

Mortandades en Masa Producidas por Cianobacterias Tóxicas en el Parque Nacional de Doñana

Nieves Perdígones, Mónica Rouco, Fernando Marva,
Eduardo Costas y Victoria López-Rodas

*COVEMI. Control Veterinario de Microorganismos. Departamento de Producción Animal,
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040. Madrid.*

Resumen

La proliferación de cianobacterias productoras de toxinas en el agua es conocida mundialmente como posible causa de mortandades masivas en seres humanos, animales domésticos y fauna salvaje. El presente trabajo estudia la muerte repentina de 5.500 aves y 20 toneladas de peces en el Parque Natural de Doñana, mediante el análisis físico-químico y tóxico del agua, la detección de toxinas en cadáveres y bioensayos en ratón.

Introducción

Desde el establecimiento del Parque Nacional de Doñana en 1969 se han descrito hasta dieciocho mortandades masivas de aves acuáticas en sus marismas. Aunque el origen de la mayoría de estas muertes es todavía desconocido, en el 2001 se consiguió, por vez primera, relacionar la presencia de cianobacterias tóxicas en las aguas de Doñana con la muerte masiva de flamencos [1]. Desde entonces se han detectado otras dos mortandades en el Parque, una en Julio de 2004 y otra en Junio de 2005. En la primera, ocurrida en la laguna de los Ansares, murieron cientos de peces (carpas y lisas) y más de 5.500 aves de 47 especies distintas. En la segunda, ocurrida en el Caño de Guadiamar, murieron más de 20 toneladas de peces en apenas tres días. En ambas mortandades se pudo apreciar una coloración azul-verdosa del agua característica de la presencia de cianobacterias.

Puesto que más del 80% de las especies de aves acuáticas de toda Europa se encuentran representadas en el Parque Nacional de Doñana, resulta de gran importancia determinar la causa de estas muertes masivas. En este trabajo pretendemos determinar si las dos últimas mortandades en el Parque Nacional de Doñana pudieron ser causadas, al igual que la ocurrida en 2001, por cianobacterias tóxicas.

Material y métodos

Análisis de agua. Se tomaron muestras de agua en tubos Falcon de 50 mL de las áreas afectadas. Las muestras se transportaron refrigeradas en oscuridad hasta su análisis en el laboratorio. La determinación y cuantificación de cianobacterias en el agua se llevó a cabo mediante un microscopio invertido (Axiovert, Zeiss, Germany), utilizando cámaras de

sedimentación. También se llevó cabo un análisis físico-químico del agua "in situ" mediante una sonda multicanal (YSI 6802-CM) que registraba temperatura, conductividad, oxígeno, pH, nitritos, nitratos y clorofila. Para la determinación de toxinas se sonicó el agua mediante 3 pulsos de 20 segundos a 60 MHz (Vibracell™, Sonics & Materials INC., Danbury CT, USA) con el fin de romper las células. Posteriormente se eliminaron los restos sólidos en suspensión mediante centrifugación. El sobrenadante se utilizó para la determinación de microcistinas (Envirogard® Microcystins QuantiTube Test Kit, Newark, USA) en las mortandades de 2004 y para la determinación de saxitoxinas (Ridascreen® Fast Saxitoxin, Darmstadt, Alemania) en la mortandad de 2005. Se realizaron bioensayos en ratón con tres machos como control y otros tres de ensayo. A los ratones control se les inyectó intraperitonealmente suero fisiológico y a los utilizados para el ensayo 1 mL de preparado de las muestras de agua.

Análisis de cadáveres. Se recogieron cadáveres en las zonas afectadas y se realizó la necropsia en menos de 24 horas (en 2004 se recogieron cadáveres de peces, aves herbívoras y aves piscívoras (para más información buscar en [2]), mientras que en 2005 sólo se recogieron cadáveres de peces). Los hígados y ventrículos se almacenaron en congelación (-20° C) hasta el momento de ser analizados. Para extraer las toxinas de los ventrículos (buches) se realizó un lavado de los mismos con 2 mL de PBS. De esta mezcla se recogió 1 mL y se sonicó, para romper las células, con 3 pulsos de 20 segundos a 60 MHz (Vibra cell™ Sonics & Materials INC. Danbury CT, USA). Finalmente, las muestras se centrifugaron para eliminar los restos de células rotas en suspensión. Para la extracción de las toxinas de los hígados, se homogeneizaron alícuotas de 2,5g de hígado en PBS (Art Micra D1, Alemania). El homogenizado se sonicó (Vibra cell™ Sonics & Materials INC. Danbury CT, USA). Las muestras fueron centrifugadas para eliminar los restos celulares, y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de microcistinas (EnviroGard® Microcystins QuantiTube Test Kit, Newark, USA) y saxitoxinas (Ridascreen® Fast Saxitoxin, Darmstadt, Alemania).

Resultados

Mortandad Julio 2004. Las muestras de agua recogidas en el lucio de los Ánsares contenían distintas especies de cianobacterias, siendo la más abundante *Microcystis aeruginosa* (hasta 62.000 colonias mL⁻¹). La toxicidad registrada en el agua alcanzó 15,3 µg mL⁻¹ de microcistina LR equivalente. Durante la necropsia de los cadáveres se observó equimosis hepática y presencia de cianobacterias en los ventrículos en una concentración superior 10⁶ colonias mL⁻¹. El análisis de microcistinas reveló que la concentración de toxina en el hígado de todos los animales variaba entre 25,7 y 75,9 µg mL⁻¹, mientras que en los ventrículos excedía de los 120 µg mL⁻¹. En los bioensayos realizados, todos los ratones problema murieron en menos de 24 horas, mientras los controles permanecían vivos.

Mortandad Junio 2005. El agua de Caño de Guadiamar presentaba una concentración de 88.880 colonias mL⁻¹ de *Anabaena circinalis*. El análisis físico químico del agua “in situ” evidenció que su temperatura era de 31° C, la concentración de clorofila de 106 µg L⁻¹, pH de 8,86 y la concentración de NO₃⁻ de 286,7 µg L⁻¹. La concentración de saxitoxina detectada en el agua era de 492 µg L⁻¹. La concentración de saxitoxina en hígado de los peces se estimó en 1057 µg Kg⁻¹. En el bioensayo con ratones todos los animales murieron rápidamente con signos de PSP.

Discusión

En Julio 2004 se observó una capa opaca verde-azulada en la superficie del agua de la laguna de los Ánsares. En poco tiempo aparecieron muertos en la misma zona cientos de peces (fundamentalmente carpas y lisas) y miles de aves. Esta mortandad en masa acabó a principios de Agosto tras afectar a más de 5.500 aves de 47 especies distintas (Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales, Estación Biológica de Doñana, CSIC), entre las que se encontraban especies en peligro de extinción como *Marmaronetta angustirostris* y *Oxyura leucocephala*.

La extrema abundancia de cianobacterias como *Microcystis aeruginosa* y *Pseudanabaena catenata* en el agua, así como la distribución espacio-temporal del patrón de mortalidad, presumía que la causa de esta catástrofe natural era una intoxicación por cianobacterias tóxicas. Las cianotoxinas que pueden generar las dos especies encontradas en el agua son hepatotoxinas y neurotoxinas. Las microcistinas (hepatotoxinas) provocan la desestructuración del citoesqueleto hepático, lo cual implica la aparición de hemorragias intrahepáticas [3,4,5,6,7,8]. Los resultados de las necropsias practicadas (hemorragias hepáticas) eran compatibles con la intoxicación por hepatotoxinas. Puesto que la cantidad de microcistina acumulada en el hígado de los cadáveres, previamente absorbida por el intestino, era suficientemente alta para provocar la muerte de los animales, y el bioensayo con ratón resultó positivo, podemos concluir que la intoxicación por microcistinas fue la causa de la mortandad de 2004.

El proceso de intoxicación que produjo las mortandades masivas podría resumirse en los siguientes acontecimientos: en Junio de 2004 hubo una proliferación importante de cianobacterias que produjeron microcistina. Ésta se acumuló en el zooplancton, en invertebrados acuáticos y en los peces herbívoros exponiendo a sus depredadores (limícolas y aves piscívoras) a la acción de las toxinas. Las anátidas ingirieron directamente gran cantidad de cianobacterias (se encontraron en los ventrículos más de 10⁵ colonias mL⁻¹ de *M. aeruginosa*) y murieron tras su consumo. Como se esperaba, se detectó una cantidad muy elevada de microcistina en las muestras de hígado de todas las aves analizadas, confirmando el paso de la toxina a través de la cadena trófica. Sin embargo no todas las especies se vieron afectadas de la misma manera puesto que, mientras los consumidores directos de algas murieron de forma aguda (presentaban una buena condición corporal), las aves piscívoras murieron tras un proceso mas lento

(presentaban una mala condición corporal). Si se consumen microcistinas a elevadas dosis, es de esperar que la muerte de los animales se produzca de forma rápida, encontrando cadáveres con una buena condición corporal, como las anátidas necropsiadas. Por el contrario, si la cantidad de toxina que se ingiere es menor, los daños hepáticos se manifiestan de forma progresiva a medida que ésta se va acumulando, por lo que el animal puede sufrir una pérdida de peso significativa antes de morir, que es probablemente lo que ocurrió con las limícolas encontradas, muy delgadas pero con elevadas concentraciones de microcistina en el hígado.

En la mortandad de Junio de 2005, veinte toneladas de peces murieron en el Caño de Guadiamar en tan sólo tres días. En esta ocasión la coloración del agua también era azul-verdosa y espesa en superficie, puesto que las condiciones físico-químicas del agua eran muy apropiadas para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos del plancton. Se detectaron abundantes colonias de *Anabaena circinalis*, especie productora de neurotoxinas y hepatotoxinas. En este caso no se procedió al estudio de las necropsias ya que la velocidad de autólisis de los órganos de los peces es muy rápida y no los permite valorar [9]. Los síntomas de los ratones bioensayados (incoordinación motora, letargia y parálisis), eran compatibles con los producidos por saxitoxinas. Teniendo en cuenta que la LD₅₀ oral de PSP, oscila entre 128 µg Kg⁻¹ de peso vivo para las cobayas y los 420 µg Kg⁻¹ de peso vivo para los ratones (revisado por [10]) y que los niveles máximos permitidos para el consumo de moluscos en España son de 80µg/100g [11], parece evidente que la muerte de los peces se debió a la ingestión masiva de esta toxina.

En el curso de la mortandad de peces de Junio de 2005, producida por saxitoxinas, no se encontraron aves muertas, si bien se vieron agrupaciones de milanos negros (*Milvus migrans*) y cigüeñas blancas (*Ciconia ciconia*) comiendo de los restos de peces muertos. El que no se encontraran cadáveres de aves no indica que estas no murieran o no se vieran afectadas por las toxinas ingeridas, ya que las aves son capaces de desplazarse varios kilómetros en poco tiempo y pueden comer en áreas muy distantes de los lugares donde pudieran quedar postradas o muertas [12].

Conclusiones

1. La mortandad de peces y aves en 2004 se produjo como consecuencia de la proliferación en las aguas del Parque Nacional de Doñana de cianobacterias tóxicas de la especie *Microcystis aeruginosa*.
2. La intoxicación por microcistinas afectó a toda la cadena trófica, desde el zooplancton hasta aves piscívoras.
3. La mortandad de peces en 2005 se produjo como consecuencia de la proliferación en las aguas del Parque Nacional de Doñana de cianobacterias tóxicas de la especie *Anabaena circinalis*.

4. Las proliferaciones masivas de cianobacterias tóxicas en el agua de Doñana parecen ser un hecho recurrente que podría explicar muchas otras mortandades masivas ocurridas anteriormente.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CGL2004-02701/HID del Ministerio de Educación y Ciencia, CGL2005-01938/BOS, Parques Nacionales 093/2003, Comunidad de Madrid P05-RNM-00935 y beca DOÑANA-2005.

Referencias

- [1] Alonso-Andicoberry, C., L. García-Villada, V. López-Rodas, E. Costas. 2002. Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *Veterinary Record*. 151:706-707.
- [2] López-Rodas, V., E. Maneiro, M. P. Lanzarot, N. Perdigones, E. Costas. En prensa. Cyanobacteria cause mass mortality of wildlife in Doñana National Park, *Veterinary Record*.
- [3] Runnegar, M.T., S. King, N. Berndt. 1993. Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *Am. J. Physiol.* 265:224-230.
- [4] Bischoff, K. 2001. The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. *Vet. Hum. Toxicol.* 43:294-297.
- [5] Malbrouck, C., G. Trausch, P. Devos, P. Kestemont. 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus*. L. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol Pharmacol.* 135:39-48.
- [6] Gehringer, M.M. 2004. Microcystin LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response, *FEBS Lett.* 16. 557:1-8
- [7] Wiegand, C., S. Pflugmacher. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203:201-18.
- [8] Huynh-Delerme, C., M. Edery, H. Huet, S. Puiseux-Dao, C. Bernard, J.J. Fontaine, F. Crespeau, A. de Luze. 2005. Microcystin -LR and embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems. *Toxicol.* 46:16-23.
- [9] Noga, E.J. 2000. Fish disease: Diagnosis and treatment. Ames IA: Iowa State Press.
- [10] Kuiper-Goodman, T., I. Falconer, J. Fitzgerald. 1999. Chapter 4. En: Chorus, I., J. Bartram (Eds). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Routledge. London.
- [11] Decreto 116/1995, del 31 de Marzo, Consejería de la Presidencia y Administración Pública de Galicia.
- [12] Shumway, S.E., S.M. Allen, P.D. Boersma. 2003. Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported victims?. *Harmful algae.* 2:1-17.