. circinalis* y *A. circularis* mantuvieron las concentraciones iniciales durante todo el bioensayo demostrando un crecimiento lento. Debido a esta baja tasa de crecimiento, la concentración de los filamentos no se mantuvo frente a la predación de las larvas y el conteo final fue drásticamente más bajo que al inicio del bioensayo.

Para las dos cepas de *O. brevis* se observó una disminución del número de filamentos después de los 15 días en las botellas sin larvas. Esta disminución en el agua se justifica por la presencia de un crecimiento bentónico de esta alga en las paredes y el fondo de las botellas. *O. brevis* está descrita como una alga que se presenta principalmente en forma de masa en la columna de agua o que puede encontrarse en la parte superficial de los sedimentos (Cocke 1967). Aunque no se considera como alga bentónica, su crecimiento está favorecido por la presencia de un substrato. La disminución de los conteos fue aún mayor bajo la presencia de las larvas de camarón. Al revisar las larvas al final del ensayo se encontró el tracto digestivo lleno y adherencia de filamentos de *O. brevis* en el rostro, las branquias y los apéndices de la boca. La hipótesis es que esta presencia de los filamentos de *O. brevis* interfiere con la ingestión del alimento comercial causando debilitamiento de las larvas. Varios estudios demostraron un efecto similar sobre el zooplancton donde el tamaño y la forma que presentan los filamentos de las cianobacterias interfieren fuertemente en el filtrado, reduciendo las posibilidades de recoger alimento (Haney 1987; Lampert 1987; Bernardi y Guissani 1990). Beveridge *et al*. (1993) demostraron que la presencia de cianobacterias decrece el consumo de alimento de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Además de la interferencia mecánica con la alimentación, la presencia de los filamentos en el tracto digestivo podría ocasionar necrosis o daño facilitando una infección bacteriana (Lightner 1978; Smith 1996).

Durante las últimas décadas, se ha intentado desarrollar métodos prácticos para controlar el florecimiento de cianobacterias. Las investigaciones han estudiado el uso de herbicidas, adición de metales o quelatos, turbulencia artificial, introducción de virus específicos o uso de la predación selectiva del zooplancton o peces planctívoros. Desafortunadamente, muchos de estos métodos no son prácticos y pueden tener efectos colaterales sobre la ecología de las piscinas camaroneras. Los florecimientos de cianobacterias son el resultado de una complicada interacción entre condiciones hidrográficas, meteorológicas, biológicas y químicas pero sólo algunas se pueden controlar. Se recomienda monitorear la presencia de *O. brevis* para anticipar problemas de mal sabor e intentar mitigar potencial problema de interferencia mecánica sobre la alimentación del camarón.

Conclusiones

1. La identificación de los taxones presentes en las muestras tomadas para aislar las cianobacterias (datos no presentados) indica que taxones de cianobacterias responsables de episodios de toxicidad en otras partes del mundo o con toxicidad demostrada en estudios de laboratorio, pueden formar extensivos florecimientos en estanques de camarón con baja salinidad en el Golfo de Guayaquil.

2. Se aisló una cianobacteria relacionada con el problema de "sabor a choclo" y se la identificó como *Oscillatoria brevis*.

3. Las especies aisladas en este estudio no mostraron producción de toxinas bajo condiciones del bioensayo.

4. Se observó que *Oscillatoria brevis*, además de poder producir un compuesto lodo-tierroso, causa interferencia mecánica con la ingestión del alimento artificial a través de la adherencia de la misma en branquias y apéndices bucales de larvas.

Referencias

Bernardi, R., y G. Giussani. 1990. Are blue-green algae a suitable food for zooplankton? An overview. Hydrobiologia 200/201: 29-41

Beveridge, M.C.M., D.J. Baird, S.M. Rahmatullah, L.A. Lawton, K.A. Beattie, y G.A. Codd. 1993. Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypothalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. Journal of Fish Biology 43:901-907.

Boyd, C.E., y C.S. Tucker. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, EE.UU.

Claska, M.E., y J.J. Gilbert. 1998. The effect of temperature on the response of Daphnia to toxic cyanobacteria. Freshwater Biology 39:221-232.

Cocke, E. 1967. The Myxophyceae of North Carolina. Edwards Brothers, Inc., Michigan, EE.UU.

Dow, C.S., y U.K. Swoboda. 2000. Cyanotoxins. Páginas 613-632 in B.A. Whitton y M. Potts, editores. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, EE.UU.

Haney, J.F. 1987. Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 21:467-475.

Lampert, W. 1987. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 21:483-490.

Lightner, D.V. 1978. Possible toxic effects of the marine blue-green alga, *Spirulina subsalsa*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. Journal of Invertebrate Pathology 32:139-150.

Liras, V., M. Lindberg, P. Nyström, H. Annadotter, L.A. Lawton, y B. Graf. 1998. Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)? Freshwater Biology 39:233-242.

Paerl, H.W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. Limnology and Oceanography 33:823-847.

Paerl, H.W. 2000. Marine plankton. Páginas 121-148 in B.A. Whitton y M. Potts, editores. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, EE.UU.

Paerl, H.W., y C.S. Tucker. 1995. Ecology of blue-green algae in aquaculture ponds. World Aquaculture Society 26(2):109-131.

Philip, T.O., y G.J. Jones. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. Limnology and Oceanography 43(7):1604-1614.

Roset , J., S. Aguayo, y M.J.Muñoz. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. Revista de Toxicología 18:65-71

Servin-Reyssac, J., y M. Pletikosic. 1990. Cyanobacteria in fish ponds. Aquaculture 88:1-20.

Silke, J., y D. Jackson. 1993. Harmful and nuisance algal blooms in Irish coastal waters. International Council for the Exploration of the Sea, Biological Oceanography Committee. 11 pp.

Smith, P.T. 1996. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). Toxicon 24(4):857-869.