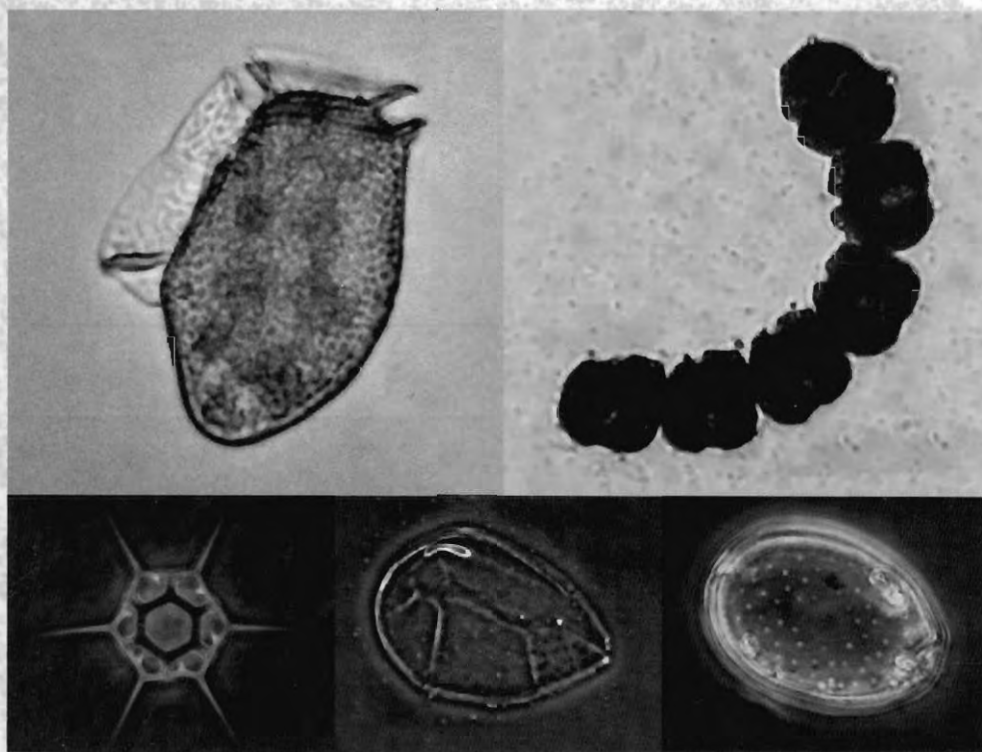


55/00

CONGRESOS Y JORNADAS

VI REUNIÓN IBÉRICA SOBRE FITOPLANCTON TÓXICO Y BIOTOXINAS



ACTAS DE LA REUNIÓN
Sevilla, 5 y 7 de mayo de 1999

COMUNIDAD EUROPEA



Consejería de Agricultura y Pesca

**VI REUNION IBÉRICA SOBRE
FITOPLACTON TÓXICO Y
BIOTOXINAS**

ACTAS DE LA REUNIÓN
Sevilla, 5-7 de Mayo de 1999

Título: VI REUNIÓN IBERICA SOBRE FITOPLACTON TÓXICO Y BIOTOXINAS.
Edita: ©JUNTA DE ANDALUCÍA. Consejería de Agricultura y Pesca.
Publica: **Viceconsejería.** Servicio de Publicaciones y Divulgación.
Coordina: Idefonso Márquez Pascual. Dirección General de Pesca y Acuicultura.
Servicio de Ordenación de Recursos Pesqueros.
Colección: Congresos y Jornadas Nº 55/00

I.S.B.N.: 84-89802-88-2
Depósito Legal: SE. 2.237 - 2000
Fotocomposición e Impresión: J. de Haro Artes Gráficas, S.L. Parque Ind. P.I.S.A.
Mairena del Aljarafe • Sevilla

INDICE

PRESENTACIÓN	11
ORDEN DE SESIONES	13
RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES	17
<i>Programa de control de fitoplancton tóxico y biotoxinas en Andalucía.</i> Márquez, I.; Aguilar, M.; Marco, J.J.; Mamán, L.; Fernández, L. y Ocaña, A.	17
<i>El sistema de control de episodios tóxicos de Galicia: Predicción y gestión de la advección de una floración de Dinophysis acuminata.</i> Maneiro, J.; Arévalo, F.; Bermúdez de la Puente, M.; Salgado, C.; Moroño, A. y Pazos, Y.	29
<i>Seguimiento de fitoplancton tóxico en la costa de Andalucía. Incidencias durante los años 1997 y 1998.</i> Mamán, L.; Fernández, L.; Ocaña, A.; Marco, J.J.; Morales, J.; Caballos, M.; Márquez, I. y Aguilar, M.	41
<i>Seguimiento del fitoplancton tóxico en las bahías del delta del Ebro en los años 1997 y 1998.</i> Delgado, M.; Santmarti, M.; Vila, M.; Garcés, E. y Camp, J.	51
<i>Evolución de fitoplancton tóxico y condiciones oceanográficas asociadas, en los años 97-98, en las Rías Gallegas.</i> Moroño, A.; Pazos, Y. y Maneiro, J.	59
<i>Seguimiento del fitoplacton tóxico en la zona de bateas del puerto de Valencia, período 1993-1998.</i> Gomis, C.; González, M. y Alcober, J.	67
<i>Episodios tóxicos detectados en las Rías Gallegas durante los años 1997 y 1998: resultados y evolución.</i> Bermúdez de la Puente, M.; Salgado, C. y Arévalo, F.	73
<i>Monitorização de toxinas diarreicas no algarve em 1998.</i> Vale, P.; Sampayo, M.A.M.; Rodrigues, S.; Botelho, M.J.; Pinto, A.P. y Gómes, S.	83
<i>Monitorização de toxinas amnésicas na costa portuguesa em 1998.</i> Pinto, A.P.; Sampayo, M.A.M. Botelho, M.J.; Vale, P.; Rodrigues, S. y Gómes, S.	89

<i>El muestreo de puertos en la costa catalana: resultados de seguimiento de fitoplancton nocivos (95-98) y el caso concreto de Alexandrium catenella.</i>	
Vila, M.; Delgado, M.; Garcés, E.; Camp, J. y Furones, D.	93
<i>Seguimiento y control de biotoxinas marinas en moluscos procedentes de centros de depuración.</i>	
Lozano, A.B.; Martínez, J.; Hernández, G.; Álvarez, E.M. y Castroman, B.	101
<i>Ocorrência de cianobactérias e microcistinas em águas doces superficiais, nos anos de 1996-98, nas regiões do centro e sul de Portugal.</i>	
Pereira, P.; Tavares, M.J.; Vasconcelos, V. y Franca, S	109
<i>Ensayos de desintoxicación de PSP en el corruco (Acanthocardia tuberculata).</i>	
Ocaña, A.; Moreno, O.; Santamaría, M. y Mamán, L.	119
<i>Toxinología y contenido tóxico de Dinophysis acuta, D. caudata y D. acuminata de las Rías Bajas Gallegas.</i>	
Fernández, M.L.; Reguera, B.; Ramilo, I. Y Martínez, A.	127
<i>Novos resultados sobre estudos de toxicidade PSP em dinoflagelados e bactérias associadas.</i>	
Pereira, P.; Andrinolo, D.; Sam-Bento, F.; Alvito, P.; Martins, C. y Franca, S.	139
<i>Estudio sobre la toxicidad de Haliotis tuberculata. Hipótesis sobre su posible origen.</i>	
Bravo, I.; Franco, J.M.; Molist, P.; Lastres, M.; Alonso, A. y Zapata, M.	149
<i>Efecto del ácido okadaico sobre la tasa de captación y metabolismo de la glucosa en células NHLF (Normal Human Lung Fibroblasts).</i>	
Leira, F.; Vieites, J.M.; Vieytes, M.R. y Botana, L.M.	155
<i>Contenido de ácido okadaico de las células de Dinophysis responsables de varios episodios tóxicos en las rías gallegas.</i>	
Blanco, J.; Pazos, Y.; Arévalo, F.; Salgado, C.; Bermúdez de la Puente, M.; Maneiro, J. y Moroño, A.	163
<i>Bioensayos DSP: sintomatología atípica en los ratones. Observaciones preliminares.</i>	
Salgado, C.; Arévalo, F.; Bermúdez de la Puente, M.; Pazos, Y.; Maneiro, J. y Moroño, A.	169
<i>Ensayos de desintoxicación de ASP en vieiras (Pecten spp.).</i>	
Fernández, L.; Marco, J.J.; Moreno, O. y Santamaría, M.	175
<i>Estudio comparativo de protocolos para cuantificación de ácido domoico.</i>	
Marco, J.J.; Fernández, L.; Márquez, I. y Aguilar, M.	183

<i>Avances en la determinación de biotoxinas por métodos químicos.</i>	
Gago, A.; Leão, J.M.; Piñero, N.; Carballal, E y Rodríguez, J.A.	189
<i>Control sanitario de toxinas marinas: acuerdos y actividades de la red de Laboratorios Europeos Nacionales de Referencia.</i>	
Míguez, A.; Fernández, L.; Cacho, E. y Martínez, A.	199
<i>Proliferación de Alexandrium minutum en el port d'andratx (Mallorca, Islas Baleares), relación con las variables físicas, químicas y biológicas.</i>	
Moyá, G.; Puigserver, M.; Sintes, E.; Ramon, G. y Martínez-Taberner, A.	207
<i>Actualización de los resultados de las proliferaciones del dinoflagelado Alexandrium taylori (Balech).</i>	
Garcés, E.; Masó, M.; Delgado, M.; Vila, M. y Camp, J.	215
<i>Descubrimiento de un nuevo parásito de la dinoflagelada tóxica Alexandrium catenella: aplicación en el control biológico de las proliferaciones nocivas de fitoplancton.</i>	
Delgado, M.	219
<i>Formación de una corriente S-N cerca de la costa W de la Península Ibérica al fin del verano. Relación con los blooms de G. catenatum de las Rías Gallegas.</i>	
Sordo, I.; Triñanes, J.A.; Varela, J. y Arias, J.	223
<i>Perfil de toxinas de Alexandrium catenella en el Mediterráneo.</i>	
Ávila, E.; Fraga, S. y Franco, J.	227
<i>Potencial implicación de las aguas de lastre en la introducción de especies tóxicas en aguas ibéricas.</i>	
Fraga, S.	231
<i>Evaluación de la estimación de concentraciones celulares de Dinophysis acuminata en muestras integradas.</i>	
Pazos, Y.; Maneiro, J.; Moroño, A. y Mariño, J.	233
<i>Variabilidad morfológica en Dinophysis caudata y su delimitación con Dinophysis diegensis.</i>	
Delgado, M.; Vila, M.; Garcés, E. y Camp, J.	241
<i>Distintos estadios del ciclo celular y del ciclo vital de Dinophysis caudata. Saville Kent y su relación con Dinophysis diegensis.</i>	
Reguera, B.; Ramilo, I. y Ávila, E.	249
<i>Variación en el patron de lectinas durante el ciclo celular de dinoflagelados.</i>	
González-Gil, S.; Fraga, S. y Aguilera, A.	263

<i>Efecto de diferentes medios de cultivos sobre el crecimiento de los dinoflagelados.</i> Álvarez, M.J.; Aguilera, A.; Franco, J.M.; Fraga, S. y González-Gil, S.	271
<i>Variación en la relación entre la fluorescencia "in vivo" y la clorofila "a" asociada a la dinámica oceanográfica.</i> Rodríguez, F.; Pazos, Y.; Moroño, A.; Maneiro, J.; Blanco, J. y Zapata, M.	281
<i>Nuevas problemáticas asociadas a proliferaciones fitoplanctónicas en la costa mediterránea.</i> Camp, J.; De Torres, M.; Masó, M. y Garces, E.	291
<i>El proyecto Harmful Algal Events Database. (HAEDAT)</i> Aguilera, A.	295
RESÚMENES DE LOS GRUPOS DE TRABAJO	301
Seguimiento del fitoplancton y actualización de la lista de especies tóxicas del litoral ibérico.	301
Estandarización de métodos e intercalibraciones para el análisis de biotoxinas.	305
LISTA DE PARTICIPANTES	307
ÍNDICE DE AUTORES	313

PRESENTACIÓN

PRESENTACIÓN

La VI Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas se celebró en la sede de la Consejería de Agricultura y Pesca en Sevilla entre el 5 y el 7 de mayo de 1.999, corriendo a cargo de la Dirección General de Pesca su organización y financiación, de acuerdo con el compromiso adquirido dos años antes en la V Reunión que se desarrolló en Vigo.

La Reunión contó con la asistencia de 55 participantes, presentándose un total de 38 comunicaciones orales, encuadradas fundamentalmente en tres áreas de trabajo: programas de seguimiento y control, toxinas y dinámica de poblaciones, ecología y oceanografía. Asimismo, se desarrollaron dos grupos de trabajo, uno sobre seguimiento del fitoplancton y actualización de la lista de especies tóxicas del litoral ibérico y otro sobre estandarización de métodos e intercalibraciones para el análisis de biotoxinas.

A pesar del incremento en el número de participantes, se ha intentado mantener el ambiente distendido que presidía las primeras Reuniones Ibéricas, lo que sin duda facilita el intercambio de información entre los profesionales que trabajan en este campo.

En estas Actas se recogen los resúmenes de las comunicaciones presentadas, las conclusiones de los grupos de trabajo desarrollados, que incluyen la actualización del listado de especies tóxicas del litoral ibérico y por último el listado de participantes.

Por ello, me complace presentar estas Actas que suponen el reflejo de una actitud de estrecha colaboración entre todos los investigadores y técnicos de la administración, que debe conducir a obtener un mayor conocimiento sobre el origen y desarrollo de los episodios tóxicos y un control más efectivo sobre sus consecuencias, que sin duda se verá incrementado en la próxima Reunión prevista para el año 2.001 en Alicante.

María Dolores Atienza Mantero
Directora General de Pesca y Acuicultura

VI REUNIÓN IBÉRICA SOBRE FITOPLAÑCTON TÓXICO Y BIOTOXINAS

ORDEN DE LAS SESIONES

DÍA 5 DE MAYO

08,30 - 09,30 Inscripción.

09,30 - 10,00 Inauguración.

10,00 - 11,00 **I. Programas de seguimiento y control.**

"Programa de control de fitoplancton tóxico y biotoxinas en Andalucía". I. Márquez, M. Aguilar, J.J. Marco, L. Mamán, L. Fernández y A. Ocaña.

"Sistema de control del CCCMM: aplicación a un caso real de un episodio de *Dinophysis acuminata*". J. Maneiro, Y. Pazos, A. Moroño, C. Salgado, M. Bermúdez de la Puente y F. Arévalo.

"Seguimiento de fitoplancton tóxico en la costa de Andalucía. Incidencias durante los años 1997 y 1998". L. Mamán, L. Fernández, A. Ocaña, J.J. Marco, J. Morales, M. Caballos, I. Márquez y M. Aguilar.

11,00 - 11,30 Pausa para café

11,30 - 14,00 "Seguimiento del fitoplancton tóxico en las bahías del delta del Ebro en los años 1997 y 1998". M. Delgado, M. Santmarti, M. Vila, E. Garcés y J. Camp.

"Evolución de fitoplancton tóxico y condiciones oceanográficas asociadas, en los años 97-98, en las Rías Gallegas". A. Moroño, Y. Pazos y J. Maneiro.

"Distribución temporal de las poblaciones fitoplanctónicas en la zona de producción mejillonera del puerto de Valencia desde el año 1993 hasta 1998". C. Gomis y M. González.

"Episodios tóxicos detectados en las Rías Gallegas durante los años 1997 y 1998: resultados y evolución". M. Bermúdez de la Puente, C. Salgado y F. Arévalo.

"DSP no Algarve 1998". P. Vale, M.A.M. Sampayo, S. Rodrigues, A.P. Pinto, M.J. Botelho y S. Gomes.

14,00 - 16,00 Comida

16,00 - 17,45 "ASP em Portugal 1998". P. Vale, M.A.M. Sampayo, A.P. Pinto, M.J. Botelho y S. Gomes.

"El muestreo de puertos en la costa catalana: resultados de seguimiento de fitoplancton nocivos (95-98) y el caso concreto de *Alexandrium catenella*". M. Vila, M. Delgado, E. Garcés, J. Camp y D. Furones.

"Seguimiento y control de biotoxinas marinas en moluscos procedentes de

J. Blanco y M. Zapata.

"Nuevas problemáticas asociadas a proliferaciones fitoplanctónicas en la costa mediterránea". J. Camp, M. De Torres, M. Masó y E. Garcés.

IV. Organización internacional

"El proyecto HAEDAT (Harmful Algal Events Database)". A. Aguilera.

14,00

Clausura.

PROGRAMA DE CONTROL DE FITOPLANCTON TÓXICO Y BIOTOXINAS EN ANDALUCÍA

I. Márquez ¹, M. Aguilar ², J.J. Marco ², L. Mamán ², L. Fernández ² y A. Ocaña ²

¹ Dirección General de Pesca. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.

² Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía (D.a.p).

INTRODUCCIÓN

La Junta de Andalucía cuenta con competencias exclusivas en materia de marisqueo, y dentro de la misma corresponde a la Consejería de Agricultura y Pesca efectuar el control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las zonas de producción de moluscos bivalvos, que se establece en la Directiva 91/492, por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos, mientras que la Consejería de Salud desarrolla un "Programa de vigilancia y control higiénico-sanitario" en las lonjas y centros de depuración, expedición y transformación. En este sentido, mediante la Orden de la Consejería de Agricultura y Pesca, de 15 de julio de 1993, se declararon las zonas de producción y protección o mejora de moluscos bivalvos, moluscos gasterópodos, tunicados y equinodermos marinos de la Comunidad Autónoma de Andalucía, la cual ha sido modificada en varias ocasiones, la última de ellas en diciembre de 1998, en lo relativo a la relación de zonas de producción. Esta última modificación va en la dirección de aumentar el número de zonas de producción, disminuyendo su tamaño, sin que suponga un incremento excesivo en el coste de control, habiendo pasado de 30 zonas en el año 1993 a las 44 actuales, de las cuales 33 están clasificadas como "Tipo A" y las 11 restantes como "Tipo B". (Mapas 1 a 5).

En Andalucía la práctica totalidad de la producción marisquera proviene de los bancos naturales que se distribuyen por todo el litoral, de donde es extraída por la flota de rastro remolcado, cuyo censo lo componen en la actualidad 446 embarcaciones, teniendo una importancia más reducida el marisqueo a pie y la acuicultura. La especie principal en valor de la producción es la chirla (*Chamelea gallina*), seguida del corruco (*Acanthocardia tuberculata*), la coquina (*Donax trunculus*) la almeja chocha (*Venerupis rhomboides*), la concha fina (*Callista chione*) y la vieira (*Pecten maximus*).

PROGRAMA DE CONTROL

Tras la declaración de las zonas de producción en el año 1994, se inició el programa de control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las mismas, aunque es a partir del 1 noviembre de 1996 cuando se habilita un laboratorio propio en el Centro de Investigación y Cultivo de Especies Marinas (CICEM) "Agua del Pino" en Huelva, encomendándole la ejecución

del mismo a la Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía, S.A. (D.a.p).

Inicialmente el programa se ha diseñado para cumplir con la exigencia legal establecida en la legislación antes citada, ya que los recursos económicos disponibles eran escasos y la investigación en este tema prácticamente inexistente en Andalucía. No obstante, en estos momentos se está produciendo un incremento de los Centros de Investigación y Universidades interesadas en trabajar en este campo, lo que augura que en un futuro próximo el programa de control sea el elemento que propicie y sirva de apoyo a diversas líneas de investigación.

El programa de vigilancia consta de un muestreo de control y un muestreo intensivo de las zonas de producción.

Muestreo de Control

El muestreo de control incluye por un lado muestreos sobre el agua para vigilar la variación del plancton tóxico y las condiciones oceanográficas en la zona, y por otro lado sobre los moluscos, en los que se controla la posible contaminación por biotoxinas (PSP, DSP y ASP).

Se han definido un total de 44 puntos de muestreo en las zonas de producción, los cuales pueden ser modificados en su localización dependiendo de los resultados del muestreo de control y la situación de los bancos naturales.

En cada punto de muestreo se extrae una muestra de agua y/o de la especie indicadora, las cuales se recogen en la Tabla 1, con la periodicidad que se especifica en la Tabla 2. En el caso de que fuera imposible la captura de la especie indicadora principal se efectúa la captura de la especie secundaria. A este respecto, es importante reseñar la variabilidad de especies que son muestreadas, lo que dificulta la realización de algunos controles analíticos, como sucede en los análisis de DSP en moluscos de pequeño tamaño como la coquina o la chirla.

NÚMERO DE ZONAS DE PRODUCCION	ESPECIE PRINCIPAL	
12	<i>Chamelea gallina</i>	<i>Chirla</i>
9	<i>Callista chione</i>	<i>Concha fina</i>
7	<i>Donax trunculus</i>	<i>Coquina</i>
5	<i>Ruditapes decussatus</i> ó <i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Almeja fina o japonesa</i>
3	<i>Venerupis rhomboides</i>	<i>Almeja chocha</i>
3	<i>Scrobicularia plana</i>	<i>Coquina de fango</i>
2	<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Berberecho</i>
2	<i>Paracentrotus lividus</i>	<i>Erizo de mar</i>
1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Mejillón</i>

Tabla 1.- Especies indicadoras en el muestreo de control

CONTROLES ANALÍTICOS	NÚMERO DE ZONAS DE PRODUCCIÓN	FRECUENCIA DE MUESTREO Y ANÁLISIS	TOTAL DE ANÁLISIS (44 puntos de muestreo)
EN AGUA			
PLANCTON TÓXICO	9	MENSUAL	1.548
	8	QUINCENAL	
	27	SEMANAL	
EN MOLUSCOS			
P.S.P.	30	TRIMESTRAL	644
	14	MENSUAL	
	9 vieira	MENSUAL	
	1 mejillón	MENSUAL	
	10 corruco	QUINCENAL	
D.S.P.	44	TRIMESTRAL	184
	1 mejillón	MENSUAL	
A.S.P.	44	TRIMESTRAL	280
	9 vieira	MENSUAL	

Tabla 2.- Frecuencia de muestreo y análisis

Paralelamente al muestreo de la especie indicadora se efectúa un seguimiento específico sobre otros moluscos especialmente sensibles a la contaminación por biotoxinas, tal y como sucede con el corruco que se captura quincenalmente en 10 zonas de producción para controlar los niveles de PSP, la vieira en 9 zonas donde se vigilan mensualmente PSP Y ASP y el mejillón en una zona donde también mensualmente se analizan PSP y DSP.

En los muestreos que implican recogida de moluscos se utilizan embarcaciones marisqueras de la zona, incluidas en el censo de rastro y provistas de los artes habituales en la misma. Existen cuatro equipos de muestreo, que se distribuyen a lo largo de las 44 zonas de producción. El transporte de la muestra hasta el laboratorio se lleva a cabo en cajas especiales, provistas de acumuladores de frío, lo que garantiza una adecuada conservación.

En resumen, entre las medidas in situ y los controles analíticos de laboratorio se obtiene información sobre los siguientes parámetros:

- Muestras de agua:
- Turbidez.

- Temperatura.
 - Salinidad.
 - Nutrientes: Amonio, nitritos, nitratos, fosfatos y silicatos.
 - Fitoplancton tóxico.
 - Fitoplancton acompañante.
-
- Muestras de moluscos:
 - PSP.
 - DSP.
 - ASP.

Muestreo intensivo

El muestreo intensivo se lleva a cabo en los puntos de muestreo de cualquier zona de producción en la que se detecten, en el muestreo de control, valores de algún parámetro por encima de los máximos admisibles. En este muestreo se incrementan las especies de moluscos controladas, así como la frecuencia y el número de puntos de muestreo.

TRANSMISIÓN DE DATOS Y ADOPCIÓN DE MEDIDAS PREVENTIVAS

Cabe destacar, que desde el año 1998 se ha informatizado todo el proceso, habiéndose creado un programa específico de gestión que abarca todos los aspectos del trabajo: planificación de los muestreos, registro de entrada en el laboratorio, boletines analíticos y transmisión de datos para su consulta.

Los resultados de los análisis se introducen en el programa informático y se transmiten vía Módem a la Dirección General de Pesca y a las Delegaciones Provinciales de la Consejería de Agricultura y Pesca, que por lo tanto disponen en tiempo real de toda la información necesaria para conocer la situación sanitaria de las zonas de producción, así como las previsiones de muestreo existentes o las muestras que se encuentran en el laboratorio pendientes de analizar. En el caso de que los resultados obtenidos tras los controles analíticos evidenciaran niveles superiores a los legalmente establecidos en alguno de los parámetros controlados, las Delegaciones Provinciales implicadas proceden al cierre temporal de la zona de producción afectada si la contaminación es generalizada en todos los moluscos, o bien se prohíbe la captura de una determinada especie cuando la contaminación es selectiva y solo incide sobre especies concretas. Las zonas cerradas vuelven a abrirse cuando se ha comprobado que la contaminación ha desaparecido, para lo cual deben obtenerse resultados dentro de los límites legales en al menos dos muestreos consecutivos.

RECURSOS HUMANOS Y PRESUPUESTO

Los recursos humanos empleados en el desarrollo del programa de control consisten en 7 Técnicos, 2 Oficiales de laboratorio y 4 Auxiliares de laboratorio, además de un Coordinador de los trabajos y un Director Facultativo (Figura 1).

El presupuesto total del programa de control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las zonas de producción y de la contaminación química en el Guadalquivir para el año 1999 supera los 121 millones de pesetas y su financiación corre a cargo íntegramente de la Junta de Andalucía. En este sentido, cabe destacar el incremento que ha sufrido el presupuesto desde el año 1995 hasta la actualidad, cercano al 100%, así como la intensificación en el control que se ha reflejado en un aumento considerable en el número de controles analíticos realizados

GRÁFICO 1.- EVOLUCIÓN DEL PRESUPUESTO

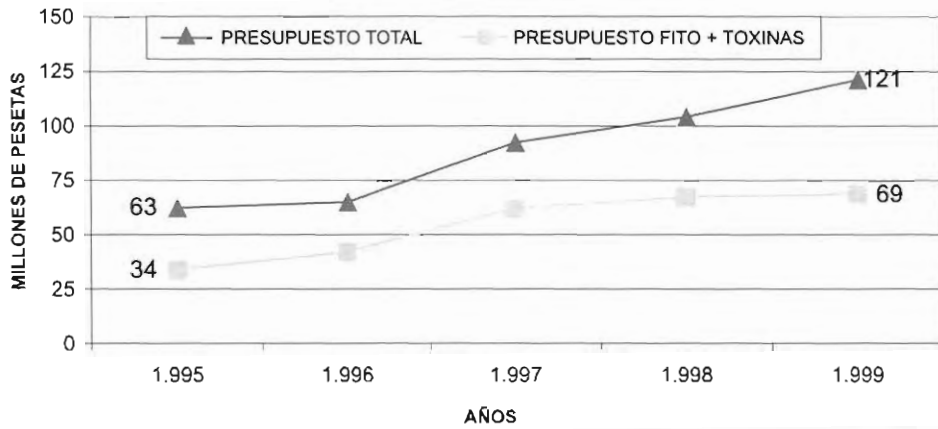
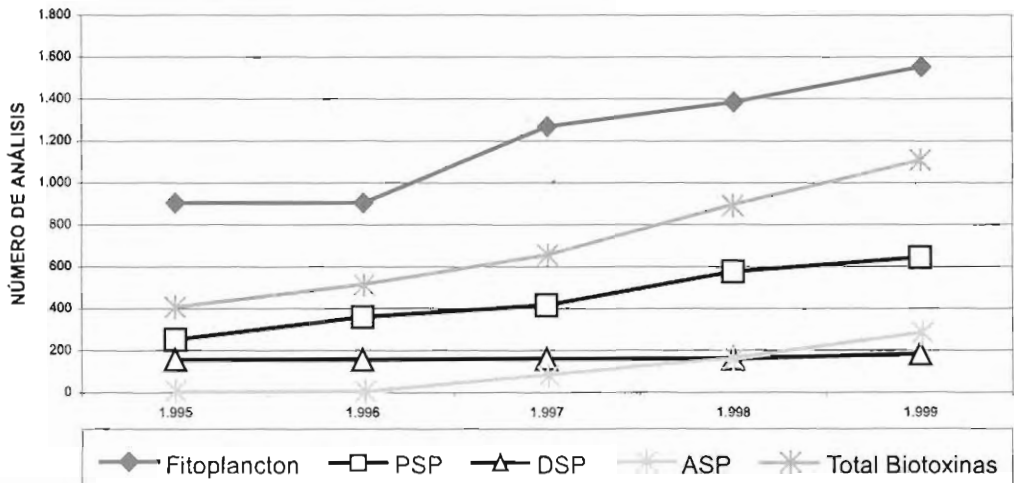


GRÁFICO 2.- EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE ANÁLISIS



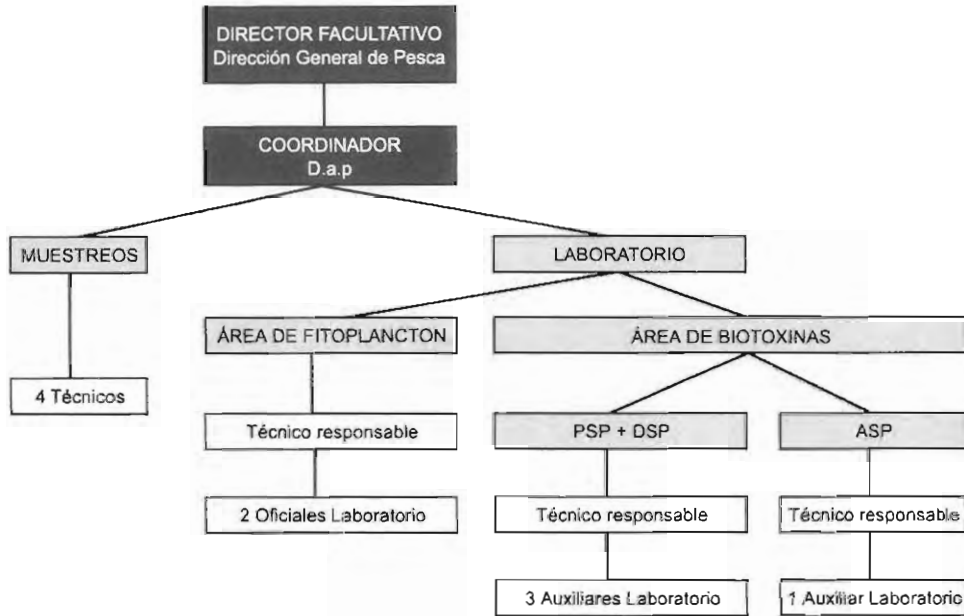
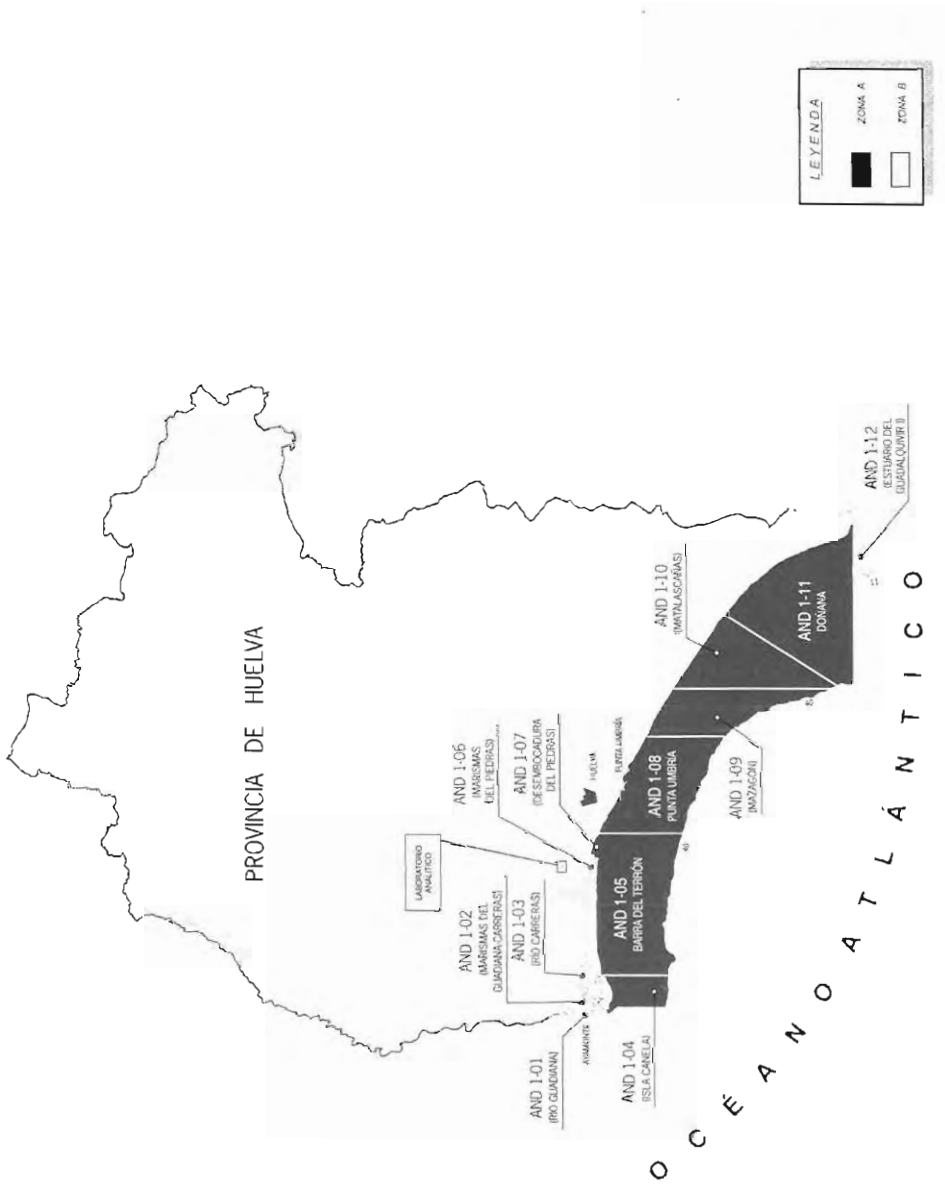
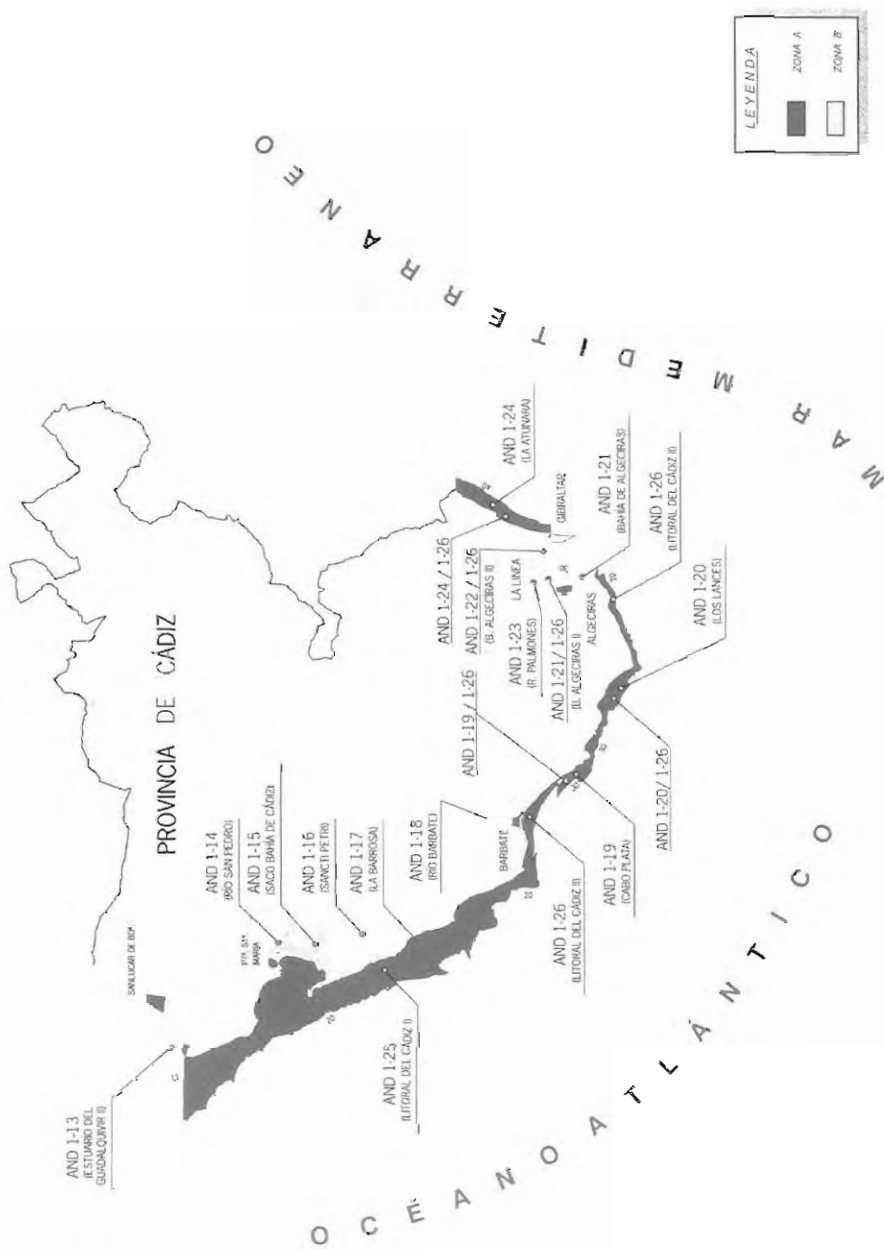


Figura 1.- Recursos Humanos.

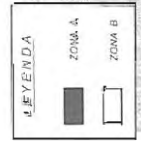
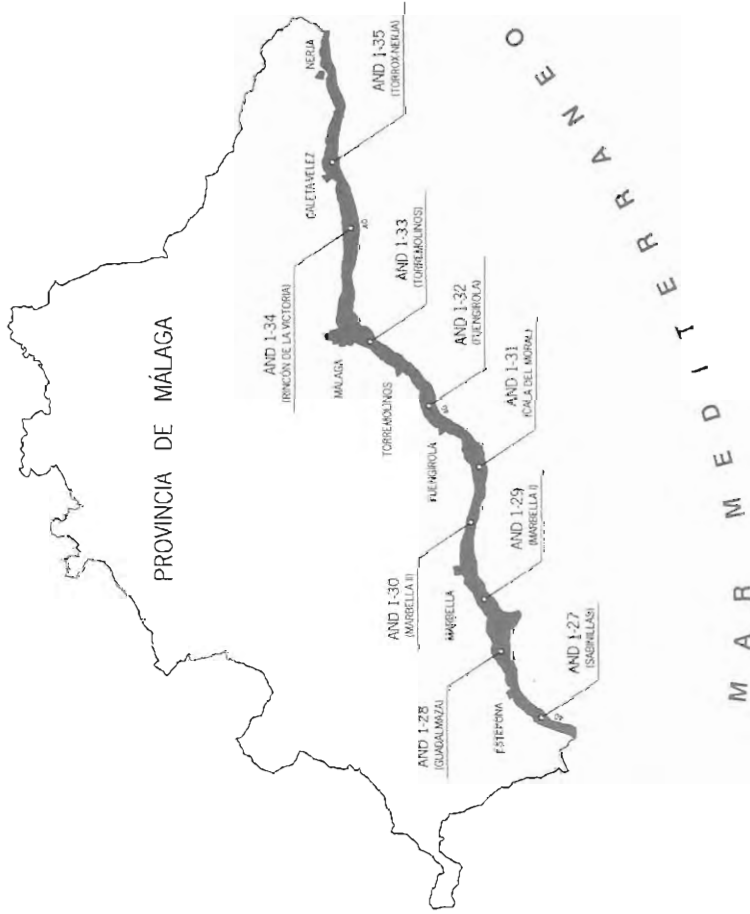
MAPA 1
ZONAS DE PRODUCCIÓN
MOLUSCOS BIVALVOS, MOLUSCOS GASTERÓPODOS, TUNICADOS Y EQUINODERMOS MARINOS



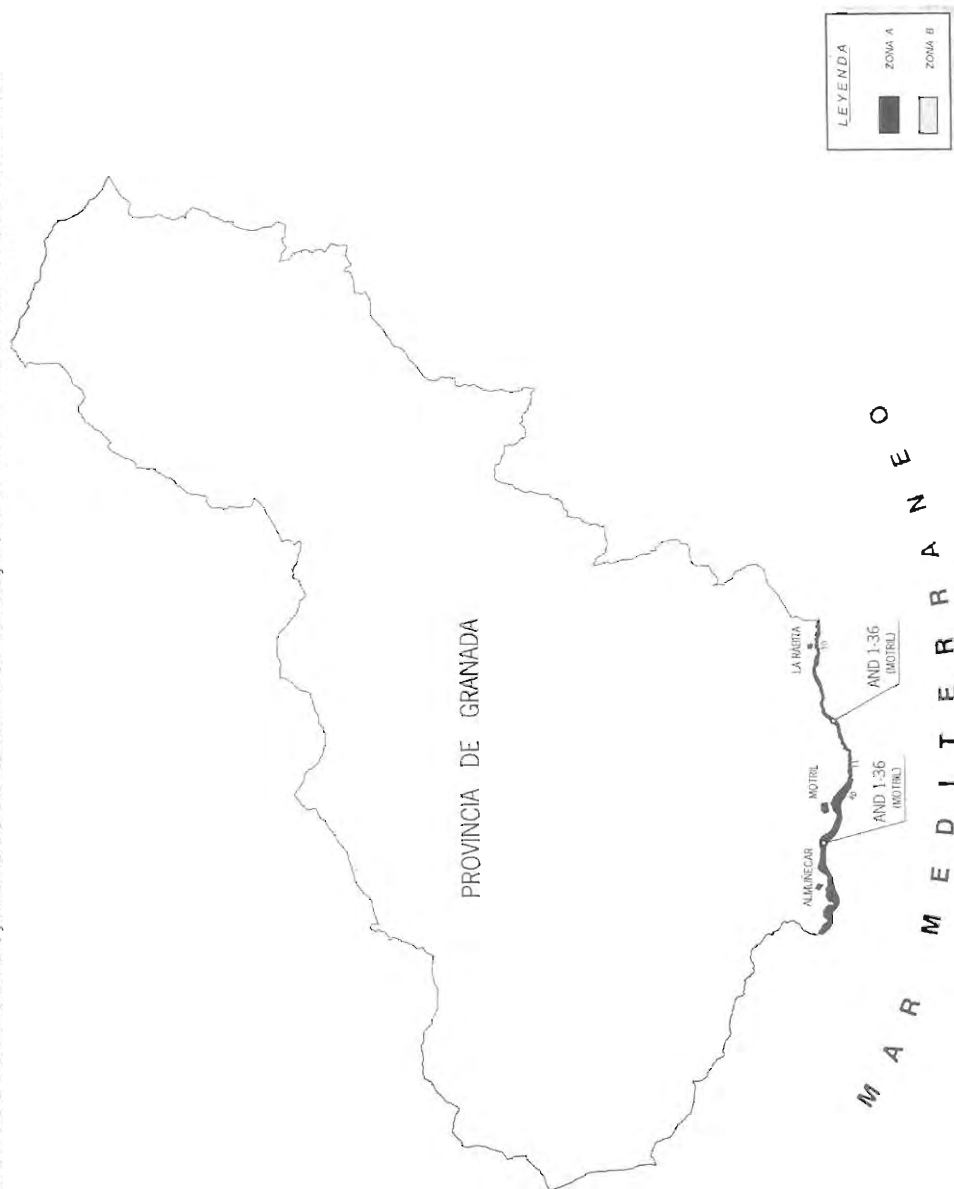
MAPA 2
ZONAS DE PRODUCCIÓN
MOLUSCOS BIVALVOS, MOLUSCOS GASTERÓPODOS, TUNICADOS Y EQUINODERMOS MARINOS



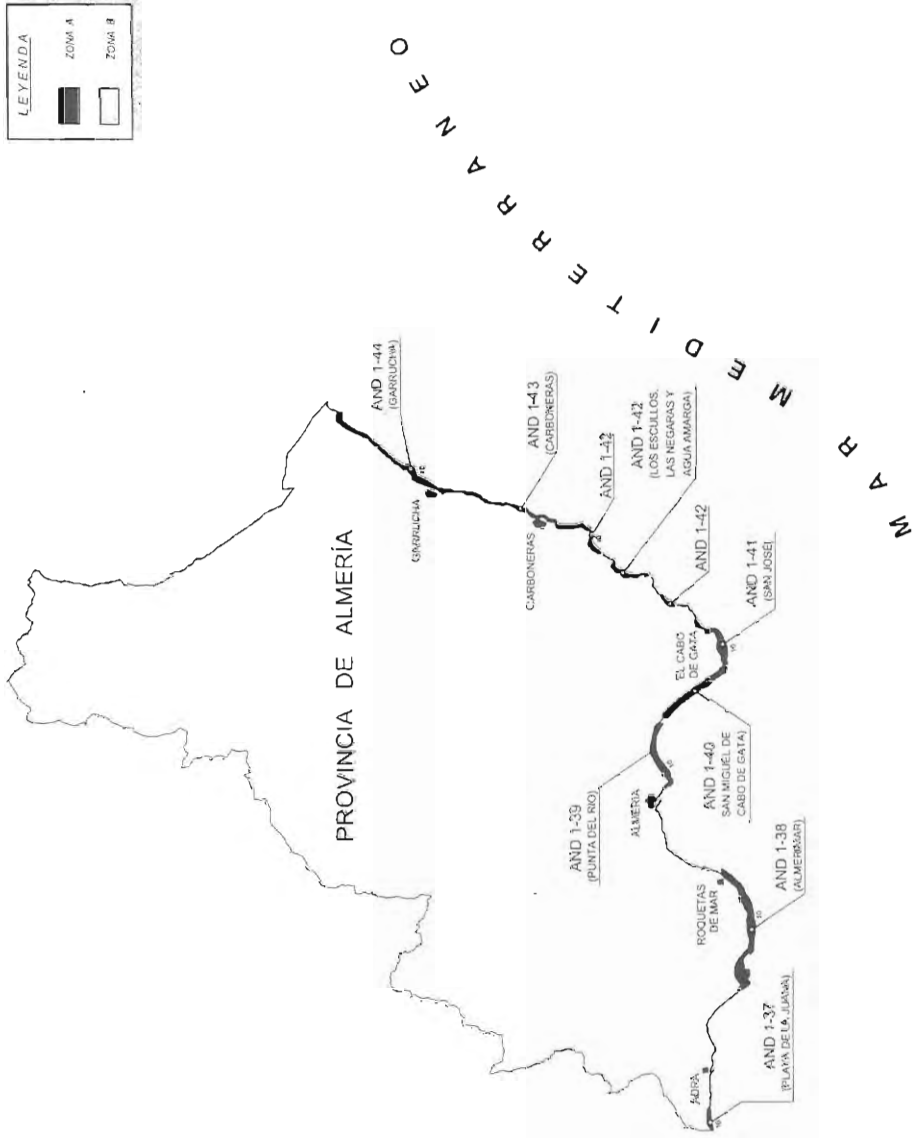
MAPA 3
ZONAS DE PRODUCCIÓN
MOLUSCOS BIVALVOS, MOLUSCOS GASTERÓPODOS, TUNICADOS Y EQUINODERMOS MARINOS



MAPA 4
ZONAS DE PRODUCCIÓN
MOLUSCOS BIVALVOS, MOLUSCOS GASTERÓPODOS, TUNICADOS Y EQUINODERMOS MARINOS



MAPA 5
ZONAS DE PRODUCCIÓN
MOLUSCOS BIVALVOS, MOLUSCOS GASTERÓPODOS, TUNICADOS Y EQUINODERMOS MARINOS



EL SISTEMA DE CONTROL DE EPISODIOS TÓXICOS DE GALICIA: PREDICCIÓN Y GESTIÓN DE LA ADVECCIÓN DE UNA FLORACIÓN DE *Dinophysis acuminata*

Maneiro, J.; Arévalo, F.; Bermúdez, M.; Salgado, C.; Moroño, A. y Pazos, Y.

Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. Peirao de Vilaxoán, s/n. 36611 - Vilagarcía de Arousa. Pontevedra.

INTRODUCCIÓN

El sector marisquero y acuicultor de Galicia tiene una enorme importancia socioeconómica para la Comunidad Autónoma, no sólo por el importante volumen de su producción sino también por la gran cantidad de población a la que permite desarrollar una actividad económica.

El mejillón de batea constituye el principal cultivo con una producción de más de 200.000 Tm/año, aunque también tiene gran importancia la explotación en semicultivo de otros moluscos como almejas, berberechos, vieiras y otras especies que dan trabajo directo a más de 10.000 personas.

Los episodios tóxicos de origen fitoplanctónico constituyen un fenómeno relativamente frecuente en las aguas de Galicia interfiriendo y alterando notablemente distintas fases de la estrategia de explotación desarrollada por el sector marisquero y acuicultor, fundamentalmente debido a las prohibiciones de extracción que es preciso establecer cuando los niveles de toxinas de origen fitoplanctónico acumuladas en los moluscos sobrepasan los límites legalmente establecidos.

El sistema de control y vigilancia de la presencia de floraciones fitoplanctónicas tóxicas, establecido en las zonas de producción de Galicia (Mariño *et al.*, 1998), tiene como finalidad fundamental la de salvaguardar la salud pública impidiendo que entren en el circuito comercial productos procedentes del marisqueo y la acuicultura cuyos niveles de toxicidad superen los legalmente establecidos; sin embargo, dada la enorme importancia socioeconómica que este sector representa para Galicia, el sistema de control se ha diseñado de tal manera que permita minimizar los efectos negativos que las prohibiciones de extracción provocan.

Para ello es fundamental abordar, cuando menos, el problema desde dos aspectos distintos:

- a) Predicción de la aparición de los episodios tóxicos. La predicción de un episodio

tóxico con suficiente antelación permite al sector la adopción de decisiones encaminadas a modificar su estrategia de explotación de tal forma que se minimicen en lo posible los efectos negativos.

- b) Minimización de sus efectos. Una vez desarrollado el episodio y, dado que en la actualidad no se conocen técnicas que, de una manera eficaz, permitan reducir o anular la acumulación de toxicidad fitoplanctónica por los moluscos, las medidas a tomar para reducir sus efectos pasan por evitar mantener las prohibiciones de extracción más tiempo del imprescindible necesario.

El Centro de Control da Calidade do Medio Mariño (CCCMM) es el organismo encargado de dar cumplimiento al sistema de control implantado en Galicia que, con el fin de cumplimentar adecuadamente los dos aspectos reseñados anteriormente, tiene las siguientes características:

1. Control intensivo de las poblaciones fitoplanctónicas productoras de toxicidad. Es desarrollado por el Departamento de Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton del CCCMM, ocupándose además, de una manera general, de toda la comunidad fitoplanctónica y de las condiciones físico-químicas que condicionan su desarrollo (climatología, parámetros físico-químicos de las aguas, condiciones de estratificación, etc.). Este control permite, a corto plazo, una predicción de las variaciones de toxicidad acumulada en los moluscos y, a largo plazo, mediante la combinación de toda la información disponible, la predicción de la aparición, desarrollo y desaparición de los episodios tóxicos.
2. Control intensivo del contenido de toxinas de origen fitoplanctónico en moluscos. Es desarrollado por el Departamento de Biotoxinas del CCCMM y permite tener un conocimiento pormenorizado de la situación tanto de las distintas zonas de producción como de las distintas especies cultivadas. En cada zona de producción la periodicidad de muestreo varía, en función de la situación, desde un mínimo de una vez por semana hasta diaria.
3. Actuación individualizada sobre pequeñas unidades geográficas (zonas de producción, bancos marisqueros, polígonos de bateas, etc.) y frecuencia de muestreo muy intensa; de esta manera es posible garantizar que cualquier producto apto para el consumo no se verá retenido en la zona de producción más tiempo del necesario.
4. Actualización diaria de los Planes de Actuación que, mediante una integración de la información generada por el Departamento de Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton y de Biotoxinas; permiten disponer de información predictiva a corto plazo sobre la evolución de la toxicidad en cada una de las zonas de producción.

En el presente trabajo se expone la aplicación de este sistema de control a un caso concreto de episodio tóxico provocado por una advección de *Dinophysis acuminata* en septiembre de 1998 y que afectó a gran parte de la costa occidental de Galicia.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el sistema de control se han establecido un total de 38 estaciones oceanográficas y 14 costeras que son muestreadas con una periodicidad semanal por el Departamento de Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton; el Departamento de Biotoxinas ejerce un estricto control sobre un total de 47 puntos primarios, considerados como los más representativos de cada zona de producción y caracterizados por ser los primeros en ser afectados por un episodio tóxico estando la periodicidad de muestreo condicionada por los Planes de Actuación establecidos para cada zona; complementariamente se definen 128 puntos secundarios utilizados para lograr una mejor efectividad del sistema de control y cuya periodicidad de muestreo es muy variable y dependiente de la situación (Figura 1).

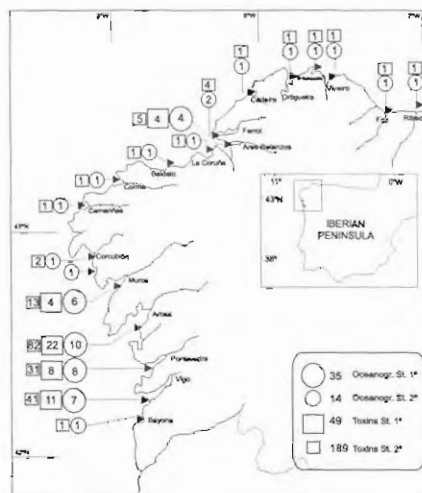


Figura 1. Estaciones oceanográficas y puntos de control de Biotoxinas en la costa de Galicia

Para una descripción detallada de las técnicas utilizadas por el Departamento de Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton véase Moroño *et al.*, en este mismo volumen. Las técnicas empleadas por el Departamento de Biotoxinas se describen en Bermúdez *et al.*, en este mismo volumen.

PLANES DE ACTUACIÓN

Las pautas de actuación del sistema de control establecido en Galicia tienen su síntesis en los "Planes de Actuación"; actualizados dos veces al día, recopilan la información aportada por los Departamentos de Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton y Biotoxinas; tienen por misión determinar la situación de cada zona de producción respecto a los fenómenos de toxicidad fitoplanctónica y permiten determinar la evolución de dicha situación de forma continuada de tal manera que pueda ser utilizada por el sector marisquero y acuicultor como un índice predictivo a corto plazo.

Recogidos en la legislación de la Comunidad Autónoma (Orden del 14 de noviembre de 1995 de la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura), se pueden establecer cuatro planes diferentes de actuación (Figura 2):

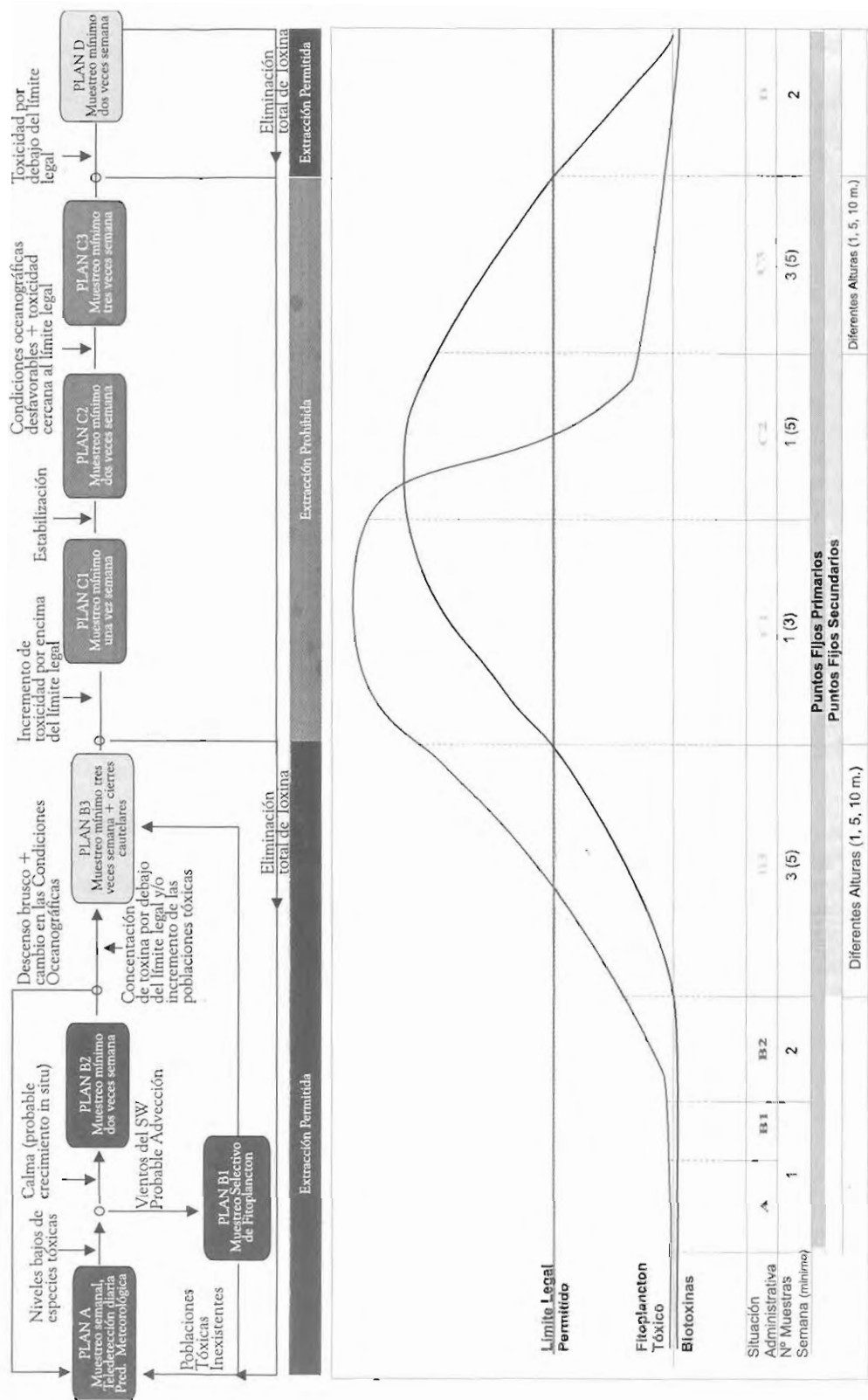


Figura 2.- Planes de Actuación.

Plan A: No se detecta toxicidad en los organismos, ni existen condiciones oceanográficas favorables para el desarrollo de especies fitoplanctónicas tóxicas.

Plan B: Plan de alerta.

B1- condiciones oceanográficas favorables para el desarrollo de especies fitoplanctónicas tóxicas; no existe presencia de especies fitoplanctónicas tóxicas en las aguas y no se detecta toxicidad en los organismos.

B2- condiciones oceanográficas favorables, presencia relativamente escasa de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas en las aguas, no se detecta toxicidad en los organismos.

B3- condiciones oceanográficas favorables, incremento significativo de las poblaciones tóxicas, se detecta toxicidad en los organismos por debajo de los límites legalmente establecidos.

Plan C: Se detectan niveles de toxicidad en los organismos superiores a los legalmente establecidos y, por tanto, se prohíbe la extracción.

C1- condiciones oceanográficas favorables; incremento significativo de la población fitoplanctónica tóxica y de los niveles de toxicidad en los organismos.

C2- condiciones oceanográficas desfavorables para el desarrollo de especies tóxicas, estabilización o descenso de población tóxica y estabilización o descenso poco acusado de la toxicidad detectada en los organismos.

C3- condiciones oceanográficas desfavorables, descenso significativo o desaparición de la población tóxica y toxicidad detectada en los organismos próxima al límite legal establecido.

Plan D: Condiciones oceanográficas desfavorables, ausencia o concentraciones no significativas de especies fitoplanctónicas tóxicas y presencia de toxicidad residual en los organismos, inferior al límite legalmente establecido, como consecuencia de un episodio tóxico inmediatamente anterior.

Como complemento a los Planes de Actuación, la legislación recoge la figura del "Cierre Cautelar" mediante el cual es posible prohibir la extracción en una zona concreta cuando se detectan poblaciones de fitoplancton potencialmente tóxico en concentraciones relativamente elevadas, se prevé un rápido desarrollo de las mismas y, o bien no es posible realizar análisis en los moluscos o bien el tiempo transcurrido entre la recogida de las muestras y la emisión de resultados hace previsible un incremento en los niveles de toxinas acumulados por encima de límite legal.

RESULTADOS

Dinophysis acuminata, productora de episodios tóxicos de tipo DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning), es la especie fitoplanctónica que causa mayores pérdidas económicas en las zonas

de producción de Galicia. Esta especie, prácticamente siempre presente en las aguas en bajas concentraciones (inferiores a 200 células/litro), presenta floraciones recurrentes de baja intensidad relativa (normalmente inferiores a 2000 células/litro) pero suficientes para generar niveles de toxicidad acumulada en los moluscos por encima del límite legal y provocar la prohibición de su extracción; el corto intervalo de tiempo con que, en determinadas épocas del año, se suceden estas floraciones puede provocar cierres muy prolongados (hasta 8 meses) en algunas de las zonas de producción, más propicias al desarrollo de esta especie.

El mecanismo de formación de estas proliferaciones (Blanco *et al.*, 1998) se ha asociado tradicionalmente a un crecimiento "in situ" en el interior de las rías gallegas en situaciones de estabilidad en la columna de agua; los datos disponibles en el sistema de control de la Comunidad Autónoma de Galicia reflejaban esta situación no habiéndose constatado episodios tóxicos provocados por *D. acuminata* cuyo origen fuera la plataforma adyacente.

Sin embargo, a principios de septiembre de 1998 se produjo un episodio tóxico de tipo DSP provocado por *D. acuminata*, asociado a una situación oceanográfica de downwelling, y cuyo origen más probable se situó en la plataforma adyacente a las Rías gallegas de tal modo que las poblaciones tóxicas fueron masivamente introducidas en las zonas de producción como consecuencia de fuertes vientos de componente Sur.

1.- Situación previa.

El 25 de agosto de 1998 se detectaron bajas concentraciones celulares de *D. acuminata* (máximo de 120 células/litro) en las estaciones más externas de las Rías de Vigo, Pontevedra y Muros que se asociaron con crecimiento "in situ". Las condiciones oceanográficas reflejaban una situación de estabilidad en la columna de agua con una termoclina establecida con posterioridad a un pulso de afloramiento (entre 13 y 18 °C en la Ría de Vigo) (Figura 3). No se detectaban indicios de toxicidad en los moluscos aún cuando algunas zonas de producción se mantenían cerradas debido a un episodio anterior de esta especie ocurrido a principios de junio.

Con anterioridad, desde finales de junio, se había producido un pulso de afloramiento muy intenso con valores del Índice de Afloramiento (IA) persistentemente elevados (Figura 3), con penetración de agua de elevada salinidad (>37.5 UPS) hasta prácticamente la superficie en todo el periodo (Figura 3) y entrada de agua relativamente fría (<13 °C) distribuida desde el fondo hasta unos 5 m. de profundidad (Figura 3).

2.- Predicción de la advección de *D. acuminata* y adopción de medidas cautelares.

Los datos disponibles hasta el 4 de septiembre (muestreo no cuantitativo por medio de una embarcación oceanográfica el día 3) mostraban indicios de la formación de una población de *D. acuminata* en las aguas de la plataforma costera adyacente a las Rías gallegas. Como consecuencia del tipo de muestreo (mediante red de fitoplancton) no se disponía de una cuantificación de la concentración celular.

El día 4 de septiembre la situación, con previsiones meteorológicas de fuertes vientos de componente sur para días sucesivos, parecía indicar una situación oceanográfica de downwelling, siendo imposible estudiar los termogramas de temperatura superficial en la costa adyacente, obtenidos mediante satélite, debido a la elevada nubosidad.

Dada la situación y el hecho de coincidir los días siguientes con el fin de semana, el mismo día 4 de septiembre se realiza un muestreo en la plataforma adyacente a las Rías de

Vigo, Pontevedra y Arousa utilizando un helicóptero de los Servicios de Salvamento y Rescate de la Xunta de Galicia; en todas las muestras, recogidas mediante una maga de plancton, se constató cualitativamente la presencia de *D. acuminata* en concentraciones elevadas.

Con independencia de no haberse detectado un incremento en los niveles de toxicidad tipo DSP acumulada en los moluscos en las muestras recogidas el mismo día 4 de septiembre, la información disponible indicaba una alta probabilidad de advección de una población tóxica desde la plataforma costera y, aún cuando no era posible cuantificar la importancia de dicha población, puesto que el mejillón puede alcanzar los límites de toxicidad legalmente establecidos incluso en menos de 24 horas (Bricelj *et al*, 1990), se estableció un Cierre Cautelar de todas las zonas de producción de mejillón cultivado en batea de Galicia.

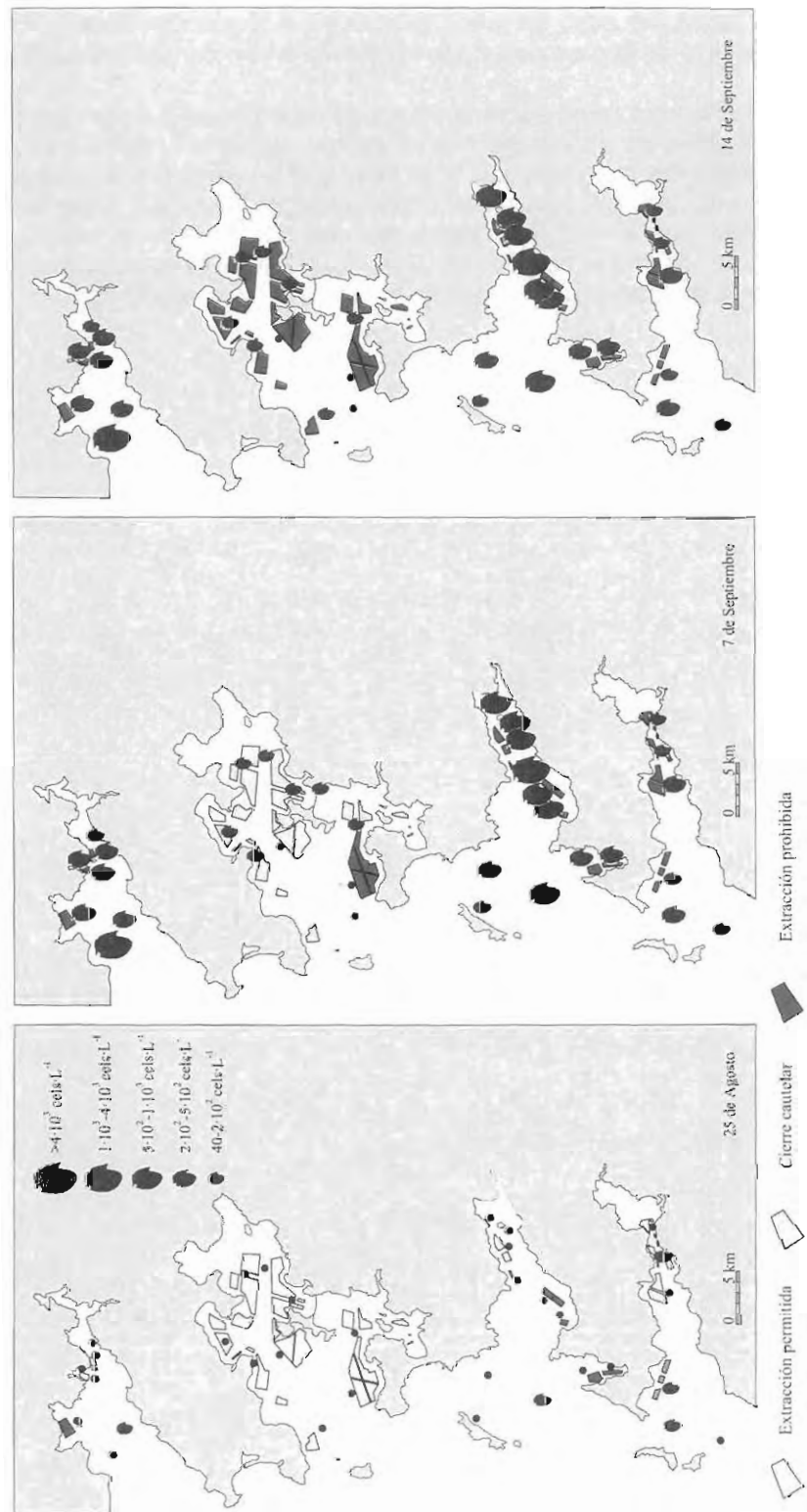


Figura 3. - Concentraciones celulares de *D. acuminata* y situación administrativa de los polígonos de cultivo de mejillón en batea.

3.- Detección y confirmación.

El día 7 de septiembre se confirmó la presencia de una población de *D. acuminata* muy desarrollada (máximo de 11.400 células/litro en la parte media de la Ría de Pontevedra) en todas las estaciones muestreadas, con máximos celulares progresivamente decrecientes desde las partes externas y medias de las Rías a las internas (Figura 3).

Los datos oceanográficos reflejaban claramente una situación de downwelling ($IA < 1500$ $m^3s^{-1}Km^{-1}$); se produjo una ruptura de la estabilidad de la columna de agua con una entrada de agua de la plataforma (temperatura $> 17^\circ C$ y salinidad 35.0 UPS) que se distribuyó uniformemente en profundidad (hasta 20 m. en la Ría de Vigo) (Figura 3).

Los termogramas de satélite disponibles (5 de septiembre) mostraban la misma situación en toda la plataforma costera adyacente a Galicia, cuando menos a nivel superficial.

Las muestras de moluscos recogidas el día 7 de septiembre reflejaban un incremento significativo en las concentraciones de toxina acumulada, la cual superó el límite legal en un 89% de las áreas cerradas cautelarmente. Se detectaron máximos de 26.4 mg de ácido okadaico por gramo de glándula digestiva en la parte media de la Ría de Pontevedra.

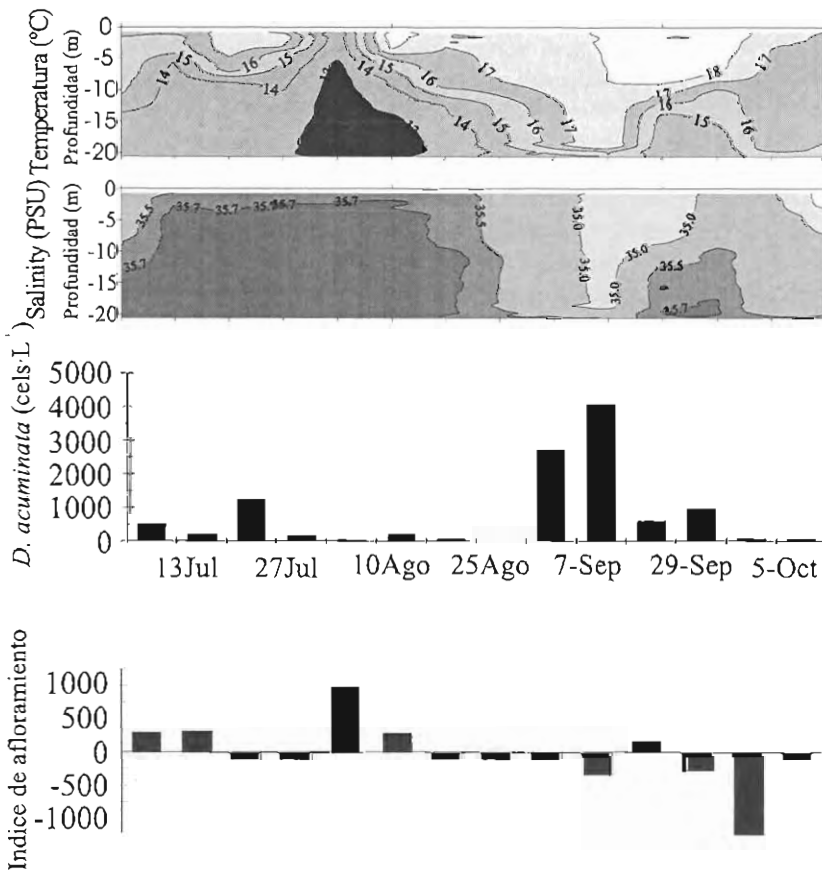


Figura 4. Perfiles verticales de temperatura y salinidad medidos mediante sonda CTD, y concentración celular de *D. acuminata* en una estación de la parte externa de la Ría de Vigo e índice de afloramiento.

4.- Evolución final del episodio tóxico.

El 14 de septiembre, aún cuando se detectaron concentraciones celulares de *D. acuminata* todavía relativamente elevadas en las Rías de Pontevedra y Muros (máximo de 1.300 células/litro en la zona media de la Ría de Pontevedra), se observó ya un descenso generalizado en las concentraciones celulares de *D. acuminata*, especialmente en las Rías de Vigo y Arousa (máximos de 400 células/litro en Vigo y 120 células/litro en Arousa) (Figura 4). Las condiciones oceanográficas se correspondían con una estratificación termohalina posterior al downwelling con gradientes de temperatura ($> 18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$) y salinidad (35.0 - 35.7 UPS) (Figura 3).

Con la paulatina desaparición de la población de *D. acuminata*, los niveles de toxicidad acumulada en los moluscos fueron también disminuyendo progresivamente como consecuencia del proceso de autodepuración natural; las primeras zonas en las que se permitió la extracción fueron aquellas donde las concentraciones de células tóxicas fueron menos importantes como fue el caso de la parte interna de la Ría de Arousa el día 16 de septiembre. Sin embargo, la prohibición de extracción se prolongó mucho más en el tiempo en algunas de las zonas de producción, que permanecieron cerradas hasta mediados del mes de diciembre.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El establecimiento de sistemas de control de episodios tóxicos de origen fitoplanctónico, para una adecuada gestión de las zonas de producción de moluscos bivalvos y otros organismos procedentes del marisqueo y la acuicultura, es hoy en día no sólo una necesidad desde el punto de vista sanitario sino también imprescindible para poner a disposición del consumidor productos de óptima calidad y garantizar al sector productor un desarrollo sostenible de su actividad.

El análisis conjunto de las variables que inciden en la evolución de las poblaciones fitoplanctónicas en general, y de las potencialmente tóxicas de una manera particular, (condiciones oceanográficas, previsiones meteorológicas, etc.) y un control continuado de los niveles de toxicidad acumulada en los organismos (alta frecuencia de muestreo, tanto espacial como temporalmente), permiten el desarrollo de sistemas predictivos a corto plazo, como el descrito en el presente trabajo, que posibilitan:

- a) Una plena garantía sanitaria de los productos procedentes del marisqueo y la acuicultura para su puesta en el mercado, pudiendo decretarse la prohibición de extracción (Cierre Cautelar) aún cuando la toxicidad acumulada en los moluscos no sea apreciable o no supere los límites legalmente establecidos pero la probabilidad de un incremento inmediato de toxicidad sea elevada.
- b) Una mejor gestión de la actividad extractiva evitando alteraciones del ciclo productivo o comercializador como consecuencia del incremento de los niveles de toxicidad acumulada en el período que transcurre entre la toma de muestra para el control oficial y la emisión de resultados y toma de decisiones administrativas.
- c) Una adecuación de las estrategias de explotación por parte del sector productor que minimice las inevitables pérdidas económicas derivadas de las prohibiciones de extracción.

Sistemas de control de las características del descrito deben basar su plan de trabajo en una recopilación intensiva y continuada de datos medioambientales. Sin embargo, también es

fundamental disponer de un conocimiento detallado de la dinámica de los fenómenos oceanográficos más importantes que acontecen en la zona a controlar y de la dinámica de las poblaciones de especies fitoplanctónicas tóxicas. La combinación del conocimiento previo y de datos en tiempo real permite un cierto grado de anticipación respecto a los cambios que se puedan producir.

Sin embargo, también resulta de gran importancia que el sistema sea capaz de anticiparse a situaciones no previstas, anómalas o nuevas; podría ser el caso de la presencia de nuevos tipos de toxicidad o el desarrollo de una población de fitoplancton tóxico siguiendo pautas diferentes a las conocidas hasta el momento, tal y como ocurrió en el episodio de *D. acuminata* en septiembre de 1998 en las Rías gallegas el cual fue debido a una advección desde la plataforma costera adyacente de una población bien desarrollada asociada a una situación oceanográfica de downwelling y que ocasionó un replanteamiento del sistema de control, basado exclusivamente en una dinámica de crecimiento "in situ" para esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la asistencia en la realización del presente trabajo al cuadro de personal técnico del CCCMM: D. Allariz, V. Álvarez, F. Amoedo, S. Bastos, F. Carrera, J. Correa, M.J. Crespo, C. Díaz, P. García, P. Ferreiro, A. De la Iglesia, M. Isorna, I. Lemos, A. López, M. Madriñán, J. Mouriño, S. Muñiz, M. Portabales y S. Roura. Al Centro Meteorológico Zonal de la Coruña del Instituto Nacional de Meteorología. Al Laboratorio de Sistemas de la Facultad de Físicas de la Universidad de Santiago de Compostela. A la tripulación del B/O J. M. Naváz del IEO y especialmente a su patrón A. Castro. A la tripulación de los helicópteros del Servicio de Salvamento y Rescate de la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura.

BIBLIOGRAFÍA

- BRICELJ, V.M., LEE, J.H., CEMBELLA, A.D., ANDERSON, D.M., 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 63, 177-188.
- MARIÑO, J., MANEIRO, J., & BLANCO, J. The harmful algae monitoring programme of Galicia: good value for money. En: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt.[eds.]. Harmful microalgae. Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, Paris., 1998, 229-232.
- BLANCO, J., MOROÑO, A., PAZOS, Y., MANEIRO, J. MARIÑO, J. Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rias: Environmental and biological influences. En: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt.[eds.]. Harmful microalgae. Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, Paris., 1998, 204-210.
- ORDEN DEL 14 DE NOVIEMBRE DE 1995 de la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura de la Xunta de Galicia por la que se regula el programa de actuaciones para el control de Biotoxinas marinas en moluscos bivalvos y otros organismos procedentes de la pesca, el marisqueo y la acuicultura. D.O.G. Nº 221, del 17 de noviembre de 1995.

SEGUIMIENTO DE FITOPLANCTON TÓXICO EN LA COSTA DE ANDALUCÍA. INCIDENCIAS DURANTE LOS AÑOS 1997 Y 1998.

Luz Mamán (1), Lourdes Fernández (1), Asunción Ocaña (1), Javier Marco (1), Jesús Morales (2), Mónica Caballos(2), Ildelfonso Márquez(3), Manuel Aguilar(1)

(1) Dap Laboratorio de El Rompido, Ctra Punta Umbría-Cartaya 21459 Cartaya, Huelva

(2) CICESM "Agua del Pino" Apartado 104, 21071 Huelva

(3) Dirección General de Pesca. Consejería de Agricultura y Pesca. Juan de Lara Nieto s/n, 41071 Sevilla

RESUMEN

En este trabajo se presenta la metodología de muestreo y estudio de fitoplancton tóxico que se lleva a cabo dentro del Programa de Control Sanitario de las Zonas de Producción de Moluscos Bivalvos en Andalucía. Se exponen también los resultados referentes a las proliferaciones tóxicas más importantes ocurridas en los años 1997 y 1998 y su incidencia en los bancos de moluscos bivalvos. En la región suratlántica, proliferaciones de la especie *Dinophysis acuminata* se han visto relacionadas con fenómenos de toxicidad DSP. Las proliferaciones más importantes en la región mediterránea han correspondido a especies del género *Pseudo-nitzschia*, siendo detectados ciertos niveles de ácido domoico en bivalvos control. Toxicidad DSP (bioensayo) ha sido determinada durante largos periodos en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) procedente de Motril (Granada) y en bivalvos del litoral de Almería, sin detectar en el agua concentraciones significativas de organismos productores de estas toxinas.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existen en la Comunidad de Andalucía un total de 42 zonas de producción de moluscos bivalvos. Dos más, catalogadas recientemente, corresponden a zonas de distribución de erizo de mar (*Paracentrotus lividus*).

Un total de 32 zonas de producción se sitúan en mar abierto, mientras que 12 corresponden a zonas interiores (desembocaduras de ríos, esteros o bahías).

La profundidad de muestreo en mar abierto presenta un amplio rango de variación, desde la zona intermareal en la región suratlántica (zonas de producción de *Donax* spp.) hasta 25-30 metros en la región mediterránea (zonas de producción de *Pecten* spp. y *Venerupis rhomboides*).

Las muestras son tomadas en la columna de agua en los puntos de captura de bivalvos. En las zonas de producción de erizo se recogen muestras de macroalgas para estudio de fitoplancton bentónico.

La periodicidad de los muestreos de fitoplancton ha ido incrementándose en estos años a medida que iban detectándose nuevos casos de toxicidad. Actualmente, en 27 zonas de producción está establecida una periodicidad de muestreo semanal, en 8 quincenal y en 9 mensual.

Respecto a la toma de datos ambientales y análisis de parámetros físico-químicos, desde 1998 se toman medidas de temperatura (superficie y fondo), salinidad y nutrientes en la columna de agua (muestras integradas) y se consultan imágenes de color oceánico (concentración de pigmentos) de los sensores MOS y SEAWIFS.

En cuanto al nivel de estudio de la comunidad de fitoplancton, desde el inicio del Programa de Seguimiento y Control en el año 1994 se identifican y cuantifican las especies potencialmente tóxicas en la columna de agua. A partir de marzo de 1997 comenzó a realizarse un estudio taxonómico de especies acompañantes y una cuantificación referida a los grandes grupos de esta comunidad (diatomeas, dinoflagelados, silicoflagelados y cocolitofóridos).

Las muestras para análisis cualitativo proceden de arrastres verticales con manga de 10 ó 20 micras (según las zonas) y para análisis cuantitativo de muestras tomadas mediante un sistema de mangueras de tramos de 5 metros. La sedimentación de las muestras se realiza en cámaras combinadas (Utermöhl).

Del total de especies potencialmente tóxicas determinadas destacan por su mayor frecuencia de aparición y/o su abundancia en las muestras: *Pseudo-nitzschia* spp, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis caudata*, *Prorocentrum lima* y *Gymnodinium catenatum*. En 1998 empezó a detectarse la presencia del dinoflagelado bentónico *Ostreopsis* cf *siamensis*, distribuido especialmente en el litoral de Almería y Granada, así como en la Bahía de Algeciras (Cádiz). Recientemente se determinó en muestras procedentes de Almería, Málaga y Granada la presencia de los dinoflagelados *Protoceratium* cf *reticulatum* y *Lingulodinium polyedrum*, ambos relacionados con producción de yessotoxinas.

RESULTADOS

REGIÓN SURATLÁNTICA

La especie *Dinophysis acuminata* ha alcanzado concentraciones elevadas en toda esta región y sus proliferaciones se han visto asociadas a fenómenos de toxicidad DSP en moluscos bivalvos del litoral de Huelva y Cádiz. Otras proliferaciones significativas han presentado un ámbito más reducido, tal es el caso de *Prorocentrum minimum* en el Estuario del río San Pedro (Bahía de Cádiz) y *Gymnodinium catenatum* en Matalascañas-Doñana (Huelva).

En estos dos años de seguimiento no se han detectado niveles de toxicidad PSP superiores a 40 µg/100 g de carne. En 1998, año en que comenzaron los análisis rutinarios de ASP (CLAE), no se detectaron niveles significativos de ácido domoico en bivalvos de este litoral.

Dinophysis acuminata

La especie tóxica *Dinophysis acuminata* tiene una amplia distribución y su presencia ha sido prácticamente continua en la franja costera comprendida entre las desembocaduras de los ríos Guadiana y Guadalquivir (tramo litoral de aproximadamente 120 Km). La evolución de esta especie en tres zonas de producción se presenta en la Figura 1.

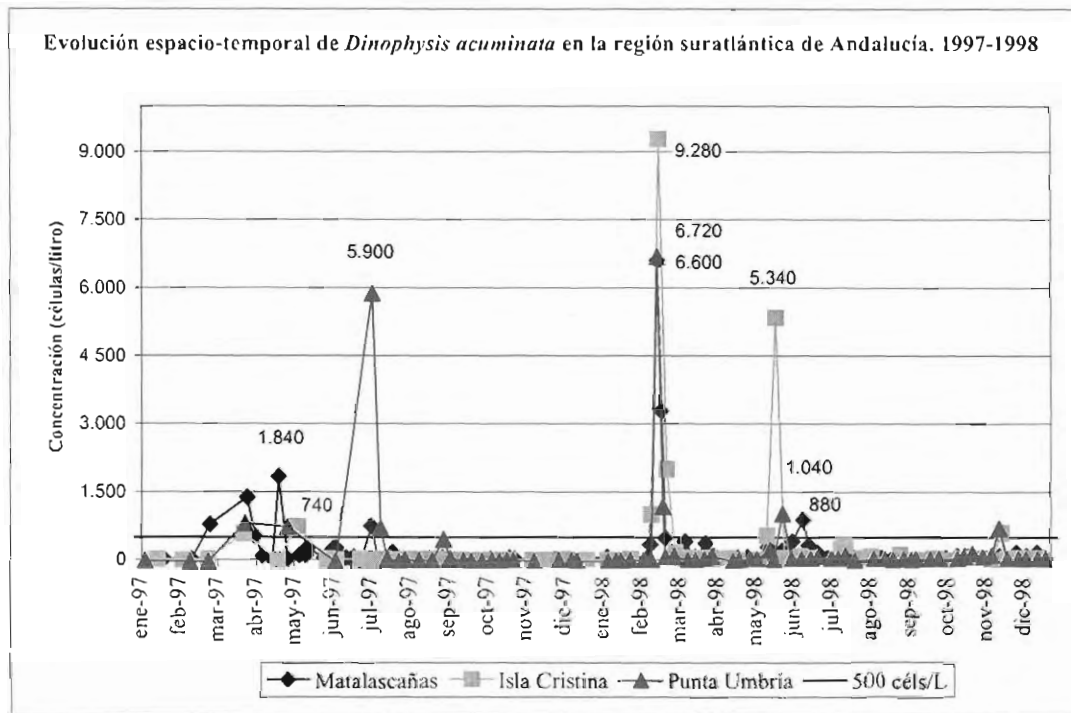


Figura 1. Evolución espacio-temporal de *Dinophysis acuminata* en la región suratlántica de Andalucía. 1997-1998.

Año 1997

En el mes de marzo comenzaron a detectarse concentraciones significativas de esta especie, con picos de hasta 900 células/litro. Desde entonces y hasta el mes de julio, *Dinophysis acuminata* continuó siendo abundante en este tramo litoral, especialmente en las zonas de mar abierto donde llegaron a registrarse hasta 5.900 células/litro. Los picos detectados de esta especie en los meses de marzo, abril y julio estuvieron asociados a floraciones de dinoflagelados (*Prorocentrum micans*, *Scrippsiella* spp y pequeños dinoflagelados).

A principios del mes de abril se determinó la presencia de enterotoxinas (tests de bioensayo positivos) en coquina (*Donax* spp) y en chirla (*Venus gallina*). La toxicidad en estos bivalvos se mantuvo hasta finales del mes de julio, siendo la coquina la última en eliminar las toxinas. No se detectó toxicidad en moluscos de aguas interiores (desembocaduras y viveros) en este periodo.

Año 1998

A mediados de febrero la población de *Dinophysis acuminata* experimentó un espectacular aumento en esta franja litoral, detectándose picos de hasta 17.500 células/litro. En esta ocasión, la proliferación de *D. acuminata* estuvo asociada a una floración de gran magnitud (entre 4 y 12 millones de células/litro) de las diatomeas *Asterionella*, *Skeletonema* o *Thalassiosira*, excepto en la zona más oriental (próxima a la desembocadura del Guadalquivir) en que el pico máximo de esta especie tóxica se detectó unos días antes de la floración de diatomeas. Antes del suceso hubo un periodo de lluvias continuado y, durante el mismo, el mar permaneció en calma (vientos máximos de fuerza 2) y la irradiación aumentó notablemente.

Una segunda proliferación de *Dinophysis acuminata*, no tan generalizada, tuvo lugar en esta costa en los meses de mayo y junio, registrándose picos de hasta 5.300 células/litro. También en esta ocasión hubo un periodo previo de lluvias y un incremento de la temperatura máxima ambiental de 3 a 7 °C durante el suceso. Los picos de *D. acuminata* estuvieron asociados a floraciones significativas (0,5 a 1 millón de células/litro) de los dinoflagelados *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum scutellum*, *Ceratium furca* y *Protoperidinium* spp.

En septiembre y noviembre se detectaron en algunas zonas picos de más de 800 células/litro, algunos de ellos, en la zona más occidental, coincidieron con proliferaciones de *Dinophysis caudata* (880 células/litro).

Toxicidad DSP (bioensayo) se detectó en coquina de toda la costa durante febrero y marzo (tras la primera proliferación de *D. acuminata*) y en algunas zonas de agosto hasta final de año. Resultados positivos de DSP se dieron puntualmente en bivalvos como berberecho (*Cerastoderma edule*) y almeja fina (*Venerupis decussata*).

Prorocentrum minimum

En febrero de 1997 y enero de 1998 tuvo lugar una importante proliferación de esta especie (2,5 millones de células/litro) en la desembocadura del río San Pedro (Bahía de Cádiz). En ambas ocasiones hubo un periodo de lluvias intensas que precedió al suceso y la salinidad experimentó un descenso considerable (hasta 10 ‰). En el año 1998 se realizaron tests de toxicidad DSP (bioensayo) en moluscos de esta zona, resultando negativos.

Gymnodinium catenatum

En Matalascañas-Doñana (Huelva), una zona próxima a la desembocadura del río Guadalquivir, fue detectada a finales de octubre de 1997 una proliferación de esta especie, registrándose una concentración máxima de 4.600 células/litro. Esta floración tuvo un carácter puntual y no progresó hacia otras áreas. No se detectó toxicidad PSP en bivalvos de los bancos adyacentes tras el suceso. Como antecedentes de esta especie en esta misma zona, cabe citar una proliferación de similares características en el mes de noviembre de 1994.

REGIÓN MEDITERRÁNEA

Las proliferaciones más importantes en el litoral mediterráneo correspondieron a especies del género (*Pseudo-nitzschia*). En bivalvos especialmente sensibles como *Pecten* spp (vieira), se determinaron notables aumentos del contenido de ácido domoico tras las proliferaciones de estas especies.

En estos dos años no se registraron proliferaciones importantes de especies productoras de toxinas paralizantes. Si bien el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* estuvo presente en este litoral durante largos periodos, especialmente durante 1997, no se determinaron concentraciones superiores a 1.200 células/litro. La toxicidad PSP que presenta de forma persistente la especie *Acanthocardia tuberculata* (corruco) fue en general más elevada durante 1997, año de mayor frecuencia de aparición de este dinoflagelado. En vieira (*Pecten* spp), fue detectada toxicidad PSP en algunos periodos, pero sólo por encima del límite permitido en una ocasión, coincidiendo con proliferaciones discretas de *Gymnodinium catenatum*.

Toxicidad DSP (bioensayo) fue determinada durante largos periodos en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) procedente de Motril (Granada) y en bivalvos de Almería, sin detectar en el agua concentraciones significativas de organismos productores de estas toxinas.

Pseudo-nitzschia spp grupo "seriata"

Estas especies mantuvieron poblaciones estables en el litoral mediterráneo (no tan estudiado en la costa de Almería). En estos dos años han tenido lugar proliferaciones importantes de estas especies, asociadas o no a floraciones de otras diatomeas. En la Figura 2 se ha representado su concentración máxima mensual durante 1997 y 1998.

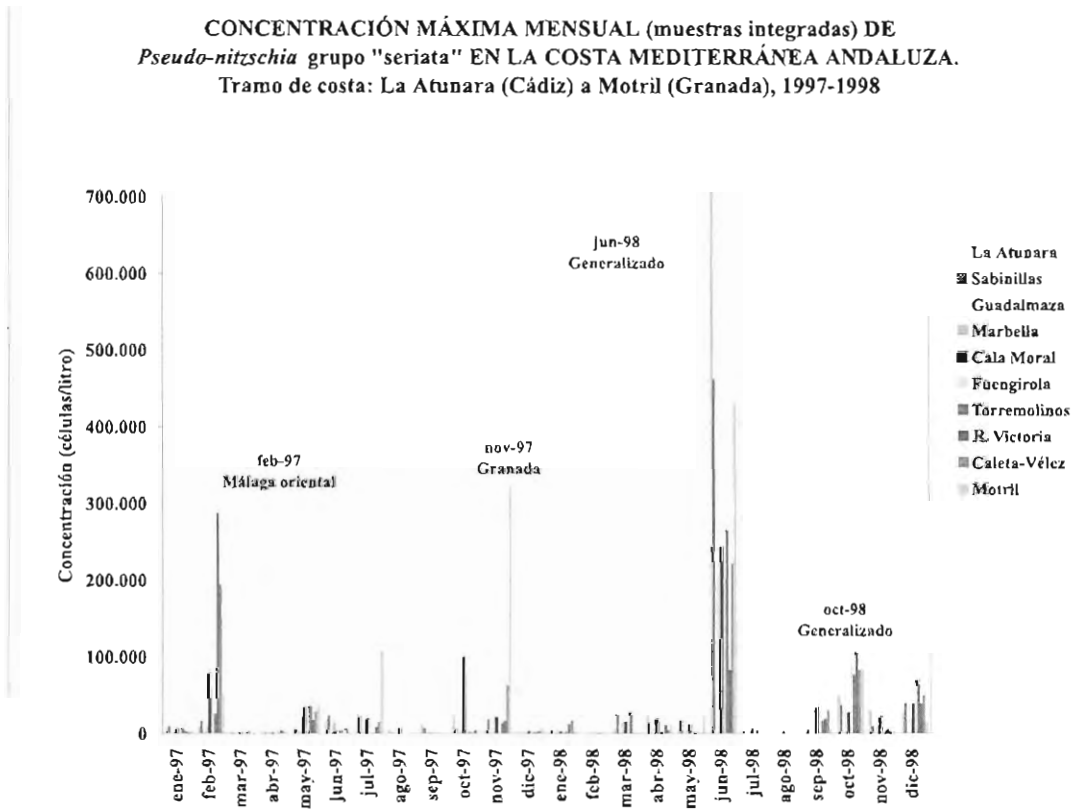


Figura 2. Concentración máxima mensual de *Pseudo-nitzschia* spp grupo "seriata" en la costa Mediterránea de Andalucía.

Año 1997

En el mes de febrero la población se disparó de forma casi generalizada en toda la costa, pero sólo en la zona más oriental de Málaga se registraron concentraciones superiores a 200.000 células/litro. *Pseudo-nitzschia australis* y *Pseudo-nitzschia pungens* fueron identificadas en el Centro Oceanográfico de Vigo (S. Fraga) de material procedente de Marbella (Málaga).

El incremento de la población de *Pseudo-nitzschia* tuvo lugar desde principios de febrero a mediados de este mes en que se detectaron las máximas concentraciones (287.000 células/litro en muestras integradas y 400.000 células/litro en el intervalo de 0 a 5 metros en una estación de 15 metros de profundidad). Entre las especies asociadas a esta floración se encontraban los dinoflagelados *Gonyaulax digitalis*, *Gonyaulax* spp, *Protoperdinium* spp, *Ceratium furca* y el dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*, del que se determinó una concentración máxima de 1.200 células/litro. Esta proliferación estuvo relacionada con detección de ácido domoico en el bivalvo control *Callista chione*.

En el mes de noviembre en la costa de Motril (Granada), se detectó otra importante proliferación de *Pseudo-nitzschia* que alcanzó concentraciones de 322.000 células/litro y estuvo asociada a una floración (400.000 células/litro) de las diatomeas *Chaetoceros* spp y *Thalassionema* spp.

Año 1998

En el mes de junio la población de *Pseudo-nitzschia* volvió a experimentar un importante incremento, superándose en la mayoría de las zonas 200.000 células/litro. Este suceso fue generalizado en la costa mediterránea de Andalucía, aunque de la costa de Almería no se dispone de datos suficientes para asegurar que se extendió hasta allí con la misma intensidad. Las concentraciones más elevadas se registraron en la zona más occidental del Mar de Alborán, donde se superaron 700.000 células/litro en muestras integradas. Esta proliferación estuvo asociada a *Pseudo-nitzschia* grupo "delicatissima" que alcanzó, junto a las diatomeas *Thalassionema* spp, *Nitzschia* spp y *Chaetoceros* spp, concentraciones similares a las de *P.* grupo "seriata". El estudio de los parámetros físico-químicos y ambientales disponibles parece apuntar que esta floración se desencadenara como consecuencia de un afloramiento generalizado en la franja costera, ya que hubo vientos mantenidos de Poniente de intensidad fuerte a moderada desde el mes de mayo y la temperatura superficial (imágenes del sensor AVHRR) tres días antes de detectar la floración era 16-16,5 °C en toda la franja más costera observándose un gradiente hasta 19,5-20 °C en la zona central del mar de Alborán. Los silicatos no fueron deficitarios durante este "bloom".

Tras este suceso fueron detectados ciertos niveles de ácido domoico en bivalvos control, aunque sólo en una muestra de concha fina (*Callista chione*) procedente de Motril (Granada), se superó el límite permitido para esta toxina. En vieira (*Pecten* spp) fue determinado un gran aumento de ácido domoico en todas las zonas de producción, pasando de niveles algo inferiores a 20 µg/g a alrededor de 200 µg/g .

Gymnodinium catenatum

Los antecedentes de esta especie en el Mar de Alborán la sitúan como principal fuente de toxicidad PSP en moluscos bivalvos de esta región. Su presencia fue detectada en febrero de 1989 asociada a detección de toxicidad PSP en moluscos de la Costa del Sol (Bravo, 1993). Posteriormente, a mediados de junio de 1995, esta especie desencadenó un episodio tóxico

generalizado en la costa mediterránea de Andalucía, registrado en informes internos de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. La concentración máxima, de 52.000 células/litro, se determinó en una zona próxima a la localidad de Fuengirola (Málaga).

En estos dos años de seguimiento esta especie ha aparecido en toda la costa mediterránea, desde Algeciras (Cádiz) hasta Garrucha (Almería oriental). Las proliferaciones observadas han sido discretas, no superándose concentraciones de 1.200 células/litro. La evolución espacio-temporal de esta especie en estos dos últimos años está mejor estudiada en la franja costera comprendida entre Algeciras (Cádiz) y Motril (Granada), donde los muestreos de agua tuvieron siempre una periodicidad semanal. Su evolución espacio-temporal durante 1997 y 1998 se refleja en la Figura 3. En 1997 estuvo presente durante todo el año excepto en los meses de agosto, septiembre y octubre y la mayor proliferación tuvo lugar en el mes de febrero. En 1998 se detectó en algunas zonas de Málaga en enero, febrero y marzo y no volvió a encontrarse en ninguna zona hasta finales de agosto y principios de septiembre. En los meses de noviembre y diciembre tuvo lugar la segunda proliferación más destacada de este año.

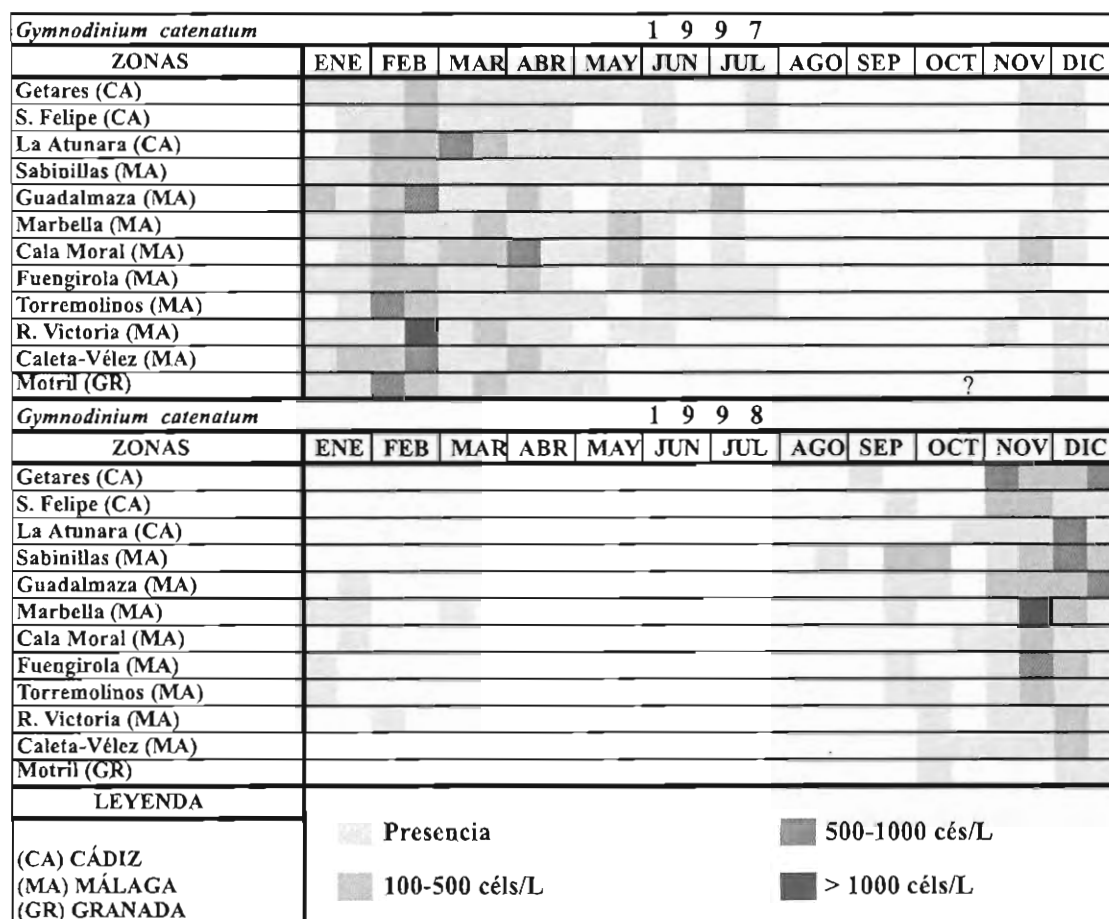


Figura 3. Evolución espacio-temporal de *Gymnodinium catenatum* en la región mediterránea de Andalucía. Tramo Algeciras-Motril, 1997-1998.

En estos dos años no ha sido detectada toxicidad PSP en moluscos control del litoral mediterráneo. Respecto a la toxicidad de especies sensibles a estas toxinas, se ha visto que en corruco (*Acanthocardia tuberculata*) los niveles de PSP se mantuvieron significativamente más elevados en 1997, año en que *G. catenatum* estuvo presente en periodos más largos. En vieira (*Pecten* spp) también se detectó en una ocasión una concentración de saxitoxina superior a 80 µg/100, coincidiendo con la reaparición de *Gymnodinium catenatum* en septiembre de 1998.

DSP en Almería y Granada (batea de mejillón)

El litoral de Almería cuenta con zonas de producción de chirla (*Venus gallina*) y coquina (*Donax* spp). Estos bivalvos presentaron toxicidad DSP (bioensayo) durante varios meses en estos dos años. Aunque hasta el momento no se han detectado en el agua concentraciones elevadas de organismos relacionados con producción de estas toxinas, es posible que hayan ocurrido, ya que la frecuencia de muestreo de fitoplancton en esta región es muy escasa, debido a largos periodos de cierres a los que están sometidos los bancos de bivalvos por no alcanzar tallas comerciales.

Aún así, lo que ha sido posible averiguar a cerca de las especies tóxicas de este litoral es realmente interesante. El género *Dinophysis* se encuentra muy diversificado, siendo las especies más frecuentes *D. caudata*, *D. sacculus*, *D. acuta*, *D. fortii* y *D. acuminata*. Es también una zona de amplia distribución de las especies bentónicas *Prorocentrum lima* *Ostreopsis* cf *siamensis* y *Prorocentrum* cf *mexicanum*. También han sido encontrados en estas aguas los dinoflagelados *Lingulodinium polyedrum* y *Protoceratium* cf *reticulatum*, ambos relacionados con producción de yessotoxinas.

Actualmente, con el fin de intentar conocer cuál puede ser la fuente de toxicidad que afecta a los moluscos de esta zona, se ha incrementado la periodicidad de los muestreos de fitoplancton y se ha decidido prorrogarlos incluso en épocas de veda de moluscos.

La situación de cierre por toxicidad en la única batea de mejillón de Andalucía, situada en Granada, es similar a la descrita en Almería. De un total de 27 análisis de DSP realizados en 1998, 21 fueron positivos. Aunque aquí la periodicidad de los muestreos de agua es regular (semanal), no han sido determinadas concentraciones de organismos tóxicos que puedan explicar esta toxicidad casi permanente. Las especies tóxicas más frecuentes en esta zona fueron *Dinophysis caudata*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis acuta*, *Dinophysis fortii*, *Dinophysis sacculus*, *Prorocentrum lima* y *Ostreopsis* cf *siamensis*. Aunque estas dos últimas se encontraron en varias ocasiones de forma abundante en las muestras de macroalgas que colonizan la batea, no ha sido demostrado aún que sean la fuente de toxicidad que afecta a este molusco.

CONCLUSIONES

En la región suratlántica, el mayor problema de toxicidad lo han constituido las proliferaciones de *Dinophysis acuminata*. Éstas no afectaron por igual a las diferentes especies de bivalvos que se capturan en esta costa, siendo la coquina (*Donax* spp) el bivalvo que permaneció más tiempo cerrado por presencia de enterotoxinas.

En la región mediterránea, sólo las proliferaciones de *Pseudo-nitzschia* spp alcanzaron concentraciones que ocasionaron cierres importantes de zonas de producción, concretamente de los bancos de vieira. Si bien *Gymnodinium catenatum* no generó "blooms" de alerta en estos dos años, se considera un riesgo potencial en esta región por sus largos periodos de

permanencia, su amplia distribución geográfica y por sus antecedentes tóxicos en esta costa (Junio, 1995).

Se desconoce actualmente la fuente de toxicidad que afecta durante largos periodos a los bivalvos del litoral de Almería y de Granada (batea de mejillón). Por el momento no han sido detectadas altas concentraciones de especies relacionadas con producción de enterotoxinas.

AGRADECIMIENTOS

A Santiago Fraga, del Centro Oceanográfico de Vigo, por su ayuda en la identificación de especies tóxicas de nuestro litoral. También a M^a Luisa Fernández, Aurea Míguez y Emiliano Cacho, del Laboratorio de Referencia Comunitario, por su apoyo en la puesta en marcha de bioensayos y CLAE para análisis de ácido domoico.

BIBLIOGRAFÍA

- Atlas du phytoplancton marin, volume 1, Sournia, A. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique, 1986.
- Atlas du phytoplancton marin, volume 2, Ricard, M. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique, 1987.
- First report of *Gymnodinium catenatum* Graham on the Spanish Mediterranean coast. Bravo, I., Reguera, B., Martínez, A., Fraga, S. Toxic Marine Phytoplankton. Edna Graneli *et al.*, Editors. (Elsevier Science Publishing. 1999) pp. 449-452.
- Identifying marine phytoplankton. Carmelo R. Tomas, Ed. 1997.
- Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. Balech, E. Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr. nº. 1, Madrid, 1988.
- Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds) IOC Manuals and Guides No. 33 UNESCO 1995.
- Potentially Toxic Phytoplankton 2. Genus *Dinophysis* (*Dinophyceae*), Larsen, J and Moestrup O. ICES Identification Leaflets for Plankton. Ed. J.A. Lindley. 1992.
- The Genus *Alexandrium* Halim (*Dinoflagellata*), Balech, E. Published by Sherkin Island Marine Station 1995.

SEGUIMIENTO DEL FITOPLANCTON TÓXICO EN LAS BAHÍAS DEL DELTA DEL EBRO EN LOS AÑOS 1997-1998.

M. Delgado*, M. Santmartí**, M. Vila*, E. Garcés* y J. Camp*

*Instituto de Ciencias del Mar. P. Joan de Borbó s/n. 08039 Barcelona.

**Centre d'Aqüicultura IRTA. Carretera de Poblenou Km. 5.5. 43500 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona).

RESUMEN

Respecto a los microorganismos productores de PSP, *Alexandrium minutum* sigue siendo la especie que entraña un mayor riesgo por su presencia registrada en Alfacs durante la primera mitad del año, aunque sin haberse llegado a detectar toxicidad en el producto durante el periodo que se trata. En este periodo de tiempo se ha detectado por primera vez en las bahías de Alfacs y Fangar (y también por primera vez en Cataluña) la presencia de *A. pseudogoniaulax* en muy bajas concentraciones, y que además está considerado como no tóxico.

Respecto a los productores de DSP, *Dinophysis sacculus* continúa dominando en este grupo de toxicidad, tanto por nº de presencias como por las concentraciones celulares alcanzadas. Esta especie alcanzó concentraciones muy altas en Enero de 1998 en la bahía de Alfacs, acompañado de detección de toxicidad DSP por bioensayo y del cierre de la extracción de moluscos. Ésta ha sido la única incidencia de toxicidad en bivalvos durante el periodo de estudio y es la primera detección de toxicidad DSP en Cataluña.

Respecto a los microorganismos causantes de mortalidad de fauna, hubo proliferaciones importantes de *Gyrodinium corsicum* en el periodo de estudio, restringida a la bahía de Alfacs. Ello ocurrió de manera similar a los años anteriores, con desarrollos en los inviernos consecutivos desde la primera detección asociada a mortandad de fauna marina (finales de 1994), pero al final del periodo que se presenta (noviembre-diciembre de 1998) sus concentraciones fueron muy bajas y no hubo mortalidad de fauna ni en la bahía ni en los estanques de piscicultura localizados en la llanura deltaica. Este freno en su desarrollo coincidió con la acción de fuertes viento de levante que renovaron el agua de la bahía y homogeneizaron la columna de agua. Es de destacar la primera identificación en las bahías de *Gymnodinium pulchellum* (descrito como especie nueva por J. Larsen en 1994) aunque en bajas concentraciones.

La marea roja de *Alexandrium catenella* en las costas de Tarragona en el verano de 1998 no afectó a las bahías (el límite geográfico por el Sur fue L'Ametlla). Por otro lado en las bahías del delta del Ebro, en el periodo tratado, no ha habido ni agregados mucilaginosos ni discoloraciones del agua (registradas en años precedentes).

INTRODUCCIÓN

El fitoplancton nocivo se controla en las bahías del delta del Ebro en relación con las explotaciones de moluscos bivalvos desde 1989. En los dos años que se exponen en esta comunicación se tratan los productores de intoxicación paralizante (PSP), diarréica (DSP) y los causantes de mortalidad de la fauna. En cuanto a los organismos explotados en la zona del delta del Ebro se presentan algunos datos, correspondientes a las producciones anuales en 1996 (Fernández *et al.*, 1997): en las instalaciones verticales en las bahías destaca el mejillón (3.433.000 Kg.) y el ostrón (477.000 Kg.); la almeja fina y la almeja japonesa han representado una captura conjunta de 63.000 Kg, sumando la explotación de los bancos naturales y los de cultivo; en cuanto a la explotación de los bancos naturales de la costa exterior del delta destacan la coquina (266.000 Kg) y la chirla (34.000 Kg.).

MÉTODOS

El muestreo de las bahías del delta del Ebro se realiza rutinariamente con intervalo semanal en 5 estaciones (Figura 1): puerto, exterior, central, central-interior e interior. En estas estaciones se miden parámetros ambientales (salinidad, temperatura y oxígeno disuelto) y se toman muestras en la superficie del agua. En la estación central, además, se realizan perfiles verticales de los parámetros y se obtiene una muestra de agua del nivel profundo y otra integrada de toda la columna de agua, así como muestras para el análisis de nutrientes inorgánicos y clorofila.

Las muestras de fitoplancton usuales consisten en 150 mL de agua marina que es fijada con formaldehído (1%) en botellas de polietileno. La muestra integrada consiste en 1000 mL de agua que es obtenida con una manguera en toda la columna de agua, filtrada por malla de 10 μ m, resuspendida en 150 mL de agua y fijada con formaldehído (1%). Para el análisis de fitoplancton se colocan 50 mL de las muestras en cubetas de sedimentación de base móvil y 5 cm² de área, que son rebanadas mediante el empleo de una hoja de acero inoxidable (procedimiento original de M. Delgado) después de 24 horas.

Los recuentos celulares se realizan con la ayuda de ordenador, empleando un microscopio Leica-Leitz (DM IL), dotado de contraste de fases, epifluorescencia y fotografía, y usando diferentes aumentos y diferentes áreas barridas de la base de la cubeta (en relación con el tamaño y la abundancia de los organismos). En todas las muestras se identifican -a nivel de especie normalmente- y cuantifican los organismos susceptibles de producir efectos nocivos. En las muestras discretas de la estación central (superficie y fondo), además, se cuantifica la composición general del fitoplancton. En las muestras integradas de la estación central se cuantifican especialmente las dinoflageladas y también se cuantifican los organismos de zooplancton (como ciliados, rotíferos, copépodos y larvas de bivalvos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Productores de PSP- *A. minutum* se ha presentado los dos años en la bahía dels Alfacs, principalmente durante el primer semestre de forma bastante continuada (Figura 2) pero en 1997 se detectó también en pleno verano y en 1998 en los meses de noviembre y diciembre. En el Fangar hubo pocas presencias y cercanas al límite de detección. Aunque las concentraciones que ha alcanzado siguen considerándose bajas (máximo de 10.000 células/litro). y no se ha registrado toxicidad PSP por encima del nivel permisivo en este periodo, la tendencia a lo largo de los años es de aumento. La presencia en invierno-primavera en Alfacs es considerada como una pauta fija, puesto que desde el inicio del seguimiento regular en las bahías del Delta del Ebro en 1989 no ha fallado su registro ningún año. En la

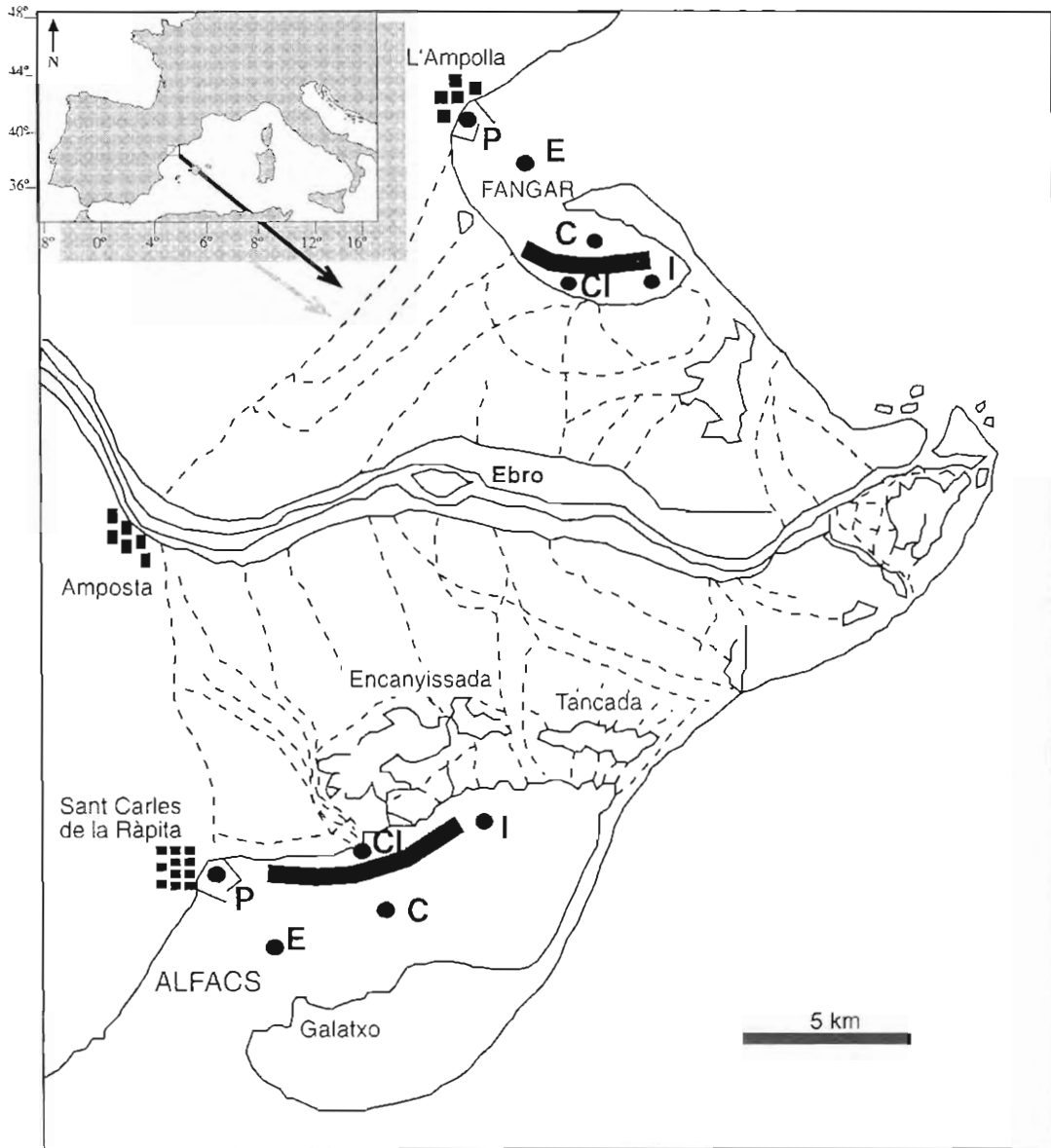


Figura 1.

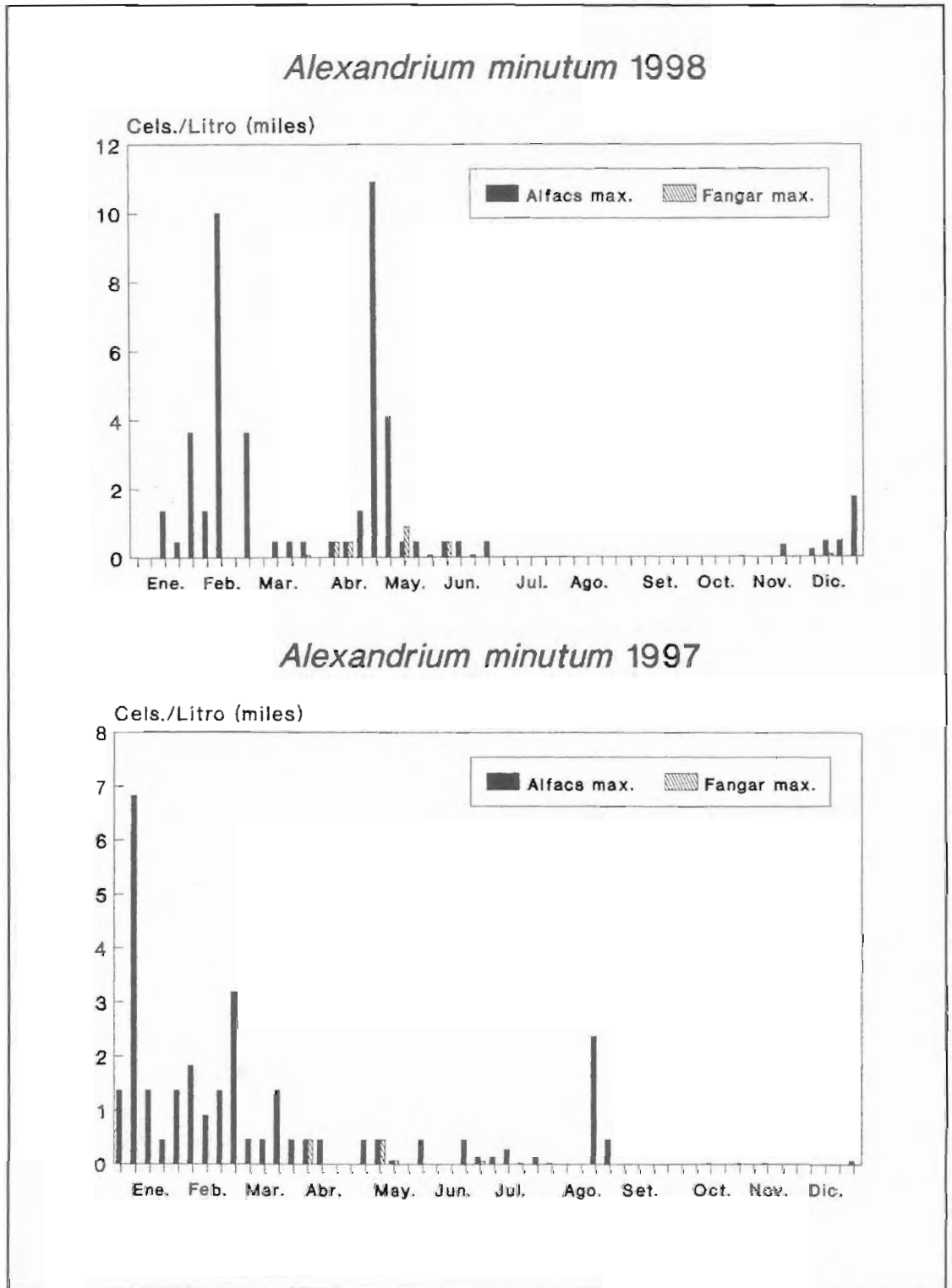
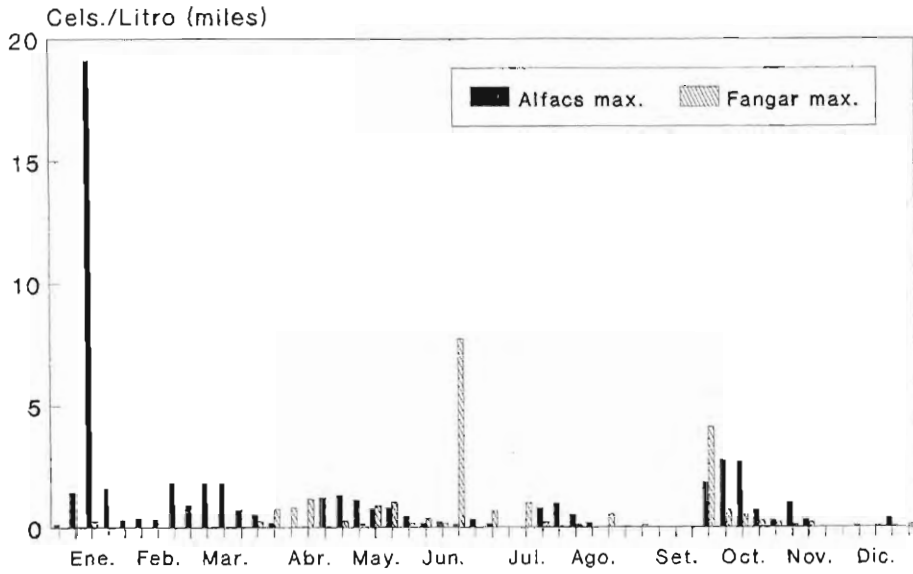


Figura 2.

Dinophysis sacculus 1998



Dinophysis sacculus 1997

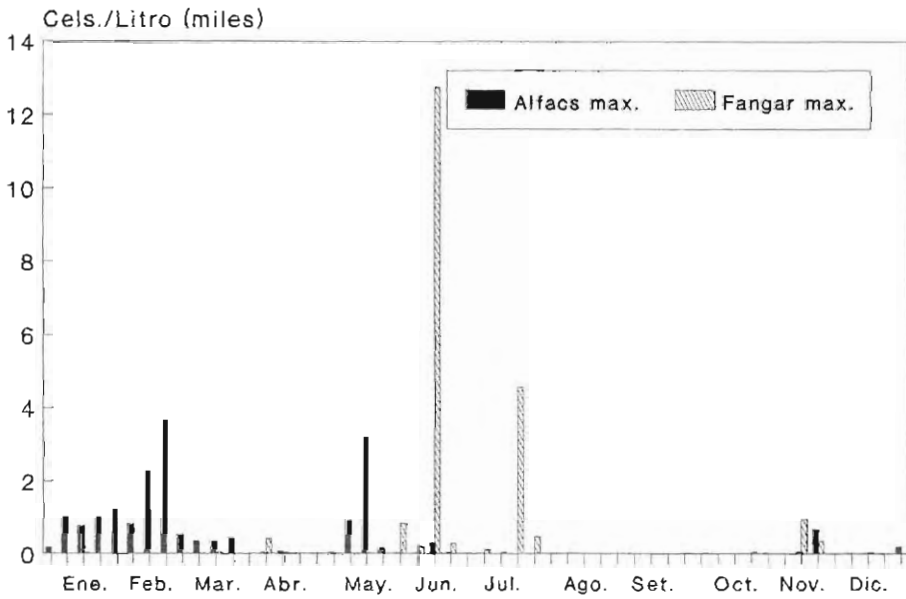


Figura 3.

mayor parte de los muestreos en que se registra su presencia suele afectar a varios puntos de muestreo.

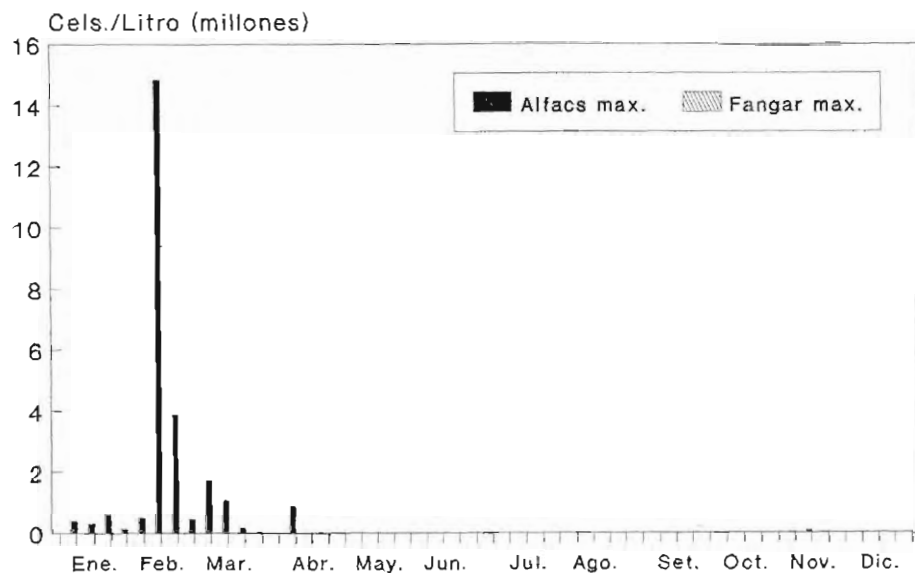
En este periodo de tiempo se ha detectado por primera vez en las bahías de Alfacs y Fangar (y también por primera vez en Cataluña) la presencia de *A. pseudogoniaulax*, en muy bajas concentraciones (y que además no está considerado como tóxico, aparte de algún error en la bibliografía). La marea roja de *Alexandrium catenella* en las costas de Tarragona en el verano de 1998 (Vila *et al.*, en esta Reunión) no afectó a las bahías (el límite geográfico por el Sur fue L'Ametlla).

Productores de DSP.- *Dinophysis sacculus* ha sido la especie con mayor riesgo de producir toxicidad DSP, tanto por el nº de presencias como por las concentraciones alcanzadas (Figura 3), dentro del grupo de los productores de DSP. La distribución temporal de esta especie ha sido muy variada desde el inicio del seguimiento, con proliferaciones en diferentes estaciones del año, generalmente independientes en las dos bahías. En Alfacs presentó un periodo de abundancia continuada en el invierno de 1997 (3 meses de duración). En el Fangar presentó un pico o máximo de 12.000 cels/L el 16 de Junio de 1997 (puerto de L'Ampolla), que no repercutió en otras zonas de la bahía. El 19 de enero de 1998 se presentó en concentraciones muy altas (19.000 cels/L en punto CI de Alfacs) acompañado de detección de toxicidad DSP en mejillones (hubo cierre durante 1 semana). Esta es la primera detección clara de toxicidad DSP en la costa catalana. Otras especies de *Dinophysis* presentes fueron *D. caudata*, *D. rotundata* y *D. acuta*. Las dinoflageladas bénticas *Prorocentrum mexicanum* y *Prorocentrum lima* se presentaron siempre en bajas concentraciones (inferiores de 200 cels/L). *P. mexicanum* se presentó a final de verano y principios de otoño de los dos años y en las dos bahías. *P. lima* mostró presencias aisladas.

Ictiotóxicas.- *Gyrodinium corsicum* ha estado presente en Alfacs (y ausente en Fangar) en los inviernos de 1997 y 1998 (Figura 4), de manera similar a los años anteriores (desde finales de 1994), con las máximas concentraciones generalmente localizadas en la capa de agua más profunda de la bahía. En cuanto a efectos causados en la bahía de Alfacs, hubo mortalidad de peces en marzo de 1997 y mortalidad de mejillones (principalmente los de pequeño tamaño, utilizados como semilla) en diciembre de 1997 y enero-febrero de 1998, coincidiendo con elevadas concentraciones de la dinoflagelada. Ello ha dado lugar a numerosos problemas este año de los cultivadores de mejillón para encontrar semilla (importada de Italia y se quiso importar de Francia, concretamente de la laguna de Thau, pero se recomendó no hacerlo debido a que tuvieron allí un desarrollo importante de *A. tamarense*: peligro de introducción de una especie tóxica). Al final del periodo que se presenta (noviembre-diciembre de 1998) las concentraciones de *G. corsicum* fueron muy bajas en Alfacs y no hubo detecciones de mortalidad de fauna ni en la bahía ni en los estanques de piscicultura localizados en la llanura deltaica. Este freno en su desarrollo coincidió con la acción de fuertes viento de levante que renovaron el agua de la bahía y homogeneizaron la columna de agua. Además, el freno en su desarrollo coincidió con una prolongación en el vertido de agua dulce a la bahía durante noviembre y diciembre en 1998 (generalmente los canales que vierten agua dulce a las bahías permanecen abiertos de Abril a Octubre, ligado al ciclo de cultivo del arroz), en cuanto a que este flujo de agua dulce vertida aumentaría la renovación de las aguas con la consiguiente dispersión de las poblaciones de la dinoflagelada.

Es de destacar la primera identificación en las bahías de *Gymnodinium pulchellum*, descrita como especie nueva por Larsen (1994) en muestras de Australia y cita como presente en también en Tasmania y Japón. También hay evidencia de su presencia en Florida y en el Mar Mediterráneo (Steidinger *et al.*, 1998).

Gyrodinium corsicum 1998



Gyrodinium corsicum 1997

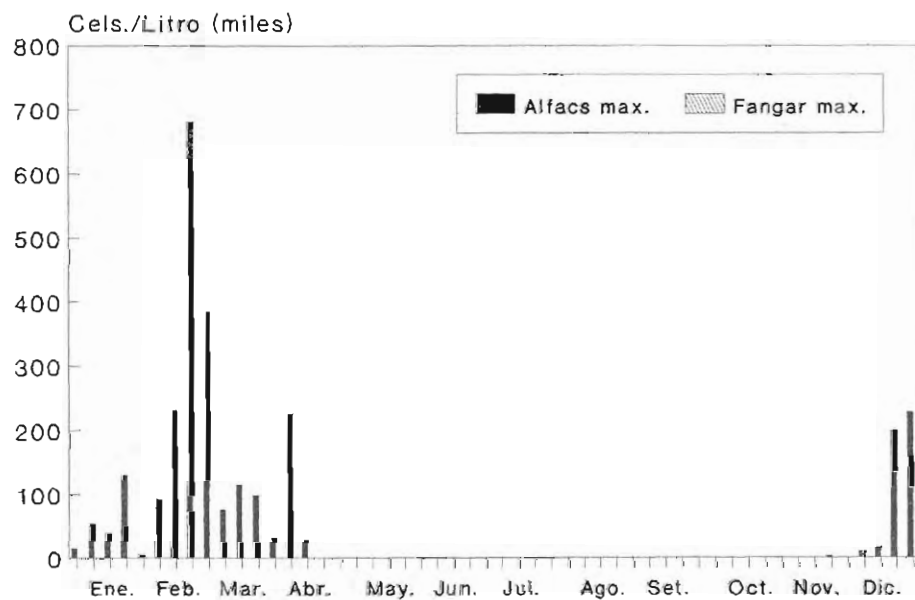


Figura 4.

Otras.- Se registró mortandad de peces en artes de pesca en la bahía de Alfacs en setiembre de 1998, pero asociada a bajas concentraciones de oxígeno en la capa de agua más profunda. En relación con las especies productoras de ASP, cabe comentar que en las bahías del delta del Ebro fueron detectadas tres especies del actual género *Pseudo-nitzschia* (Delgado, 1987), y que se presentan en numerosas ocasiones y durante una gran parte del año. Es de resaltar en el Mar Mediterráneo una falta notoria de información respecto a éste género y que hasta el momento actual no ha estado demostrada ni descrita la presencia de toxicidad ASP en nuestras aguas. Por otro lado, en el periodo tratado, no ha habido agregados mucilaginosos, registrados en años precedentes (Delgado et al., 1997).

BIBLIOGRAFÍA

- Delgado, M. 1987. Fitoplancton de las bahías del delta del Ebro. *Inv. Pesq.* 51(4): 517-548.
- Delgado, M., Estrada, M., Camp, J., Fernández, J.V., Santmartí, M. y Lletí, C. 1990. Development of a toxic *Alexandrium minutum* Halim (*Dinophyceae*) bloom in the harbour of Sant Carles de la Ràpita (Ebro Delta, northwestern Mediterranean). *Scientia Marina* 54(1): 1-7.
- Delgado, M., Matamoros, E., Vila, M., Garcés, E. y Camp, J. 1997. Seguimiento del fitoplancton nocivo en la costa catalana en los años 1995-1996. En: Actas de la V Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas (J.M. Vieites y F. Leira eds.). ANFACO-CECOPECA, Vigo. pp: 25-35.
- Fernández, J.V., Camp, J. y Comín, F.A. 1997. Los medios acuáticos del delta del Ebro y su capacidad de producción. Revista de Obras Públicas Nº 3.368, año 144 (Septiembre):67-71.
- Larsen, J. 1994. Unarmoured dinoflagellates from Australian waters. I. The genus *Gymnodinium* (Gymnodiniales, Dinophyceae). *Phycologia* 33(1): 24-33.
- Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Truby, E.W. and Roberts, S. 1998. First report of *Gymnodinium pullchellum* (*Dinophyceae*) in North America and associated fish kills in the Indian River, Florida. *J. Phycol.* 34: 431-437.

EVOLUCIÓN DE FITOPLANCTON TÓXICO Y CONDICIONES OCEANOGRÁFICAS ASOCIADAS, EN LOS AÑOS 97-98, EN LAS RÍAS GALLEGAS.

A. Moroño, Y. Pazos y J. Maneiro

INTRODUCCIÓN

Las Rías gallegas se ven afectadas por episodios tóxicos de origen fitoplanctónico fundamentalmente de tipo DSP y PSP y, en los últimos años, también de tipo ASP. La necesidad de proteger, tanto al consumidor ofreciéndole un producto sanitariamente seguro, como al productor minimizando en lo posible las pérdidas económicas, hace que el control de estas zonas se convierta en un tema prioritario. Además del control de la toxicidad en los moluscos bivalvos, es importante la predicción que pueda hacerse de estos fenómenos mediante el seguimiento las condiciones hidrográficas asociadas a la aparición, desarrollo y desaparición de las poblaciones de las especies tóxicas.

Con esta finalidad comienza a funcionar en Febrero de 1992, el Departamento de Condiciones Oceanográficas e Fitoplancton del Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. En este estudio, se presenta un resumen de los episodios tóxicos detectados por este departamento en el periodo 97-98 y de las condiciones hidrográficas en las que se desarrollaron.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se lleva a cabo un muestreo semanal en 38 estaciones (Fig. 1). En estas estaciones se recogen datos en continuo, en la columna de agua, empleando una sonda CTD SBE 25 SEALOGER con sensores para medir temperatura, salinidad, transmitancia, fluorescencia, pH y oxígeno disuelto. Al mismo tiempo, se recoge una muestra de la columna de agua con una manguera según la técnica de Lindahl (1986); 25 ml de esta muestra se sedimentan en una cubeta Uthermöi y se realizan los contajes en microscopio invertido.

Se ha escogido una estación para representar las Rías Baixas, la estación V1 situada en la parte norte y externa de la Ría de

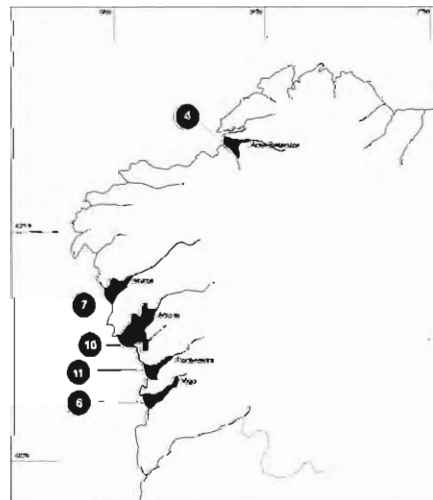


Fig. 1. Distribución de los puntos en los que se lleva a cabo el muestreo semanal del CCCMM para el control de las condiciones oceanográficas y el fitoplancton.

Vigo y otra estación para la Ría de Ares-Betanzos (Rías Altas), la estación L1 situada también en la zona más externa de esta Ría.

Como índice de afloramiento se empleó un índice que representa el transporte de Ekman de agua superficial por los vientos (Bakun, 1973). Los datos de velocidad y dirección de los vientos son promedios semanales de los diariamente recogidos en la estación meteorológica de Cabo Fisterra (INM, Centro Zonal de A Coruña).

RESULTADOS

En los años 1997 y 1998 los cierres en la recolección de moluscos bivalvos fueron debidos a *Dinophysis acuminata* y especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* spp.

Año 1997 en las Rías Baixas

Durante el año 1997 se observaron en las Rías Baixas dos episodios importantes de *D. acuminata*. El primero de ellos se produjo en abril con un máximo de 840 cels.l⁻¹ (Fig. 2) en la parte interna de la Ría de Pontevedra. Las mayores concentraciones celulares se detectaron en las estaciones más externas de todas las rías y en la parte media de la Ría de Pontevedra (Fig.2). El segundo episodio fue mucho más importante y se produjo a finales de septiembre con un máximo de 1360 cels.l⁻¹ en la parte media de la Ría de Pontevedra. Sólo afectó a las Rías de Pontevedra y Vigo, no detectándose prácticamente células en la de Arousa y Muros (Fig. 2). El episodio de primavera se produjo con homogeneidad de temperatura y salinidad en toda la columna de agua pero con valores para estas dos variables mayores que los típicamente invernales (16°C y 35 UPS) (Fig. 3A1 y A2). El episodio de otoño comienza coincidiendo con una ruptura de la estratificación de la temperatura y salinidad (que se había producido con la estabilidad posterior al periodo de afloramiento) debido a downwelling (Fig. 3A1 y A2).

En cuanto a los episodios de ASP, a lo largo del año se desarrollaron varias poblaciones de *Pseudo-nitzschia* spp. detectándose toxicidad en los moluscos bivalvos con dos de ellas: la primera apareció a finales de febrero y se mantuvo hasta la segunda semana de marzo con un máximo de aproximadamente 400.000 cels.l⁻¹ en el interior de la Ría de Pontevedra. Se presentó con condiciones hidrográficas todavía invernales de homogeneidad de temperatura y salinidad en toda la columna de agua (14°C y 33.5 UPS) (Fig. 3A1 y A2). La segunda apareció la última semana de agosto con un pequeño pulso de afloramiento (la línea de 35.8 UPS no llegó hasta superficie) y se mantuvo durante todo ese pulso que duró hasta la última semana de septiembre (máximo de aproximadamente 400.000 cels.l⁻¹ en la Ría de Pontevedra) (Fig. 3A1 y A2).

Año 1997 en la Ría de Ares-Betanzos

En la Ría de Ares-Betanzos el único episodio de *D. acuminata* que produjo cierres por toxicidad en los moluscos bivalvos se desarrolló desde finales de agosto hasta principios de octubre en una fase de estratificación térmica y halina (18°C y 35 UPS en superficie y 15°C y 35.8 UPS a 20 m) (Fig. 3B1 y B2). A finales de la primavera se detectó otro episodio de *D. acuminata* que, en concentraciones celulares, fue más importante (máximo de 1280 cels.l⁻¹ en la parte interna de la ría); sin embargo no se detectó toxicidad en los moluscos bivalvos (Fig. 3B3).

En abril se detectó ácido domoico en los moluscos bivalvos durante una proliferación de células de *Pseudo-nitzschia* spp. que se desarrolló con homogeneidad de temperatura en toda la columna de agua pero con una fuerte haloclina situada entorno a 10 m (Fig. 3B1, B2 y B4).

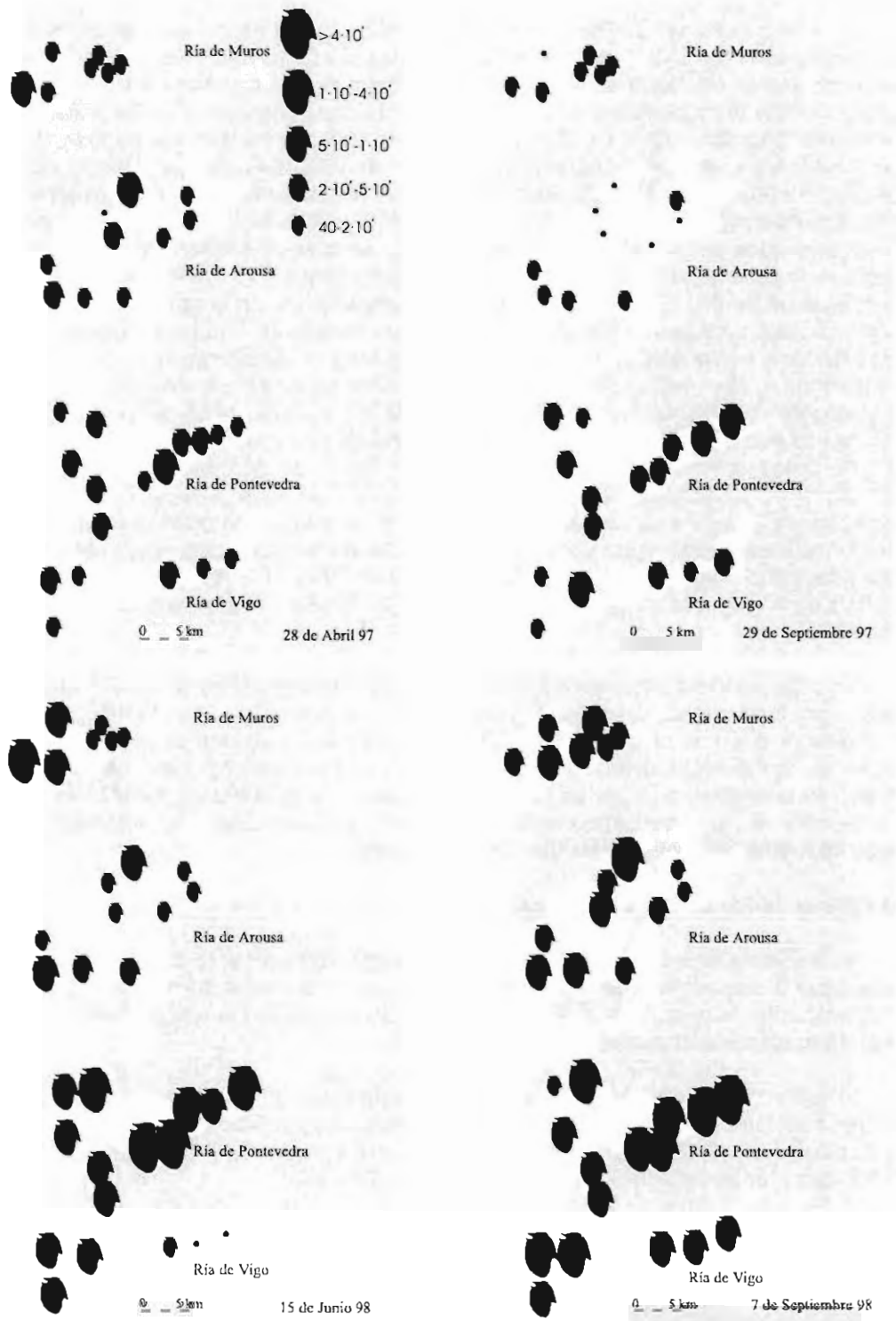


Fig. 2. Distribución geográfica de *Dinophysis acuminata* en las Rías Baixas en las fechas correspondientes a los máximos de células detectados para las floraciones más importantes de esta especie en los años 1997 y 1998.

Año 1998 en las Rías Baixas

En el año 1998, en las Rías Baixas, hubo tres episodios importantes de DSP causados por *D. acuminata* (Fig. 3A3). En el primero de ellos, las células se detectaron por primera vez en la segunda semana de junio con una situación hidrográfica de estratificación térmica y halina (18°C y 34 UPS en superficie y 15°C y 35.5 UPS a 20 m) posterior a un pequeño pulso de afloramiento (Fig. 3A1, A2 y C). Esta población se mantuvo durante un periodo de fuertes vientos del norte y un fuerte afloramiento (la línea de 35.8 UPS casi llegó hasta superficie), alcanzando un máximo de 6.360 céls.l⁻¹ en la parte media de la Ría de Pontevedra (Fig. 2). Afectó especialmente a las Rías de Muros, Pontevedra y Vigo. En Ría de Arousa sólo afectó a una pequeña zona de la boca sur (O Grove), aunque también se detectó un número de células elevado en la zona norte interna de esta ría (1200 céls.l⁻¹) que no se reflejó en toxicidad en los moluscos bivalvos (Fig. 2). Con la relajación del afloramiento, en la tercera semana de julio, desaparece esa población. Una nueva floración se produjo en la última semana de agosto manteniéndose e intensificándose durante todo el mes de septiembre en coincidencia con vientos de sur y downwelling (Fig. 3A1, A2 y C). En este segundo episodio, se llegó a alcanzar un máximo de 11.640 céls.l⁻¹ en la parte interna de la Ría de Pontevedra, dato que se encuentra en el nivel de máximos históricos detectados por este sistema de control semanal desde el año 1992. Se detectaron niveles superiores a las 1000 céls.l⁻¹ en las cuatro Rías Baixas (Fig. 2). Posteriormente, se produjo una pequeña proliferación de esta especie en el periodo de estratificación posterior al downwelling, pero la última floración importante se produjo ya con la homogeneidad de temperatura y salinidad en toda la columna de agua, en el mes de octubre, previa a las condiciones invernales de inversión térmica (Fig. 3A1, A2 y C). Afectó únicamente a las Rías de Pontevedra y Vigo con un máximo de 2.120 céls.l⁻¹ en la parte media de la Ría de Pontevedra.

En cuanto a *Pseudo-nitzschia* spp. se detectaron varias proliferaciones a lo largo de todo el año que fueron especialmente importantes en la época de afloramiento (llegando a sobrepasar el millón de células por litro) (Fig. 3A1, A2 y A4). Con dos de ellas, ambas con un máximo de aproximadamente 100.000 céls.l⁻¹, y en una pequeña zona, se detectó ácido domoico en el mejillón: a finales de octubre en la cara norte de la Ría de Pontevedra y a finales de noviembre en la parte interna de la misma ría. Las condiciones hidrográficas fueron de mezcla invernal y de inversión térmica, respectivamente.

Año 1998 en la Ría de Ares-Betanzos

En la Ría de Ares-Betanzos hubo, durante el año 1998, un episodio importante de DSP causado por *D. acuminata*. Este episodio se produjo en el mes de septiembre con una situación de estratificación térmica, tras el periodo de afloramiento, que fue parcialmente rota por un downwelling de poca intensidad (Fig. 3B1, B2 y B3).

Inmediatamente después de que desapareciera esta población de *D. acuminata*, con la homogeneización de la columna de agua, se desarrolló una población de *Pseudo-nitzschia* spp. con la que se detectó toxicidad en los moluscos bivalvos y que llegó a alcanzar un máximo de 269.700 céls.l⁻¹ en la parte interna de la ría (Fig. 3B1, B2 y B4).

DISCUSIÓN

La mayor parte de los episodios de *D. acuminata* detectados durante estos dos años se presentaron en condiciones hidrográficas de estratificación termohalina, en este sentido el desarrollo de poblaciones de dinoflagelados tras la relajación del afloramiento y la aparición de una fase de estratificación, ha sido descrito por varios autores para diversas especies y también

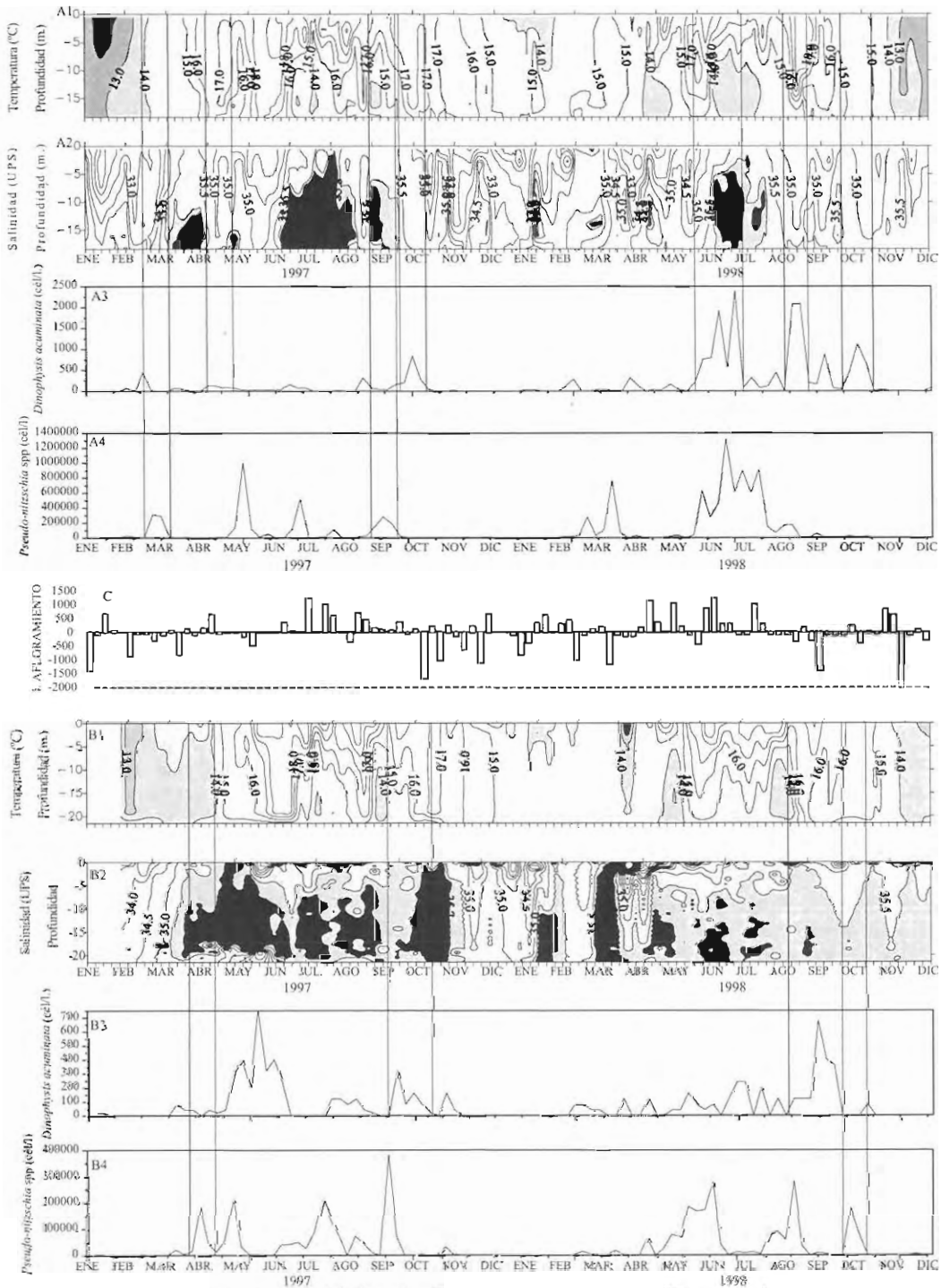


Fig. 3. Evolución temporal del índice de afloramiento (C), de los perfiles verticales de temperatura y salinidad y de la concentración de *Dinophysis acuminata* y *Pseudo-nitzschia* spp. en las estaciones V1 (A1, A2, A3 y A4) y V2 (B1, B2, B3 y B4) durante los años 1997 y 1998.

en concreto para especies del género *Dinophysis* (Fraga *et al.* 1988; Delmas *et al.*, 1992, 1993; Reguera *et al.*, 1993, 1995, 1996). La ventaja de los dinoflagelados frente a las diatomeas, en esta situación, se ha asociado a la posibilidad de migración vertical y aprovechamiento de los nutrientes disponibles en las capas inferiores, como se ha descrito para numerosos dinoflagelados entre ellos *Dinophysis* spp. (Durand-Clément *et al.*, 1988) y también para *D. acuminata* aunque con una capacidad de migración menor (Lassus *et al.*, 1990).

La segunda situación observada de coincidencia con vientos de componente sur y downwelling ya ha sido descrita para varias especies tóxicas de dinoflagelados por Fraga *et al.* (1988) y para *D. acuta* por Pazos *et al.* (1995). En el caso concreto de *D. acuminata* Reguera *et al.* (1996) observaron un máximo de 3.040 cels. l⁻¹ coincidiendo con vientos de sur y downwelling.

Las situaciones de estratificación o estabilidad y downwelling se asocian por tanto habitualmente con el desarrollo de especies de este género, pero no el mantenimiento e incluso crecimiento de *D. acuminata* con fuertes vientos de componente norte, como se observó en las Rías Baixas en julio de 1998, sin embargo Bravo *et al.*, 1995 también observaron una proliferación de esta especie coincidiendo con afloramiento y Lassus *et al.* (1993) observaron incrementos en *D. acuminata* incluso con homogeneización de toda la columna de agua.

En algunos casos, aún detectándose elevados niveles de *D. acuminata* no se detectó toxicidad en los bivalvos. Estas discrepancias, en el número de células necesario para que se detecte toxicidad en los moluscos bivalvos, pueden ser debidas a las variaciones en la toxicidad por célula que en esta especie pueden ser bastante importantes como han constatado Andersen *et al.*, 1996.

En cuanto a las poblaciones de *Pseudo-nitzschia* spp., se ha observado que la situación hidrográfica en la que se desarrollan varía según la especie pero también para una misma especie según la localización (Bates *et al.*, 1998). Por ejemplo, la especie asociada a la detección de ácido domoico en Galicia (Míguez *et al.*, 1996) *P. australis*, en la zona norte de California está asociada con periodos de estratificación térmica y baja concentración de nutrientes, en tanto que, en la zona sur esta especie está asociada con la intrusión de aguas frías ricas en nutrientes probablemente relacionada con procesos de afloramiento (Bates *et al.*, 1998). Aunque es muy probable que la especie que ha causado los episodios de ácido domoico en los años 97-98 sea *P. australis*, no podemos asegurarlo debido a que la identificación de las especies de este género es muy laboriosa (Snov *et al.*, 1999) y difícil de integrar en un sistema dinámico de control. En Galicia las proliferaciones de *Pseudo-nitzschia* spp. aparecen asociadas fundamentalmente a los pulsos de afloramiento (Maneiro *et al.*, 1997). A pesar de que se han detectado varias proliferaciones de especies de este género con concentraciones incluso superiores al millón de células por litro, durante estos dos años, especialmente en la época de afloramiento; sólo se ha detectado ácido domoico con concentraciones celulares relativamente bajas (máximo 400.000 cels.l⁻¹) desarrolladas en época invernal con homogeneidad de temperatura en toda la columna de agua o ya con situación de inversión térmica.

AGRADECIMIENTOS

A las oficiales de laboratorio: Florentina Amoedo, Pilar García, Isabel Lemos, Adela López y Silvia Roura, a Jesús Mouriño y a la tripulación del B/O José María Navaz especialmente a su patrón Antonio Castro.

BIBLIOGRAFÍA:

- P. Andersen, Hald B., & Emsholm H., 1996. Toxicity of *Dinophysis acuminata* in Danish coastal waters. En: Yasumoto T., Oshima Y. & Fukuyo Y. (eds.). Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO pp: 281-284.
- S.S. Bates, Garrison D.L. & Horner R.A., 1998. Bloom dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. En: D.M. Anderson, A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff (eds.). Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. NATO ASI Series, Vol. G 41: 267-292.
- I. Bravo, Reguera B., & Fraga S., 1995. Description of different morphotypes of *Dinophysis acuminata* complex in the Galician Rias Baixas in 1991. En: P. Lassus, Arzul G., Erard E., Gentien P., & C. Marcaillou. Harmful Marine Algal Blooms, 21-26.
- D. Delmas, Herbland A. & Maestrini S.Y., 1993. Do *Dinophysis* spp. come from the "open sea" along the French Atlantic coast?. In: Smayda, T.J., & Shimizu Y., (eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier Science Publishers B.V., 489-494.
- D. Delmas, Herbland A. & Maestrini S.Y., 1992. Environmental conditions which lead to increase in cell density of the toxic dinoflagellates *Dinophysis* spp. in nutrient-rich and nutrient-poor waters of the French Atlantic coast. Mar. Ecol. Prog. Ser. 89: 53-61.
- M. Durand-Clement, Clement J.-C., Moreau A., N. Jeanne & Puisseux-Dao S., 1988. New ecological and ultrastructural data on the dinoflagellate *Dinophysis* sp. from the French coast. Mar. Biol. 97: 37-44.
- S. Fraga, Anderson D.M., Bravo I., Reguera B., Steidinger K.A. & Yentsch C.M., 1988. Influence of upwelling relaxation on dinoflagellates and shellfish toxicity in Ría de Vigo, Spain. Estuar. Coast. Shelf Sci. 27: 349-361.
- P. Lassus, Proniewski F., Pigeon C., Veret L., Le Déan L., Bardouil M. & Truquet P., 1990. The diurnal vertical migrations of *Dinophysis acuminata* in an outdoor tank at Antifer (Normandy, France). Aquat. Living Resour. 3: 143-145.
- J. Maneiro, Y. Pazos, J. Mariño, J. Blanco & A. Moroño, 1997. Overview of *Pseudonitzschia* spp. blooms, oceanographic conditions and associated species in the Galician Rías. Abstracts de la VIII International Conference on Harmful Algae, p. 131.
- A. Míguez, Fernandez M.L. & Fraga S., 1996. First detection of domoic acid in Galicia (NW of Spain). En: Yasumoto, T., Oshima Y. & Fukuyo Y., (eds.). Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 143-145.
- Y. Pazos, Figueiras F.G., Alvarez-Salgado X.A. & Rosón G., 1995. Hydrographic situations and species associated with the appearance of *Dinophysis acuta* and their probable cysts in the Ría de Arousa. En: P. Lassus, Arzul G., Erard E., Gentien P., & C. Marcaillou. Harmful Marine Algal Blooms, 651-656.
- B. Reguera, Bravo I., & Fraga S., 1995. Autoecology and some life history stages of *Dinophysis acuta* Ehrenberg. J. Plank. Res. 17: 999-1015.
- B. Reguera, Bravo I., Mc Call H. & Reyero I., 1996. Phased cell division and other ecological observations in field populations of *Dinophysis* spp. during cell cycle studies. En: Yasumoto, T., Oshima Y. & Fukuyo Y., (eds.). Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 257-260.
- A. Reguera, Mariño J., Campos M.J., Bravo I., Fraga S. & Carbonell A., 1993. Trends in the occurrence of *Dinophysis* spp. in Galician waters. In: Smayda, T.J., & Shimizu Y., (eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier Science Publishers B.V., 559-564.
- J. Snov, Lundholm N., Moestrup q. & Larsen J., 1999. Potentially toxic phytoplankton. 4. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (*Diatomophyceae*/*Bacillariophyceae*). ICES Identification Leaflets for plankton, Leaflet No. 185, pp: 1-23.

SEGUIMIENTO DEL FITOPLANCTON TÓXICO EN LA ZONA DE BATEAS DEL PUERTO DE VALENCIA.

Periodo 1993-1998.

C. Gomis¹; M. González²; J. Alcober³.

¹ Institut D'ecologia Litoral.

² Dpto. Biotecnología. Universidad De Alicante.

³ Dpto. Biología Vegetal. Universidad de Valencia.

INTRODUCCIÓN

La aparición en julio de 1991 de un bloom de *Gyrodinium impudicum* en la zona de producción mejillonera del Puerto de Valencia unido a la creciente problemática asociada a fenómenos de toxicidad ligadas a zonas de producción pesquera, puso de manifiesto la necesidad de controlar las poblaciones fitoplanctónicas de esa zona con el fin de detectar la posible aparición de especies nocivas y/o productoras de toxinas que pudieran suponer algún riesgo para los consumidores. Por medio de un Convenio, en 1992 la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, a través de los Servicios de Pesca contrató con el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Valencia el desarrollo de un plan de muestreo, que si bien durante ese primer año sólo se realizó durante los meses de verano, a partir de 1993 hasta la fecha fue ampliado a todo el año.

El diseño del muestreo se vio ligeramente modificado por la construcción del emisario submarino de Pinedo, de forma que actualmente se tienen dos estaciones, estación bateas en la parte sur y estación espigón en la parte norte, en cada una de las cuales se toman dos muestras a distintos niveles de profundidad, subsuperficial y a 2.5 m. En cuanto a parámetros físico-químicos, se recoge también la temperatura del agua superficial y el pH.

METODOLOGÍA

La periodicidad del muestreo es mensual durante los meses de enero a abril, y también desde septiembre hasta diciembre, es decir en los meses que están fuera del periodo de producción. En mayo, la frecuencia es quincenal y, desde junio hasta mediados de agosto (fecha en que se cierran las bateas), se toman muestras semanalmente.

Dichas muestras son fijadas "in situ" con formol al 4% (concentración final en muestra) saturado de hexametiléntetramina (THRONSEN, 1978) en el momento de ser recogidas y, posteriormente, sedimentadas en cámaras de sedimentación y observadas al microscopio invertido según el método Utermöhl (HASLE, 1978), ya en el laboratorio.

En el presente resumen se presentan los resultados correspondientes al periodo Enero de 1996 Diciembre de 1998.

RESULTADOS

Salvo el incidente ocurrido en 1991 con *Gyrodinium impudicum* sp. que produjo una capa "gelatinosa" que cubrió toda la superficie del puerto y resultó no ser tóxica, no ha habido ningún episodio parecido, si bien si hubo un fuerte "bloom" de *Emiliania huxleyi* (coccolitofora) durante el verano de 1993 en el que se alcanzaron concentraciones próximas a las 6000 células/ml, produciéndose una fuerte discoloración del agua pero sin ningún tipo de efecto tóxico.

En lo que respecta al Puerto de Valencia, las características generales de la zona desde el punto de vista fitoplanctológico son las siguientes:

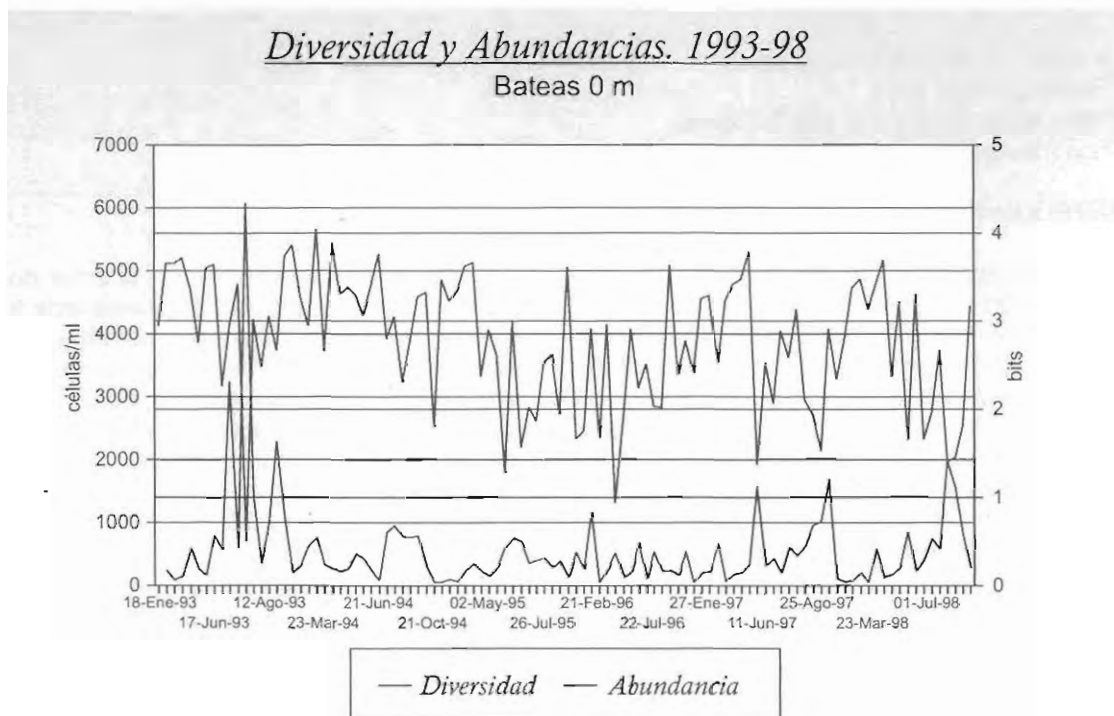


Fig 1.: Abundancias y Diversidades en el interior portuario. La situación es muy similar en todas las estaciones.

Se trata de una zona confinada y por tanto poco batida, con escasa renovación de agua y con un aporte de nutrientes más o menos constante durante todo el año, dada la proximidad del emisario submarino de Pinedo, y las numerosas empresas ubicadas en su interior. Esto hace pensar en una población bastante estabilizada, desde el punto de vista de las abundancias celulares a lo largo del año (biomasa). Si observamos la evolución por grupos, desde 1993 hasta ahora se puede ver que es así. La diversidad es media alta, oscilando entre 2 y 4 bits, estando la mayoría de los valores alrededor de 3. Las abundancias medias raramente superan las 1000 células/ml y normalmente suele coincidir con épocas estivales.

La comunidad fitoplanctónica está claramente dominada por las diatomeas, seguidas por los dinoflagelados, que únicamente en momentos muy determinados del año llegan a presentarse en concentraciones similares a éstas. Los coccolitofóridos se presentan en mayor cantidad en verano, siendo sus concentraciones máximas de menos de 500 células/ml. El resto de grupos fitoplanctónicos tiene presencias ocasionales. Los silicoflagelados normalmente en invierno, y las clorofíceas y euglenales presentan una distribución irregular y poco abundante. El grupo denominado flagelados recoge diversas especies de criptomonadales y flageladas desnudas de muy difícil posición taxonómica.

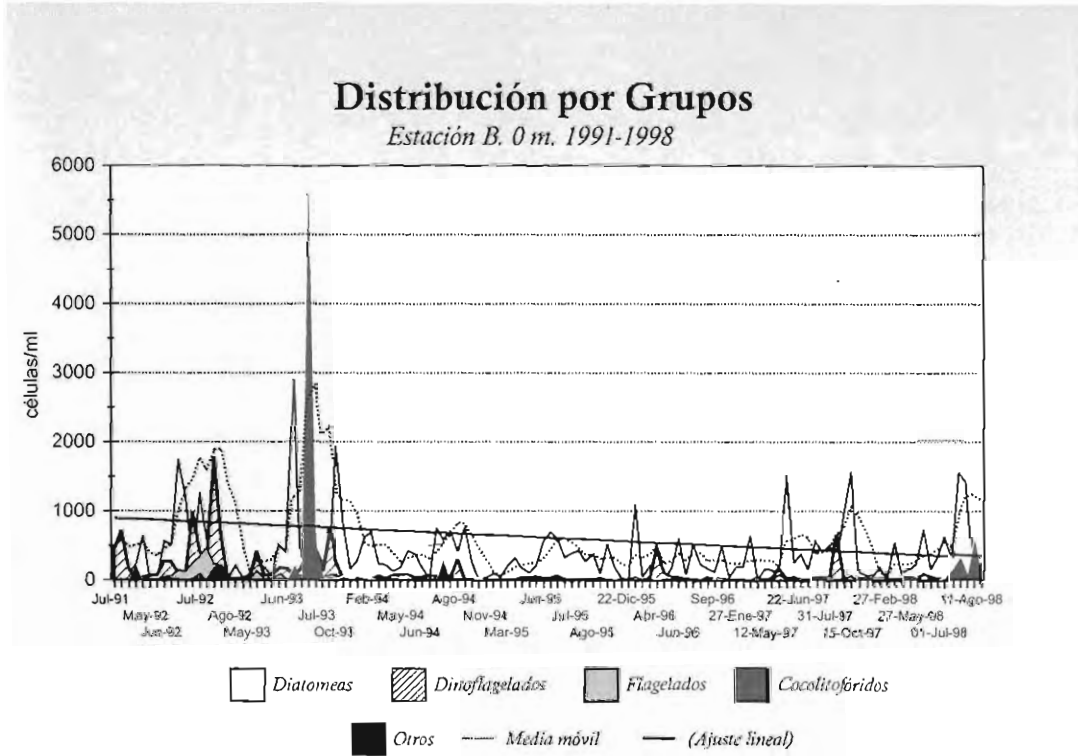


Fig 2.: Distribución de los principales grupos fitoplanctónicos desde 1991. Obsérvese la tendencia al descenso de la biomasa.

No existen diferencias entre los distintos puntos de muestreo, ni siquiera entre las dos profundidades, todas siguen el mismo patrón, como se puede ver en las gráficas de tendencias. Este hecho queda también de manifiesto mediante los análisis multivariantes de tipo cluster y factorial de correspondencias.

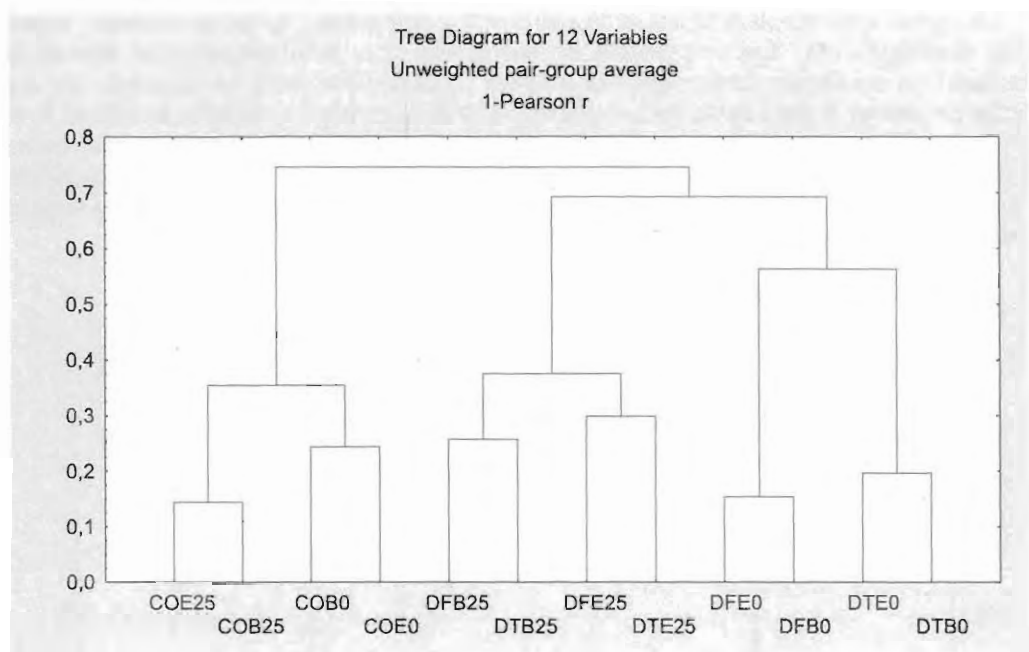


Fig 3.: Distribución de los diferentes grupos fitoplanctónicos por estaciones. DT = Diatomeas, DF = Dinoflagelados y CO = Cocolitoforales. 0 = Superficial y 25 = 2.5 m de profundidad. E= Estación Espigón, B= Estación Bateas. Obsérvese la homogeneidad de los grupos.

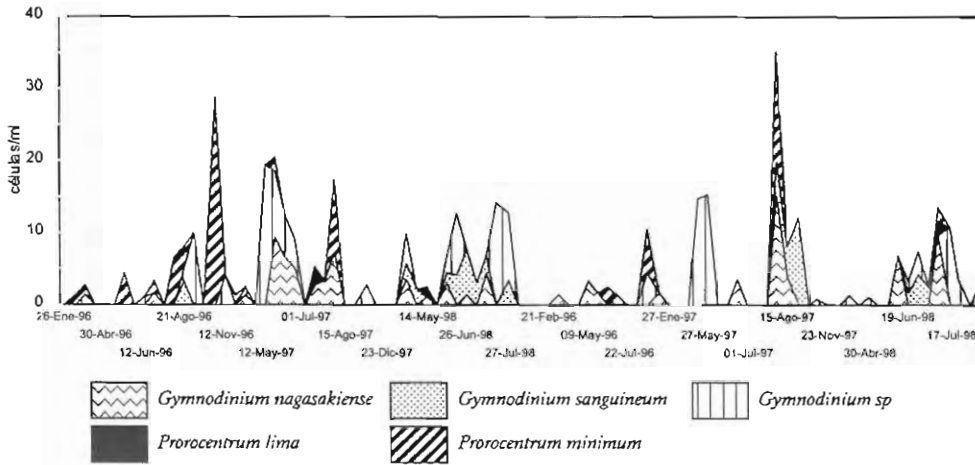
Entre las especies fitoplanctónicas que pueden representar problemas en cuanto a la producción de toxinas existe un pequeño contingente en el puerto, y esta presencia, aunque no alarmante justifica la realización de este seguimiento.

Especies de toxicidad demostrada en aguas ibéricas, hemos detectado *Alexandrium catenella*, *A. minutum*, *Dinophysis caudata*, *D. sacculus* y *Prorocentrum lima*. De ellas *Dinophysis acuminata* y *D. acuta* han sido detectadas en Pinedo, un punto situado en el exterior de la dársena y próximo a la desembocadura del emisario de aguas residuales.

Entre las especies cuya toxicidad está por demostrar en aguas ibéricas se ha detectado *Lingulodinium polyedrum* (yessotoxinas), *Prorocentrum minimum*, *Pseudo-nitzschia* spp.(ASP).

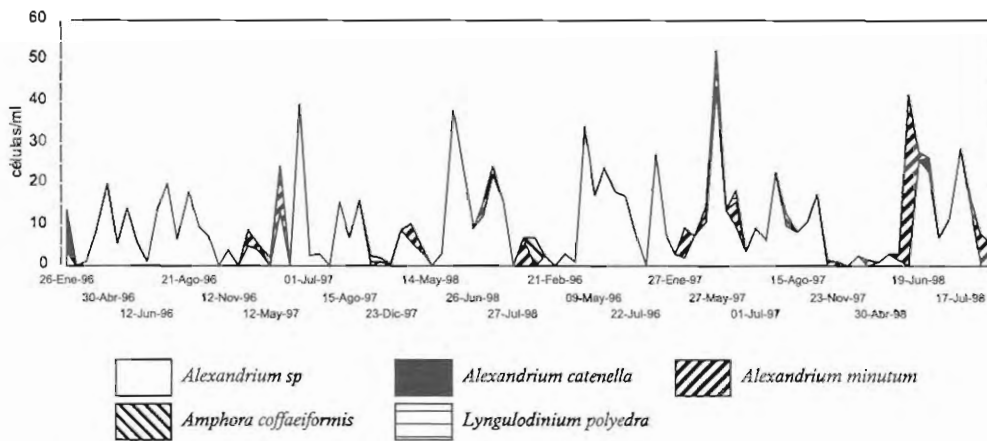
GYMNODINIALES Y PROROCENTRALES

Puerto 1996-1998



OTROS

Puerto 1996-1998



Figs.: 4 y 5: En las figuras superiores se resaltan las abundancias de las especies fitoplanctónicas potencialmente peligrosas que se han identificado en el interior portuario durante el periodo 1996 - 1998. Se observa que las concentraciones son normalmente muy bajas.

Concluyendo, se puede indicar que hasta la fecha no ha habido problemas de toxicidad en el interior de la zona de producción mejillonera, si bien debido a la existencia de diversas especies tóxicas, que se registran de forma habitual durante todo el ciclo anual, resulta extremadamente conveniente el mantenimiento de monitoring, y se hace necesario un replanteo de éste, especialmente en el sentido de poder realizar los controles de existencia o no de toxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

HASLE, R. 1978-. The inverted-microscope method. In: A. Sournia (ed.), *Phytoplankton manual*, p 88-96. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology.

TRHONDSSEN, J. 1978-. Preservation and storage. In: A. Sournia (ed.), *Phytoplankton manual*, p 69-74. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology.

EPISODIOS TÓXICOS DETECTADOS EN LAS RÍAS GALLEGAS DURANTE LOS AÑOS 1997 Y 1998: RESULTADOS Y EVOLUCIÓN.

M. Bermúdez de la Puente, C. Salgado y F. Arévalo

Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia. Peirao de Vilaxoán s/n, 36611 Vilagarcía de Arousa, Pontevedra

INTRODUCCIÓN

El Departamento de Biotoxinas del Centro de Control da Calidade do Medio Mariño, CCCMM, realiza el seguimiento y control de las biotoxinas de origen fitoplanctónico en los organismos marinos a lo largo de toda la costa de Galicia, con dos objetivos principales; por un lado salvaguardar al máximo la salud pública y ofrecer un producto de alta calidad y por otro minimizar las pérdidas económicas ocasionadas al sector acuicultor como consecuencia de cierres prolongados.

A través de los Decretos 116/1995, de 31 de marzo y 98/1997, de 14 de marzo se encuentra regulado el control de biotoxinas PSP -Paralytic Shellfish Poison-, DSP -Diarrhetic Shellfish Poison- y ASP -Amnesic Shellfish Poison- en moluscos bivalvos y otros organismos procedentes de la Pesca, el marisqueo y la acuicultura en la Comunidad Autónoma de Galicia. Se establece como método oficial de análisis el bioensayo en ratón para el control de biotoxinas PSP y DSP según los protocolos de la AOAC (1990) y Yasumoto 1978 respectivamente, y la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, CLAE, para el control de biotoxinas ASP.

En el laboratorio de cromatografía de este Departamento se realizan sistemáticamente análisis de biotoxinas PSP y DSP utilizando la cromatografía líquida de alta eficacia, como complemento analítico al bioensayo, con el propósito de conocer el perfil tóxico y como técnica de apoyo a la hora de verificar los resultados dudosos aportados por el bioensayo.

SEGUIMIENTO Y CONTROL

Por medio de la Orden de 14 de noviembre de 1995 se delimitan las áreas de producción y cultivo, según se trate de viveros flotantes de mejillón, moluscos bentónicos infaunales o moluscos bentónicos epifaunales (pectínidos). Se establecen en las Rías Bajas 50 subzonas de producción para las especies cultivadas en viveros flotantes, Mariño *et al.* (1998).

En el caso de mejillón cultivado en batea, para la toma de muestras, se establece uno o varios puntos fijos primarios en cada zona, considerados como los de más rápida afectación en caso de producirse un episodio tóxico. Para establecer el sistema de control de las zonas de producción y bancos marisqueros en aquellas áreas donde no existe cultivo de mejillón se

utiliza como bioindicador el mejillón de roca, estableciendo de la misma forma un punto fijo de muestreo. Se establecen así un total de 49 puntos fijos en las Rías donde el cultivo de mejillón es más intenso, 40 para moluscos infaunales y 19 para moluscos epifaunales, Mariño *et al.* (1998).

En la mayor parte de los análisis realizados en el Departamento de Biotoxinas del CCCMM se utiliza el mejillón ya que debido a su característica de gran filtrador se considera que es la primera especie en verse afectada por un episodio tóxico, de modo que, la ausencia de toxicidad en una muestra de mejillón se asocia con ausencia de toxicidad en las restantes especies sometidas a explotación, pasando a realizar análisis sobre otras especies una vez que se detecta toxicidad en el mejillón por encima de los límites legales.

Durante los años 1997 y 1998 se recepcionaron en este Departamento respectivamente 5758 y 5449 muestras de diferentes moluscos para la determinación de biotoxinas.

Los gráficos 1 y 2 representan el número total de análisis de las diferentes biotoxinas realizados durante estos años. Mientras que los gráficos 3 y 4 muestran la distribución de los moluscos analizados, correspondiendo al mejillón el 83.5 % del total de muestras analizadas durante el año 1997 y el 88.1 % en el año 1998.

Durante los años objeto de estudio se realizaron análisis mediante CLAE para la determinación de biotoxinas DSP utilizando el método de Lee *et al.* (1987). De esta forma se realizaron 643 análisis durante el año 1997 y 471 en el año 1998.

EVOLUCIÓN

Durante el año 1997 tuvieron lugar dos episodios tóxicos asociados a biotoxinas DSP que ocasionaron prohibiciones de extracción de diferentes moluscos.

En los meses de abril, mayo y junio se produjo un episodio tóxico causado por especies de género *Dinophysis* que ocasionó cierres en las Rías de Ares-Betanzos, Pontevedra y Vigo. Este episodio resultó especialmente virulento en la Ría de Pontevedra afectando a todas las zonas de la misma, mientras que las Rías de Muros-Noia y Arosa no resultaron afectadas.

En el mes de octubre, con la entrada en las Rías de Pontevedra y Vigo de concentraciones elevadas de diferentes especies del género *Dinophysis*, se producen cierres en la totalidad de dichas Rías, afectando de igual modo a la boca sur de la Ría de Arosa, zona IX. Estas áreas permanecen cerradas hasta finales del mes de noviembre.

Los gráficos 5, 6, 7 y 8 muestran los periodos del año en los que debido a la detección de biotoxinas DSP por encima de los límites legales se produjeron cierres en diferentes zonas. El gráfico 9 indica el total de días cerrados en cada subzona durante el año 1997.

Los cierres asociados a toxicidad tipo ASP en mejillón y moluscos bentónicos infaunales fueron, como es habitual, poco prolongados, afectando a todas las Rías, excepto a la Ría de Arosa, y tuvieron lugar en primavera y otoño. Se detectaron niveles de toxicidad de 108 μg ácido domoico/g de vianda en la Ría de Ares, 165 μg ácido domoico/g de vianda en la Ría de Muros-Noia, 117 μg ácido domoico/g de vianda en la Ría de Pontevedra y 43.7 μg ácido domoico/g de vianda en la Ría de Vigo.

Los gráficos 10, 11, 12 y 13 muestran los periodos de cierre por esta toxina en las

diferentes Rías. El gráfico 14 indica el total de días cerrados a lo largo del año 1997, por biotoxinas ASP en cada subzona.

En cuanto a los moluscos bentónicos epifaunales (pectínidos), durante el año 1997 se mantuvo la prohibición de extracción de vieira en toda la costa de la Comunidad Autónoma de Galicia decretada en el año 1995; únicamente se levanta la prohibición, a partir del mes de noviembre, en la zona media de la Ría de Arosa. Los valores de toxicidad alcanzados en la mayor parte de las Rías son cercanos a $200 \mu\text{g}$ ácido domoico/g de vianda, excepto en la Ría de Arosa donde el valor más alto alcanzado fue $95 \mu\text{g}$ ácido domoico/g de vianda en la zona más externa de la Ría.

El año 1998 fue un año mucho más complicado que el anterior en cuanto a toxicidad DSP se refiere; diferentes proliferaciones fitoplanctónicas del género *Dinophysis* causaron toxicidad tipo DSP. A partir del mes de mayo comenzaron a producirse cierres en todas las Rías: en algunas zonas de las Rías de Pontevedra, Vigo y Muros-Noia se mantuvo prohibida la extracción de manera constante hasta los últimos meses del año.

En los primeros días del mes de septiembre tuvo lugar una fuerte proliferación de *Dinophysis acuminata*, provocando el cierre de todas las zonas de las Rías de Muros-Noia, Arosa, Pontevedra y Vigo. A lo largo de este episodio se alcanzaron niveles de toxicidad muy elevados, llegando a detectarse $26.4 \mu\text{g}$ de ácido okadaico/g de hepatopáncreas en la zona III.1 de la Ría de Pontevedra.

Los gráficos del 15 al 24 muestran los periodos de cierre causados por toxicidad DSP en las diferentes Rías. El gráfico 25 indica los días de cierre totales en cada subzona durante el año 1998.

La evolución de la toxicidad detectada por CLAE a lo largo del año 1998 en la zona I.1 de la Ría de Vigo queda reflejada en el gráfico 29. Esta zona permanece cerrada desde el 4 de junio, con $3.2 \mu\text{g}$ de ácido okadaico/g de hepatopáncreas, hasta el 3 de diciembre. La toxicidad máxima alcanzada en esta zona fue de $7.7 \mu\text{g}$ de ácido okadaico/g de hepatopáncreas el 31 de agosto.

Al igual que en años anteriores los periodos de cierre asociados a toxicidad ASP fueron de corta duración y afectaron únicamente a las Rías de Ares y Pontevedra. Los gráficos 26 y 27 muestran los periodos de cierre en estas Rías. El gráfico 28 indica los días de cierre en cada zona durante el año 1998 provocados por este tipo de toxicidad.

Los niveles máximos de toxicidad en mejillón alcanzados en este año fueron de $57 \mu\text{g}$ ácido domoico/g de vianda en la Ría de Ares y $28.7 \mu\text{g}$ ácido domoico/g de vianda en la Ría de Pontevedra.

En cuanto a los molusco bentónicos epifaunales (vieira), los niveles de toxicidad siguen encontrándose por encima del límite legal, por tanto la prohibición de extracción establecida en el último trimestre del año 1995 sigue manteniéndose en vigor, excepto en la Ría de Arosa. Los niveles máximos de toxicidad alcanzados a lo largo de este año fueron de $160 \mu\text{g}$ ácido domoico/g de vianda en la Ría de Ares. Los valores detectados en el resto de las Rías se encuentran cercanos al límite legal establecido, con valores de $35.3 \mu\text{g}$ ácido domoico/g de vianda en la Ría de Muros-Noia, $23.5 \mu\text{g}$ ácido domoico/g de vianda en la Ría de Pontevedra y $25.7 \mu\text{g}$ ácido domoico/g de vianda en la Ría de Vigo para posteriormente volver a incrementarse a finales de año.

BIBLIOGRAFÍA

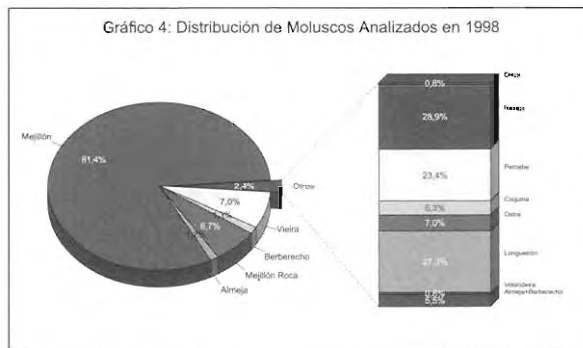
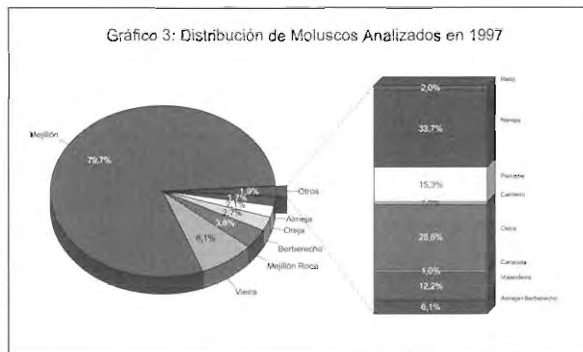
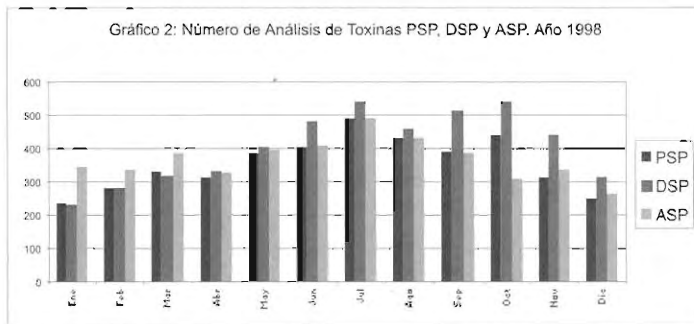
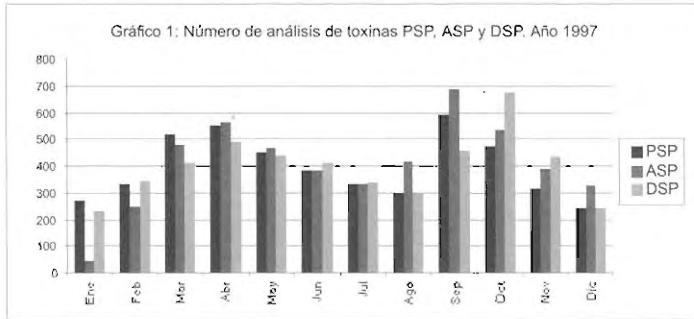
T. Yasumoto, Y. Oshima, M. Yamaguchi. "Ocurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tohoku District." Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 44, 1249 (1978).

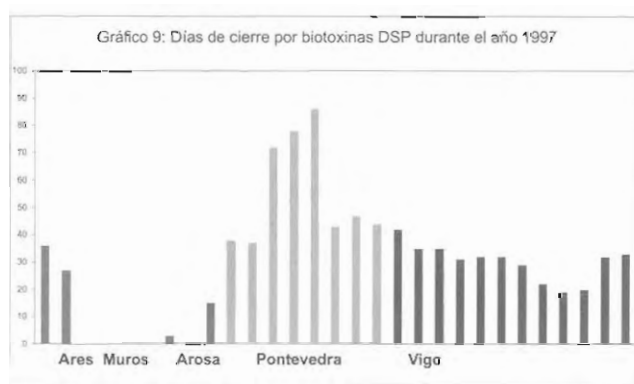
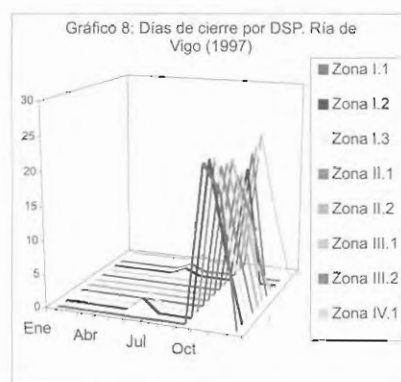
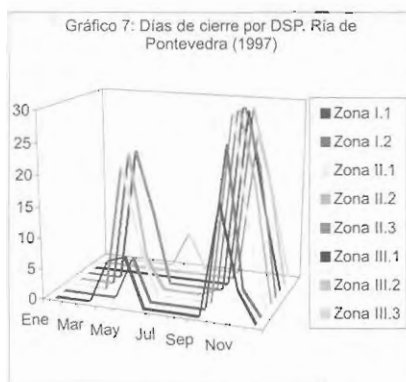
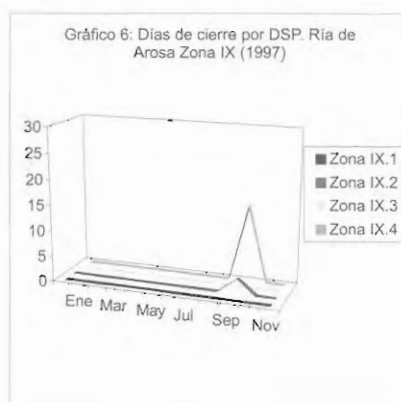
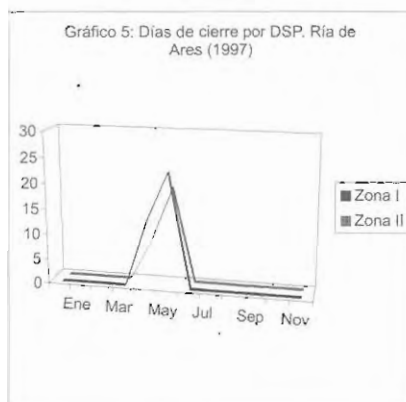
J. F. Lawrence, C. F. Charbonneau, C. Ménard. "Liquid Cromatographic Determination of Domoic Acid in Mussels Using AOAC Paralytic Shellfish Poison Extraction Procedure: Collaborative Study." J. Assoc. Off. Anal. Chem., 74, 68-72 (1991).

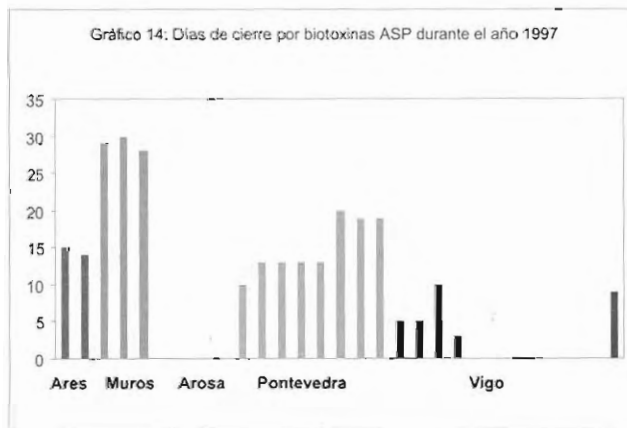
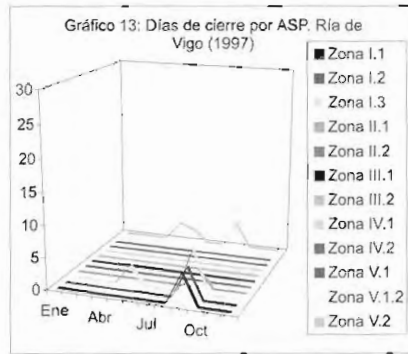
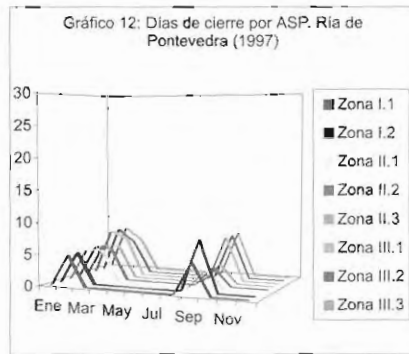
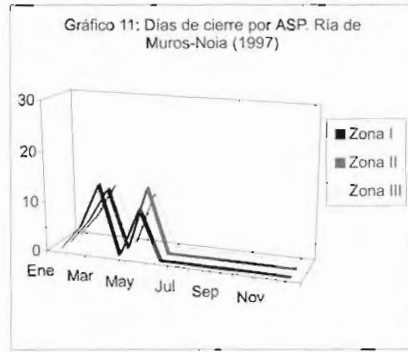
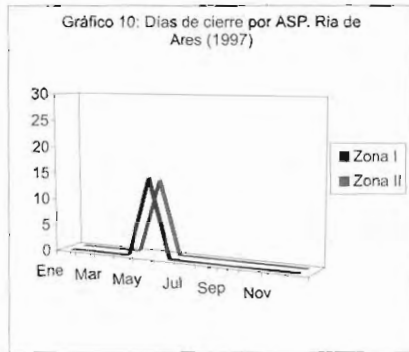
AOAC Official Methods of Analysis (1990).

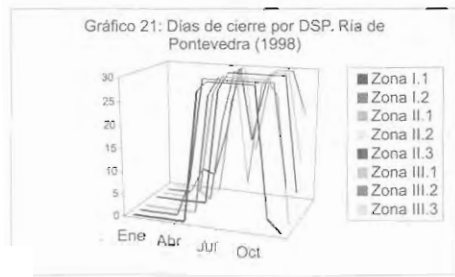
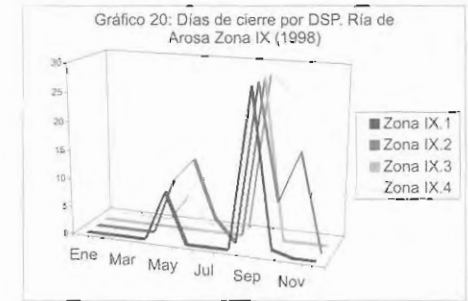
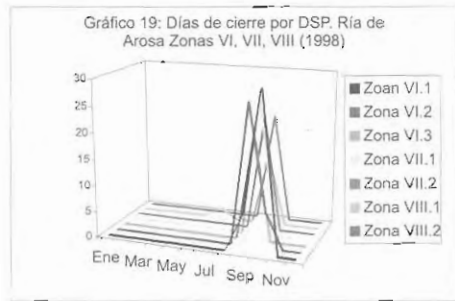
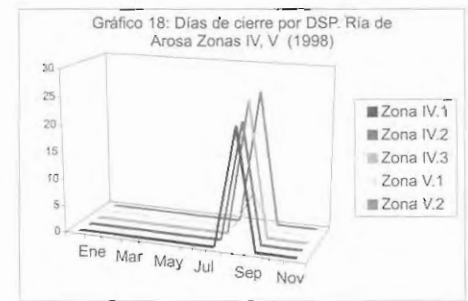
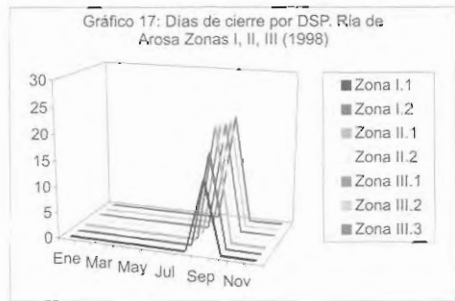
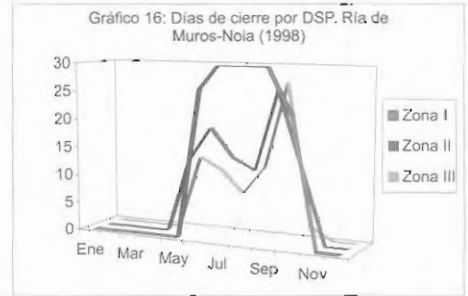
J. Mariño, J. Maneiro, J. Blanco. "The Harmful Algae Monitoring Programme of Galicia: Good Value for Money in Harmful Algae. B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández, and T. Waytt, Eds. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp 229-232 (1998).

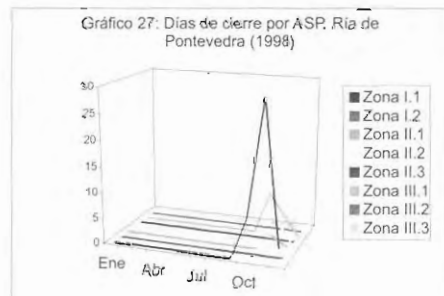
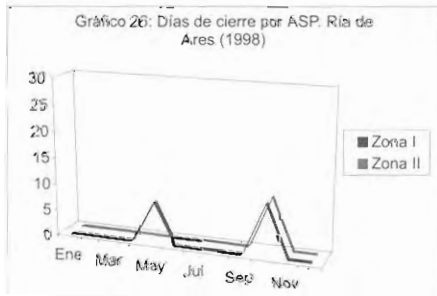
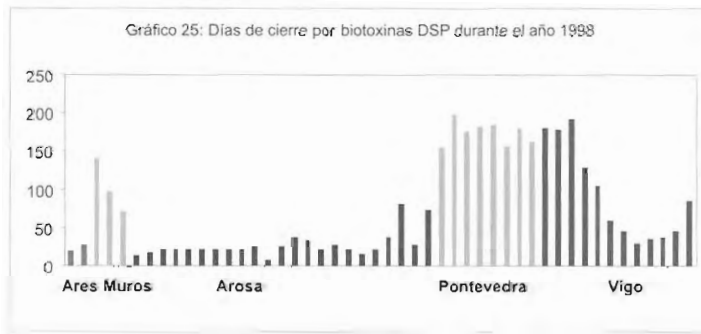
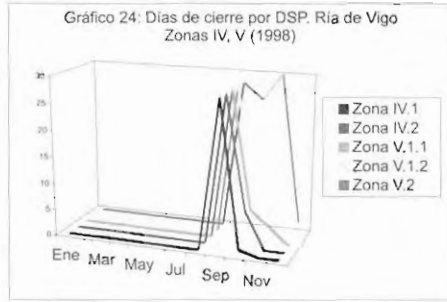
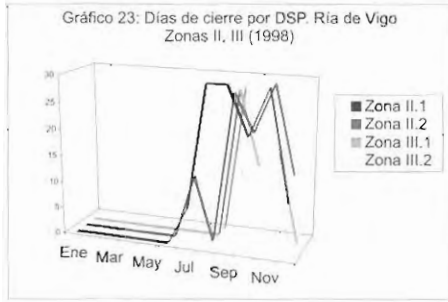
J.-S. Lee, T. Yanagi, R. Kenma, T. Yasumoto, Agric. Biol. Chem. 51, 877 (1987).

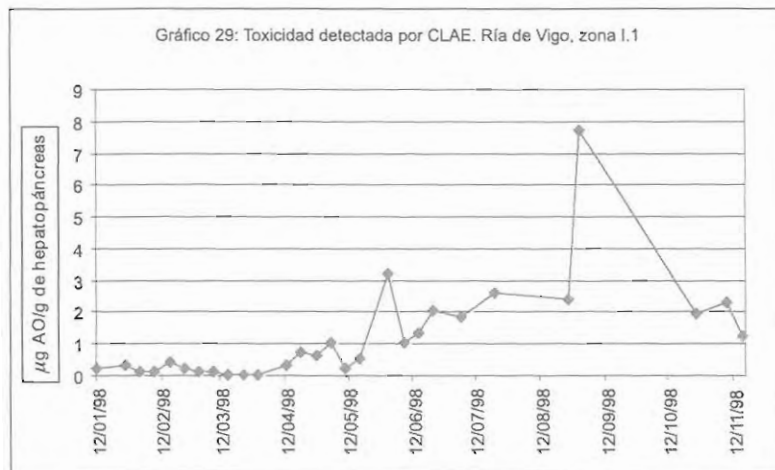












MONITORIZAÇÃO DE TOXINAS DIARREICAS NO ALGARVE EM 1998

Paulo VALE, Maria Antónia de M. SAMPAYO, Susana RODRIGUES, M^º João BOTELHO, Ana Paula PINTO, Susana GOMES
IPIMAR - Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1400-Lisboa, Portugal

RESUMO

Um surto de intoxicações diarreicas ocorreu no início de Fevereiro de 1998 entre consumidores de conquitilha (*Donax* spp.) da Província do Algarve. No plâncton ocorria *Dinophysis acuminata* e por bioensaio e cromatografia líquida foi confirmada a presença de toxinas diarreicas (DSP) nos moluscos. A contaminação dos moluscos algarvios com toxinas diarreicas prolongou-se desde o Inverno, pela Primavera até ao Verão.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises de HPLC foram realizadas segundo Lee *et al.*, 1987 modificado. Devido às reduzidas dimensões dos bivalves as extracções foram realizadas a partir da carne total em vez de hepatopâncreas. As hidrólises alcalinas foram descritas em Vale and Sampayo, 1999. Os bioensaios foram realizados de acordo com a adaptação do método de Lee *et al.* (1987) ao bioensaio descrito por Yasumoto *et al.* (1978).

RESULTADOS

EPIDEMIOLOGIA

No início de Fevereiro de 1998 cerca de 18 pessoas, entre funcionários do Centro de Saúde de Loulé e seus familiares, apresentaram diversas complicações após ingestão de conquitilhas.

Os sintomas incluíram, diarreia, vômitos, dores epigástricas e abdominais, fraqueza muscular e cefaleias. Estes sintomas desenvolveram-se ao longo de quatro dias (12 a 16 de Fevereiro). Apenas um acorreu ao Serviço de Urgência e os sintomas foram atenuando com medidas de suporte.

Foi possível recolher um resto de conquitilhas cruas e enviar para analisar pelo IPIMAR.

ANÁLISES

A pesquisa de *Salmonella* spp. deu negativa.

A cromatografia líquida confirmou a presença de ácido ocadaico na conquitilha em baixas

concentrações (Fig. 1a). Para além de ocorrer na forma livre, o ácido ocadaico foi também encontrado esterificado com ácidos gordos - derivados acilo. Estes derivados foram extraídos com hexano, e a clivagem dos ácidos gordos foi realizada por hidrólise alcalina. O ácido ocadaico libertado foi analisado recorrendo à derivatização com ADAM (Fig. 1b). Uma maior concentração de ácido ocadaico foi encontrada na forma esterificada do que na forma livre.

A toxicidade diarreica foi detectada na conchilha do Algarve durante um extenso período ao longo do ano de 1998 (Fig. 2). A contaminação com toxinas diarreicas coincidiu com a ocorrência no plâncton de espécies habitualmente causadoras de DSP na costa portuguesa: *Dinophysis acuminata* e *Dinophysis acuta* (Fig. 3). Durante o surto de intoxicações em Fevereiro o único dinoflagelado responsável pela toxicidade diarreica foi *Dinophysis acuminata*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As toxinas diarreicas foram responsáveis pelo surto de intoxicações humanas ocorrido em Loulé devido à ingestão de conchilhas. A presença de ácido ocadaico não foi exclusivamente responsável pelas intoxicações, mas sim todo o conjunto de ésteres desta toxina presentes nos bivalves.

Durante o ano de 1998 a toxicidade DSP foi a única responsável pelo encerramento da apanha e comercialização de moluscos bivalves vivos no Algarve. O estudo analítico desta toxicidade confirmou a sua prolongada ocorrência nesta região.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pelo programa PROPESCAS/Sanidade e Salubridade de Moluscos Bivalves, e PRAXIS XXI com o projecto nº 2/2.1/MAR/1718/95.

Agradecemos à Dra. Valentina Tavares de Sousa o envio da amostra de conchilha de Fevereiro e do relatório epidemiológico das intoxicações alimentares.

BIBLIOGRAFIA

- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R. and Yasumoto, T. (1987) Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 51 (3), 877-881.
- Vale, P. and Sampayo, M.A.M. (1999) Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37 (8), 1109-1121.
- Yasumoto, T., Oshima, Y. and Yamaguchi, M. (1978) Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44(11), 1249-1255.

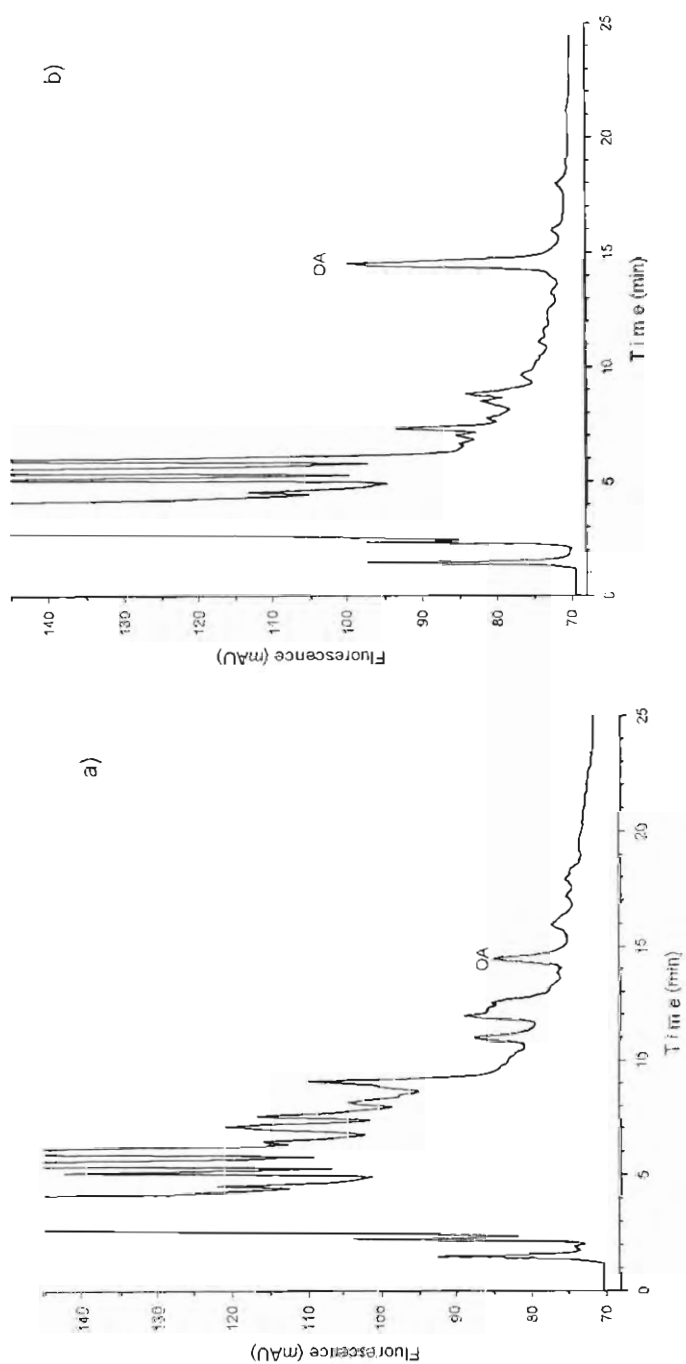


Fig. 1. a) Análise de conchilha colhida na Fuzeta/Olhão em 12 de Fevereiro de 1998 (9.5 ug OA/ 100g parte edível). Extracção metanólica de acordo com Lee et al.,1987. b) Fração hexano do extracto metanólico analisado em 1a, hidrolisada com hidróxido de sódio, e derivatizada com ADAM de acordo com Lee 1987. (33 ug OA equivalentes/ 100g parte edível).

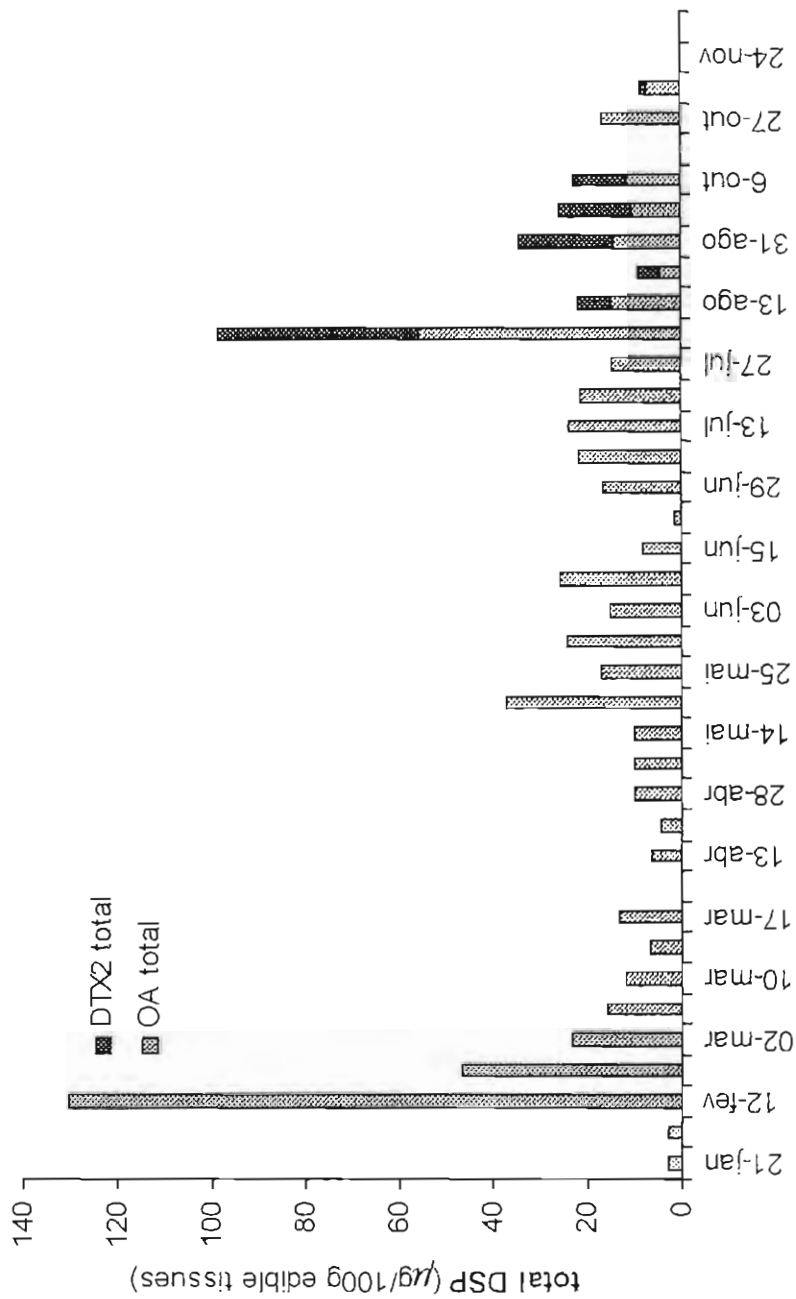


Fig. 2. Variação anual da concentração de ácido okadaico nas partes edíveis de conchas colhidas na zona de Olhão em 1998.

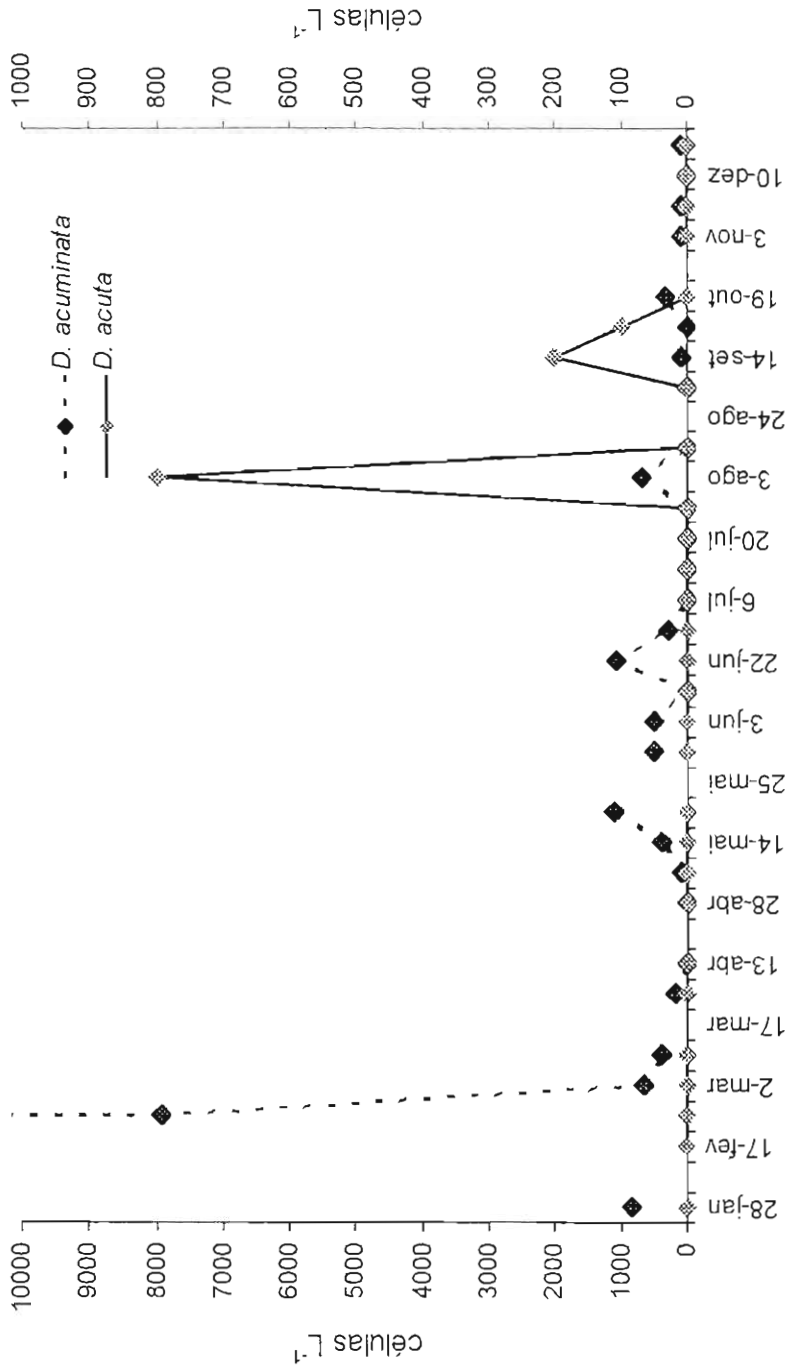


Fig. 3. Variação anual da concentração dos dinoflagelados responsáveis por DSP: *Dinophysis acuminata* e *D. acuta*.

MONITORIZAÇÃO DE TOXINAS AMNÉSICAS NA COSTA PORTUGUESA EM 1998

A. P. T. Pinto, M. A. de M. Sampayo, M. J. Botelho, P. Vale, S. Rodrigues, S. Gomes
IPIMAR - Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1400-Lisboa, Portugal

RESUMO

As toxinas amnésicas foram confirmadas pela primeira vez na costa portuguesa em 1995. Desde então têm sido encontradas regularmente nos moluscos bivalves mas durante curtos períodos, comparativamente com as toxicidades produzidas por dinoflagelados (DSP e PSP), que apresentam uma permanência nos moluscos bivalves mais prolongada. Em 1998 foram encontrados valores acima do limite de 20 μg ácido domóico / g parte edível no berbigão colhido na Ria de Aveiro e no mexilhão colhido em Caminha.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises de ASP de monitorização foram realizadas segundo AOAC (1991)¹, partindo do extracto aquoso preparado para o bioensaio em PSP.

A água do mar (1-2 litros) foi passada por uma rede de 90 μm e o fitoplâncton colhido num filtro de fibra de vidro Whatman GF/C. Seguiu-se extracção em água com sonda de ultrasons a 100W. O extracto foi analisado por HPLC após filtração por filtro de nylon 0.22 μm .

A confirmação da presença de ácido domóico nas amostras foi realizada por comparação espectral (DAD) com o padrão.

RESULTADOS

AMOSTRAGEM

Durante o ano de 1998, a amostragem foi realizada em 15 capitánias, cada uma com vários locais de recolha de águas e/ou bivalves para análise. A frequência da amostragem varia de semanal (Aveiro, Figueira da Foz), semanal menos regular (Lagos, Douro), quinzenal (Caminha, Faro), mensal (Olhão, Setúbal, Lisboa, Cascais, Peniche) e muito irregular (Viana do Castelo, Sines, Tavira e Vila Real de Santo António).

ANÁLISES DE FITOPLÂNCTON

A contagem de espécies do género *Pseudo-nitzschia* na Ria de Aveiro nas zonas Norte e Sul (figura 1) apresentou diversos picos ao longo do ano de 1998, só tendo, no entanto,

ocorrido espécies produtoras de ASP durante o Verão e Outono. As análises de ASP realizadas em fitoplâncton proveniente da Ria de Aveiro confirmaram a presença de ácido domóico no Verão e no Outono (figuras 2 e 3). As toxinas amnésicas detectadas no Verão não corresponderam no entanto a toxicidade detectável nos bivalves.

ANÁLISES DE BIVALVES

As toxinas amnésicas foram detectadas em bivalves colhidos nos vários locais de amostragem da costa portuguesa, especialmente durante o Outono. Apresentam-se na figura 4 os valores de ácido domóico obtidos para o berbigão, *Cerastoderma edule*, proveniente da Ria de Aveiro. Em 26 de Outubro, o teor foi de 21.5 μg DA/g parte edível, o maior verificado nesta zona e ligeiramente superior ao limite de segurança regulamentado para a presença de ácido domóico em moluscos bivalves comercializáveis, 20 μg ácido domóico/g parte edível de molusco. Pela observação da tabela 1, verifica-se a ocorrência de concentrações vestigiárias em várias das capitânias amostradas, com valores de concentração em ácido domóico entre 0.3 e 10 μg ácido domóico/g parte edível de molusco e distribuição temporal no final do Verão e todo o Outono.

Foram ainda encontrados valores superiores a 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ no mexilhão colhido em Caminha no início de Novembro, com 22,6 μg ácido domóico/g parte edível de molusco.

CONCLUSÕES

No Verão de 1998 a presença de toxicidade no fitoplâncton não correspondeu à presença de toxicidade detectável nos bivalves.

Em 1998 as toxinas amnésicas foram detectadas em bivalves colhidos em diversos locais da costa portuguesa, especialmente durante o Outono.

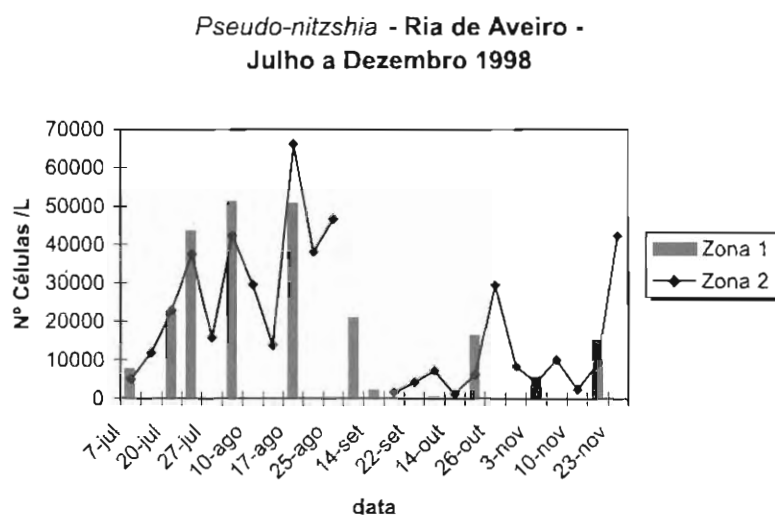


Figura 1. - Contagem de espécies do género *Pseudo-nitzschia* na Ria de Aveiro nas zonas Norte (zona 1) e Sul (zona 2).

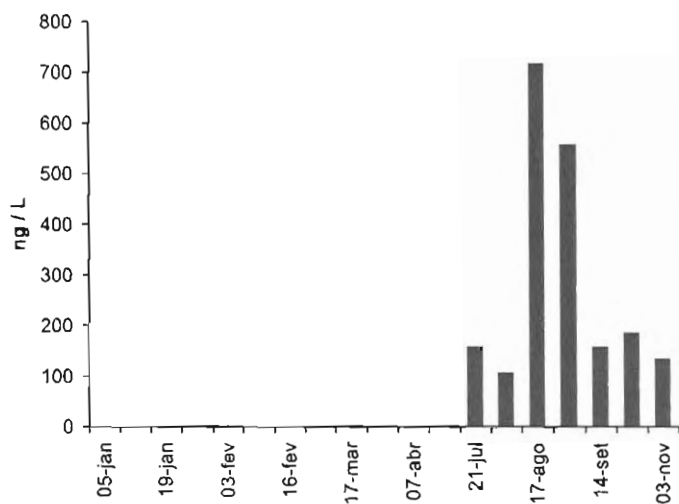


Figura 2 - Concentração de ácido domóico em amostras de fitoplâncton colhido na Ria de Aveiro em 1998.

Foram detectados valores de ASP acima de 20 μg ácido domóico/g parte edível de molusco em ocasiões pontuais em bivalves da Ria de Aveiro e de Caminha.

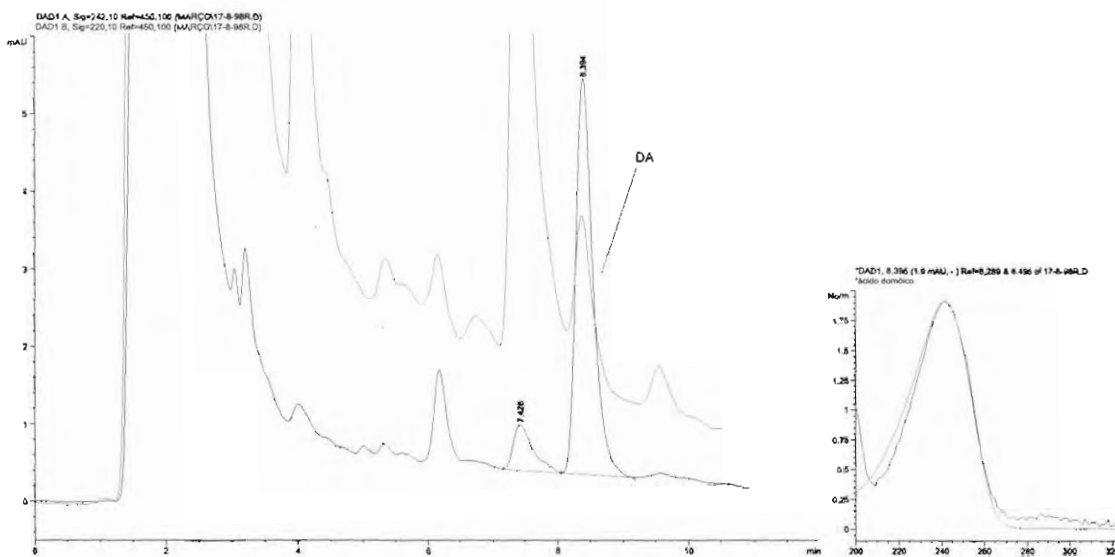


Figura 3 - Análise de fitoplâncton colhido na Ria de Aveiro em 17 de Agosto de 1998 (718 ng DA/L água do mar). À direita: comparação entre o espectro colhido no ápice do pico com o do padrão de ácido domóico.

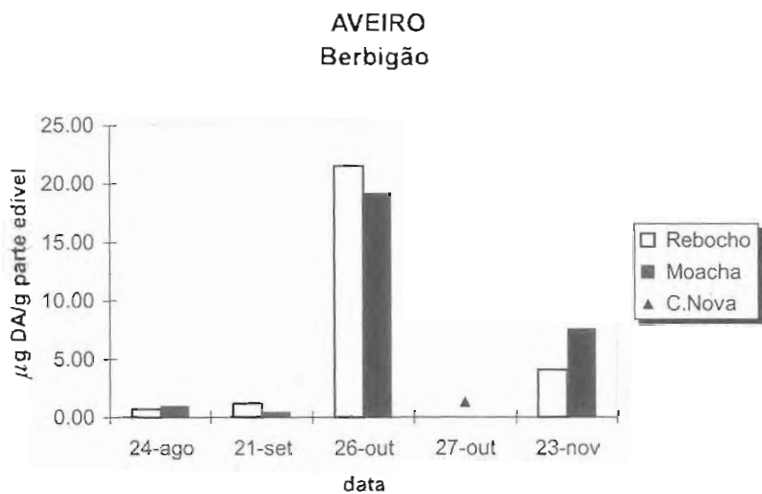


Figura 4 - Níveis de ácido domoico (1998) encontrados no berbigão nas três zonas de amostragem da Ria de Aveiro, correspondentes à zona Norte da Ria.

Tabela 1 - Quantidades vestigiárias de ácido domoico detectadas em 1998.

Espécie	Capitania	Ocorrência	µg ácido domoico/g parte edível de molusco
Berbigão	Aveiro	Agosto	0.3-1.1
Ostra		Setembro	0.5-1.2
Longueirão		Outubro	1.3-6.9
A.boa		Novembro	4.0-7.6
Mexilhão	Cascais	Julho	1.1
A.branca	Douro	Agosto	0.7
A.macha	Lisboa	Setembro	10.0

REFERÊNCIAS

1 - AOAC (1991). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, secs.991.26.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pelos programas PIDDAC/PROPESCAS/Sanidade e Salubridade de Moluscos Bivalves, e PRAXIS XXI com o projecto nº 2/2.1/MAR/1718/95.

EL MUESTREO DE PUERTOS EN LA COSTA CATALANA: RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE FITOPLACTON NOCIVO (95-98) Y EL CASO CONCRETO DE *Alexandrium catenella*.

Vila, M1., M. Delgado1, E. Garcés1, J. Camp1 y D. Furones2

1Institut de Ciències del Mar, Pg. Joan de Borbó, s/n, 08039 Barcelona, SPAIN

2Centre d'Aqüicultura de IIRTA, St. Carles de la Ràpita, Tarragona, SPAIN

RESUMEN

A partir del diseño de muestreo de puertos presentado en la anterior Reunión Ibérica se ha elaborado una base de datos que contempla la distribución espacial y temporal de especies de fitoplancton productoras de toxinas PSP y DSP en la costa catalana desde julio del 95 y hasta el momento actual y ASP desde el 98. Además de las múltiples detecciones de blooms en las aguas confinadas de los puertos, con éste plan de muestreo también se ha detectado la proliferación de *Alexandrium catenella* del verano del 98 (finales de mayo-medianos de julio) que afectó una tercera parte del litoral catalán, y estuvo asociado a elevadas concentraciones de toxicidad PSP tanto en aguas libres (hasta 784 μg PSP/100 g carne) como confinadas (hasta 983 μg PSP/100 g carne).

INTRODUCCIÓN

Clásicamente se han definido a los dinoflagelados productores de mareas rojas como organismos del plancton que proliferan en ambientes con elevadas concentraciones de nutrientes y en condiciones de estabilidad de la columna de agua (Margalef 1978, Margalef *et al.* 1979), a diferencia de las diatomeas que lo hacen en condiciones de elevada turbulencia. Actualmente y debido a la humanización del litoral, se da un mayor grado de eutrofización de las aguas costeras. El incremento en las descargas de nutrientes inorgánicos y el confinamiento de las aguas junto con un aumento de la estabilidad del sistema) incrementa la probabilidad de desarrollo de proliferaciones de dinoflagelados en la costa. Con estas premisas, se decidió hacer un Plan de seguimiento de organismos formadores de HAB basándose en el muestreo de puertos (Vila *et al.* 1998), sustituyendo al anterior que consistía en la toma de muestras, con baja frecuencia, en las áreas de producción de marisco (aguas abiertas) y que daba pocos o escasos resultados.

El objetivo de éste plan es, por una parte, conocer las especies potencialmente tóxicas o nocivas, su distribución a lo largo de la costa catalana y su estacionalidad, al mismo tiempo que detectar con la mayor rapidez posible los desarrollos de dinoflagelados productores de toxinas que por la vía trófica pueden tener efectos nocivos en el hombre.

En la V Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas se presentaron los primeros resultados del seguimiento de fitoplancton tóxico y/o formador de discoloraciones en zonas confinadas de la costa catalana. Este seguimiento empezó en julio de 1995, y aunque las series temporales obtenidas hasta el momento de la última Reunión fuesen cortas (julio 95- diciembre 96) los resultados presentados parecían ser prometedores. Actualmente disponemos de series de casi 4 años, y los resultados obtenidos se exponen a continuación.

METODOLOGÍA

Área de muestreo - Los puntos de muestreo (puertos principalmente y alguna playa) corresponden a las tres áreas geográficas de la costa catalana: costa norte (bahía de Cadaqués y puertos de Roses, Empúries, Estarrit, Palamós y St. Feliu), costa central (puerto de Blanes, playa de Calella de Mar, puerto de Arenys de Mar, puerto de Premià de Mar, playa de Badalona, Port Olímpic y puerto de Barcelona) y costa sur (playa de la Murtra y Castelldefels y puertos de Garraf, Vilanova i la Geltrú, Coma-ruga y Les Cases).

Estrategia de muestreo - Se toma una muestra por puerto, semanalmente en verano (mayo-octubre) y quincenalmente en invierno (noviembre-abril). La muestra se toma en el punto de máximo confinamiento de las aguas, en superficie y durante las horas de luz, por el carácter migratorio de gran parte de los dinoflagelados que se encuentran en superficie durante el día y en el fondo de la columna de agua durante la noche. Además se mide temperatura y salinidad. El Plan de seguimiento contempla un muestreo ampliado en el espacio y en el tiempo en las situaciones en que se detectan elevadas concentraciones de un organismo tóxico. Se toman varias muestras de fitoplancton en el interior del recinto portuario y exterior, y muestra de moluscos bivalvos para el análisis de toxicidad por bioensayo con ratón. En el caso en que se detecten elevadas concentraciones de dicho organismo tóxico en el exterior del puerto, el muestreo -tanto de fitoplancton como de moluscos- se extiende a los puertos limítrofes y aguas colindantes.

Muestras y cuantificación de fitoplancton - Las muestras se fijan con formol al 1%. Se sedimentan 50 ml y al cabo de 24 h. se hacen los contajes de los organismos nocivos con un microscopio invertido. Los organismos cuantificados se pueden agrupar como los que producen toxicidad PSP (género *Alexandrium*) y los que producen toxicidad DSP (género *Dinophysis*, *Prorocentrum lima*, *P. mexicanum* y *Ostreopsis* sp.). En los últimos años se ha atribuido a determinadas especies de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (*P. multiseriata* y *P. pungens*) como potenciales productoras de toxicidad ASP (ácido domoico). Debido a que en el Mar Mediterráneo no se ha demostrado la existencia de toxicidad ASP y por la difícil identificación de las especies del género (requiere SEM), de momento se agrupan todas como *Pseudo-nitzschia* spp. Este género se ha empezado a cuantificar en 1998. A pesar de no tratarse de un organismo tóxico, también se ha cuantificado *Gyrodinium impudicum* debido a la magnitud en abundancia y extensión de sus discoloraciones.

RESULTADOS

En la tabla 1 se detallan las especies potencialmente tóxicas o formadoras de blooms en nuestras costas, su concentración máxima, su distribución temporal y espacial.

Si agrupamos las especies según sus abundancias podemos diferenciar entre (1) especies que no hacen blooms (*Coolia* sp., *D. acuta*, *D. hastata*, *D. ovum*, *D. tripos*, *D. caudata*, *D. rotundata*, *D. sacculus*, *P. lima*, *Leptodiscus medusoides*) y (2) especies formadoras de

proliferaciones, ya sean confinadas en puertos (*A. minutum*, *A. tamarense*, *A. taylori*, *G. corsicum*, *Ostreopsis* sp. y *P. mexicanum*) o extensas (*A. catenella*, *G. impudicum*, *Noctiluca scintillans*, *Pseudo-nitzschia* spp.).

A grandes rasgos podemos establecer la distribución estacional de las especies tóxicas o nocivas del litoral catalán. La mayor parte de ellas són especies típicamente de verano (*A. catenella*, *A. tamarense*, *A. taylori*, *D. tripos*, *D. caudata*, *D. rotundata*, *P. lima*, *G. impudicum* y *Leptodiscus medusoides*); en otoño se observan especies bentónicas como *P. mexicanum*, *Ostreopsis* sp. y *Coolia* sp.; *G. corsicum* realiza sus proliferaciones en el Delta del Ebro durante el invierno; y en primavera ocurren los blooms de *Noctiluca scintillans* y *A. minutum* (a pesar que esta última ha estado presente en el plancton a lo largo de todo el año, considerando todas las localidades). Finalmente, *D. sacculus*, *D. acuta*, *D. ovum* y las diatomeas *Pseudo-nitzschia* spp. están presentes en el plancton a lo largo de todo el año, pero siendo más abundantes durante los meses cálidos.

Uno de los objetivos del estudio es llegar a definir un zonación del litoral catalán por lo que se refiere a las especies tóxicas o nocivas del plancton. Aquí se presenta una primera aproximación, agrupando las especies según se hayan detectado a lo largo de toda la costa (*A. minutum*, *A. tamarense*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. ovum*, *D. tripos*, *D. sacculus*, *P. lima*, *L. medusoides*, *N. scintillans* y *Pseudo-nitzschia* spp.), en la zona de la Costa Brava (*D. rotundata*, *P. mexicanum*, *A. taylori*, *Coolia* sp., *Ostreopsis* sp.- ésta última presenta una distribución más dispersa, con elevadas concentraciones en el puerto del Garraf-), en la costa central (*G. impudicum*) y en la bahía de Alfacs (*G. corsicum*). *A. catenella* es presente en todo el litoral excepto en la Costa Brava y el Delta del Ebro.

EL CASO DEL *Alexandrium catenella*

Primeras detecciones

Esta especie se detectó por primera vez en nuestras costas durante el verano (agosto-setiembre) del 1996 en el puerto de Barcelona, presentando un máximo de concentración en agosto (4×10^4 cels/L). Se observó alguna presencia aislada (< 150 cels/L) en los puertos de Vilanova, Olímpico y Arenys.

En verano de 1997, *A. catenella* estuvo presente en el puerto de Barcelona desde principios de julio hasta mediados de setiembre, presentando 2 máximos de entre $1 - 9 \times 10^5$ cels/L en julio y setiembre. Durante éste verano se detectaron concentraciones de entre $5 \times 10^3 - 2 \times 10^4$ cels/L en diversos muestreos en los puertos de Vilanova y Olímpic.

En verano de 1998 se detectaron dos importantes blooms de *A. catenella* confinados en los puertos de Tarragona y Barcelona. El primero se detectó a finales de mayo y presentó concentraciones máximas de entre 30 y 80 millones de células/L (3 de junio) en dársenas interiores del puerto. Además, se observaron unas bandas rojizas a la altura de la bocana del puerto y en el exterior, con concentraciones de 6 - 7 millones de cels/L en las muestras más interiores y 2×10^4 cels/L en las exteriores. A los 10 días las concentraciones en el puerto habían decaído de forma importante pasando a ser inferiores a 2×10^3 cels/L. Cabe destacar que en el muestreo de ese día (12 de junio) y en todos los puntos se observaron elevadas concentraciones de quistes de *A. catenella* ($1,5 \times 10^4 - 1,1 \times 10^5$ cistes/L), teca's vacías ($2 \times 10^4 - 1,5 \times 10^5$ tecas/L) y quistes vacíos ($1 \times 10^3 - 6 \times 10^4$ cistes/L) debido a la infección de un parásito que infecta las células de *A. catenella* (Delgado 1999). En consecuencia, el día 17 de Junio no se observaron células de éste dinoflagelado. Posteriormente hubo un rebrote del

“bloom” de hasta $8,6 \times 10^5$ cels/L el día 8 de Julio. El seguimiento del rebrote fue más laxo debido a que no se observaron células en el exterior del puerto ni se detectó toxicidad. A pesar que en el primer bloom la comunidad fitoplanctónica era prácticamente mono-específica, en el rebrote *A. catenella* estuvo acompañado del dinoflagelado *Gyrodinium impudicum*.

En el puerto de Barcelona se detectaron las primeras células a finales de mayo y de forma aislada, pero no fue hasta el 5 de julio que se produjo la proliferación observándose coloración roja debido a una concentración de 20 millones de cels/L. Al igual que en 1997 se detectaron 2 máximos, uno el 4 de Julio (60 millones de cels/L) y otro el 9 de agosto (7.7 millones de cels/L), y se observaron células hasta mediados de setiembre. En todo momento el dinoflagelado *Gyrodinium impudicum* estuvo como especie acompañante y siguiendo la misma dinámica que *A. catenella*.

Aparte de estos dos “blooms” confinados, entre los puntos de muestreo rutinarios del monitoring a lo largo de la costa se aumentó el número de puertos en los que se observó el organismo, así se halló en Coma-ruga, Vilanova, Garraf, Castelldefels, port Olímpic y Calella en concentraciones de entre 1×10^3 - 8×10^4 cels/L, entre los meses de mayo-julio.

Un “bloom” extenso de *A. catenella* en la costa sur de Catalunya (verano 98)

La detección de células de *A. catenella* a finales de mayo del 98 en 3 estaciones rutinarias sucesivas de monitoreo (Coma-ruga, Vilanova y Garraf), junto con el “bloom” ya mencionado en el puerto de Tarragona y la detección de toxicidad PSP (Tabla 2) en moluscos marisqueados en el puerto de Coma-ruga fue el motivo por el cual se intensificó el muestreo en la zona, detectándose un extenso “bloom” de *A. catenella* en la costa sur de Catalunya. Se realizaron recuentos celulares y análisis de bivalvos (toxicidad PSP) hasta medianos de julio, cuando finalizó el “bloom”.

A principios de junio se muestreó intensivamente una extensa área (desde l'Ametlla hasta Vilanova) y se detectaron células de *A. catenella* tanto en aguas libres como confinadas. Concentraciones celulares superiores a 10^4 cels/L en aguas libres fueron observadas hasta el 10 de junio en la costa sur de Catalunya, después solo se detectaron concentraciones elevadas en áreas confinadas como los puertos de Vilanova (hasta principios de Julio) y Tarragona (hasta finales de Agosto). En la distribución espacio-temporal del “bloom” *A. catenella* en la mitad sur de Catalunya se pueden distinguir las distintas fases de la secuencia de la proliferación, con una fase inicial (25 al 31 Mayo) con elevadas concentraciones que corresponde a la expansión del “bloom”, a los 10 días, aprox., se llega a la extensión máxima del “bloom” asociada a toxicidades positivas (y negativas) durante 2 semanas (1-15 Junio), a partir de las cuales las concentraciones decaen aunque siguen existiendo detecciones de toxicidad PSP positivas (16-22 Junio). A las 5-6 semanas (23 Junio-7 Julio) sólo se detectan concentraciones elevadas en el interior de determinados puertos y las toxicidades en el exterior son todas negativas. A medianos de julio ya solo se observan células en el mencionado “bloom” del puerto de Tarragona, y se inicia el también mencionado “bloom” confinado en el puerto de Barcelona.

Entre el 4 y 10 de junio se observaron las toxicidades más elevadas del “bloom” de *A. catenella* de la mitad sur de Catalunya. El valor máximo fue detectado en las proximidades del puerto de Tarragona ($983 \mu\text{g}$ PSP/ 100 g carne), también se detectaron concentraciones muy elevadas en aguas libres (hasta $784 \mu\text{g}$ PSP/ 100 g en Torre de la Mora).

Durante tres semanas (1 a 21 de junio) se cerró la extracción de bivalvos en la zona, avisando por los canales habituales a las instituciones involucradas y a la población a través de la prensa local. No tenemos constancia de que se produjesen intoxicaciones.

CONCLUSIONES

El sistema de muestreo de puertos parece ser adecuado para la detección de proliferaciones -especialmente de dinoflagelados- en la costa Mediterránea en donde hay una fuerte humanización y en donde la cantidad de agua confinada es elevada debido a la existencia de muchos puertos.

Se ha detectado un gran número de proliferaciones localizadas en las aguas confinadas de los puertos, y al menos en el caso del "bloom" de *Alexandrium catenella* del sur de Catalunya, también ha demostrado ser efectivo para la detección de proliferaciones extensas de costa libre. El elevado número de registros de dinoflagelados potencialmente tóxicos o nocivos detectado en el muestreo de los puertos ha permitido conocer la distribución y estacionalidad de distintas especies relacionadas con "HAB's" en nuestra área de costa y ha ampliado la lista de especies nocivas en la misma (*Alexandrium catenella*, *Ostreopsis* sp., *Coolia* sp.).

BIBLIOGRAFÍA

- Ballantine, D.L., T.R. Tosteson, A.T. Bardales 1988. Population dynamics and toxicity of natural populations of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto Rico. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 119, 201-212.
- Bomber, J.W., K.E. Aikman 1988/1989. The ciguatera dinoflagellates. In : [Eds.] *Biological Oceanography*, pp 291-311.
- Delgado, M. 1999. Descubrimiento de un nuevo parásito de la dinoflagelada tóxica *Alexandrium catenella*: aplicación en el control biológico de las proliferaciones nocivas de fitoplancton. In VI Reunión Ibérica sobre Fitoplancton tóxico y Biotoxinas. Sevilla
- Delgado, M., Matamoros, E., Vila, M., Garcés, E. & Camp, J. 1998. Seguimiento del fitoplancton nocivo en la Costa Catalana en los años 1995-96. In J. M. Vieites & F. Leira (Ed.), V Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico, (pp. 25-35). Vigo: ANFACO-CECOPECA.
- Margalef, R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* 1, 493-509.
- Margalef, R., Estrada, M. & Blasco, D. 1979. Functional morphology of organisms involved in red tides, as adapted to decaying turbulence. In Toxic dinoflagellate blooms. Proc. 2nd Int Conf. Elsevier.
- Vila, M., Camp, J., Delgado, M. & Maso, M. 1998. Detección de proliferaciones algales en aguas confinadas. In J. M. Vieites & F. Leira (Ed.), V Reunión Ibérica de Fitopláncton Tóxico y Biotoxinas, (pp. 43-48). Vigo: ANFACO-CECOPECA.

Tabla 1. Especies potencialmente tóxicas o formadoras de "blooms" en el litoral catalán.

Especie	Toxicidad potencial o efecto nocivo	Concentración máxima (Cels/L)	Estacionalidad	Zona afectada
<i>Alexandrium catenella</i>	PSP	$> 10^6$	Verano	Toda la costa excepto Delta Ebro y C. Brava
<i>Alexandrium minutum</i>	PSP	$> 10^6$	Todo el año (blooms en primavera)	Toda la costa
<i>Alexandrium tamarense</i>	PSP	10^5	Verano	Toda la costa
<i>Alexandrium taylori</i>	Discoloraciones	$> 10^6$	Verano	Costa Brava
<i>Coolia</i> sp.	Bentónico*	300	Otoño	Costa Brava
<i>Dinophysis acuta</i>	DSP	140	Todo el año	Toda la costa
<i>Dinophysis caudata</i>	DSP	2600	Verano	Toda la costa
<i>Dinophysis hastata</i>	DSP	40	Primavera	Ocasional
<i>Dinophysis ovum</i>	DSP	260	Todo el año	Toda la costa
<i>Dinophysis rotundata</i>	DSP	2700	Verano	Costa Brava
<i>Dinophysis sacculus</i>	DSP	35000	Todo el año	Toda la costa
<i>Dinophysis tripos</i>	DSP	560	Verano	Toda la costa
<i>Gyrodinium corsicum</i>	Ictiotóxico	$> 10^6$	Invierno	Alfaes
<i>Gyrodinium impudicum</i>	Discoloración	$> 10^6$	Verano	Toda la costa (blooms en costa central)
<i>Leptodiscus medusoides</i>	Productor de mucus**	160	Verano	Toda la costa
<i>Noctiluca scintillans</i>	Discoloración	160	Primavera	Toda la costa
<i>Ostreopsis</i> sp.	Bentónico*	78000	Otoño	Esparso
<i>Prorocentrum lima</i>	Bentónico; DSP	2000	Verano	Toda la costa
<i>Prorocentrum mexicanum</i>	Bentónico; DSP	22000	Otoño	Costa Brava
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	ASP	10^6	Todo el año (blooms en primavera)	Toda la costa

Bentónico*: organismos asociados al fenómeno de la ciguatera en aguas tropicales (Ballantine 1988, Bomber 1988/1989); Productor de mucus** (Delgado et. al 1998)

Tabla 2. Toxicidad PSP en moluscos en las distintas estaciones durante el "bloom" de *A. catenella* en la mitad sur de Catalunya (Mayo-Junio 98).

Fecha	Estación	$\mu\text{g PSP}/100\text{ g.}$
18/5 al 24/5	...	no analizado
25/5 al 31/5	Coma-ruga	>80
1/6 al 7/6	Torre de la Mora	784
	Altafulla	527
	Port de Tarragona	983
8/6 al 14/6	Platja Vandellós	449
	Pta. Salou	536
	Platja Ametlla	89
15/6 al 21/6	Port Tarragona	235
	Platja Vandellós	127
	Pta. Salou	126
22/6 al 28/6	...	<80

SEGUIMIENTO Y CONTROL DE BIOTOXINAS MARINAS EN MOLUSCOS PROCEDENTES DE CENTROS DE DEPURACIÓN

Antonio B. Lozano León, Jaime Martínez Urtaza, Gustavo Hernández Cordoba, Eva M^a Alvarez Suarez, Beatriz Castroman Romero
Unidad de Control de Moluscos
Instituto de Acuicultura
Universidad de Santiago de Compostela.

INTRODUCCIÓN

La depuración es un proceso cuya necesidad surge como consecuencia del paulatino incremento de la contaminación en las aguas en las que se realizan los cultivos marinos de moluscos, teniendo como objetivo principal disminuir de forma considerable el contenido de gérmenes o microbios con potencialidad de causar enfermedades en el ser humano, esencialmente las de tipo gastrointestinal.

Una depuradora de moluscos es en esencia una instalación para esterilizar agua de mar que se va a suministrar a los moluscos bivalvos, manteniendo en lo posible las instalaciones bajo unas condiciones similares a las del medio natural. El proceso de depuración dura un tiempo aproximado de 48 horas y consiste en el lavado de la flora bacteriana que se halla en el interior del molusco, reduciéndola a los límites permitidos por la normativa legal vigente.

La Directiva del Consejo 91 / 492 / CEE, del 15 de Julio de 1.991, por la que se fijan en el ámbito comunitario, las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos, así como los requisitos técnicos - sanitarios que deberán cumplir los moluscos destinados al consumo humano inmediato; contemplan las características visuales, microbiológicas y de contenido en biotoxinas, toxina paralizante (PSP), y toxina diarreica de los moluscos (DSP). De la transposición de esta directiva surge el Real Decreto 571/ 1999 del 9 de Abril con el mismo tema y en él, se adapta a nuestras particularidades la forma y contenido de dicha directiva. Se hace referencia al Decreto 116/1.995 publicado en el DOG no.87 de 8-5-95 por la Conselleria de la Presidencia y Administración Pública " por el que se regula el control de biotoxinas en moluscos bivalvos y otros organismos procedentes de la pesca, marisqueo y acuicultura "

En la actualidad, de un total de 80 depuradoras de moluscos en toda España 65 se encuentran en Galicia y de estas, 40 se han asociado y constituido la Asociación Gallega de Empresarios Depuradores de Moluscos (AGADE). Ante esto, en respuesta a las demandas de la administración se firmó un contrato entre dicha Asociación y la Universidad de Santiago de

Compostela refiriendo en la primera cláusula de dicho contrato la prestación por parte de la U.S.C. del asesoramiento y asistencia técnica en el control de salubridad de moluscos para AGADE creándose de esta forma la Unidad de Control de Moluscos (U.C.M.) adscrita al Instituto de Acuicultura de dicha Universidad.

El laboratorio de biotoxinas de la Unidad de Control de Moluscos establece dos periodos de tiempo para los muestreos de toxinas: período normal (PN) y periodo especial (PE), para el primero se toman cuatro muestras mensuales por cada depuradora, teniendo en cuenta (Fig.3) el tipo de molusco, número de lote, fecha y hora de entrada al centro, zona y subzona de cultivo, tiempo de permanencia en depuración, número de piscina y ría o país de procedencia; aunque por normativa del laboratorio se hace al mes una muestra de cero horas, es decir sin depurar.

De acuerdo con los resultados analíticos obtenidos por el Departamento de Biotoxinas del Centro de Control da Calidade do Medio Mariño (CCCMM), en caso de cierres cautelares o totales en zonas productivas se establece el periodo especial (PE) intensificando los muestreos de moluscos provenientes de dichas zonas, notificando a cada empresa la presencia o ausencia de cada toxina y posibles medidas a tomar en cada caso.

Las técnicas empleadas para estos análisis son el ensayo biológico, según los protocolos de la AOAC (1990) para las biotoxinas PSP y el método de Yasumoto (1978) , con respecto a la toxina amnésica de los moluscos (ASP) se emplea la cromatografía líquida de alta eficacia (H.P.L.C.), AOAC (1995).

RESULTADOS

Durante el periodo Octubre 1997 - Diciembre 1998 se realizaron un total de 612 análisis (Fig. 4) registrando dos picos máximos en marzo y septiembre del año 1998 coincidiendo con cierres cautelares y totales realizados por el CCCMM. El número de análisis por especies se reflejan en la tabla 1 donde resultan el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), la almeja babosa (*Venerupis pullastra*), la almeja ponesa (*Tapes japonica*) y la Ostra (*Ostrea edulis*) los mas controlados debido a la gran demanda en el mercado.

El número de análisis por rías se aprecia en la Fig. 5 siendo la ría de Arosa la más frecuentada (476 análisis) por ser la de mayor capacidad en cultivos de bateas con respecto a las de Vigo, Pontevedra, Muros - Noia y Sada.

La Fig.6 representa el número de muestras analizadas según el tiempo de permanencia en depuración; como se puede observar las primeras 72 horas son las más representativas en cuanto a control aunque de momento no se ha encontrado relación entre horas de permanencia en depuración y el tiempo de desintoxicación.

Tabla 1. Número de análisis por especies durante el periodo Octubre 1997 - Diciembre 1998.

(Almeja babosa) <i>Venerupis pullastra</i>	25
(Almeja fina) <i>Ruditapes decussacus</i>	3
(Almeja japonesa)	99

<i>Tapes japonica</i> (Berberecho)	9
<i>Cerastoderma edule</i> (Mejillón)	554
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Ostra)	21
<i>Ostrea edulis</i>	

CONCLUSIONES

Todos los moluscos bivalvos deben ser sometidos a un control o higienización que garantice su salubridad antes de ser destinados al consumo humano; para ello se investiga la puesta en marcha de nuevas técnicas que posibiliten resultados óptimos en cuanto a calidad sanitaria, mejorar los sistemas de identificación de las distintas biotoxinas marinas y estudiar la posibilidad de recuperar (desintoxicar), en cortos espacios de tiempo, los moluscos bivalvos intoxicados.

BIBLIOGRAFÍA

Directiva 91/ 492/ CEE de 15 de Julio de 1.991 " por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos " .

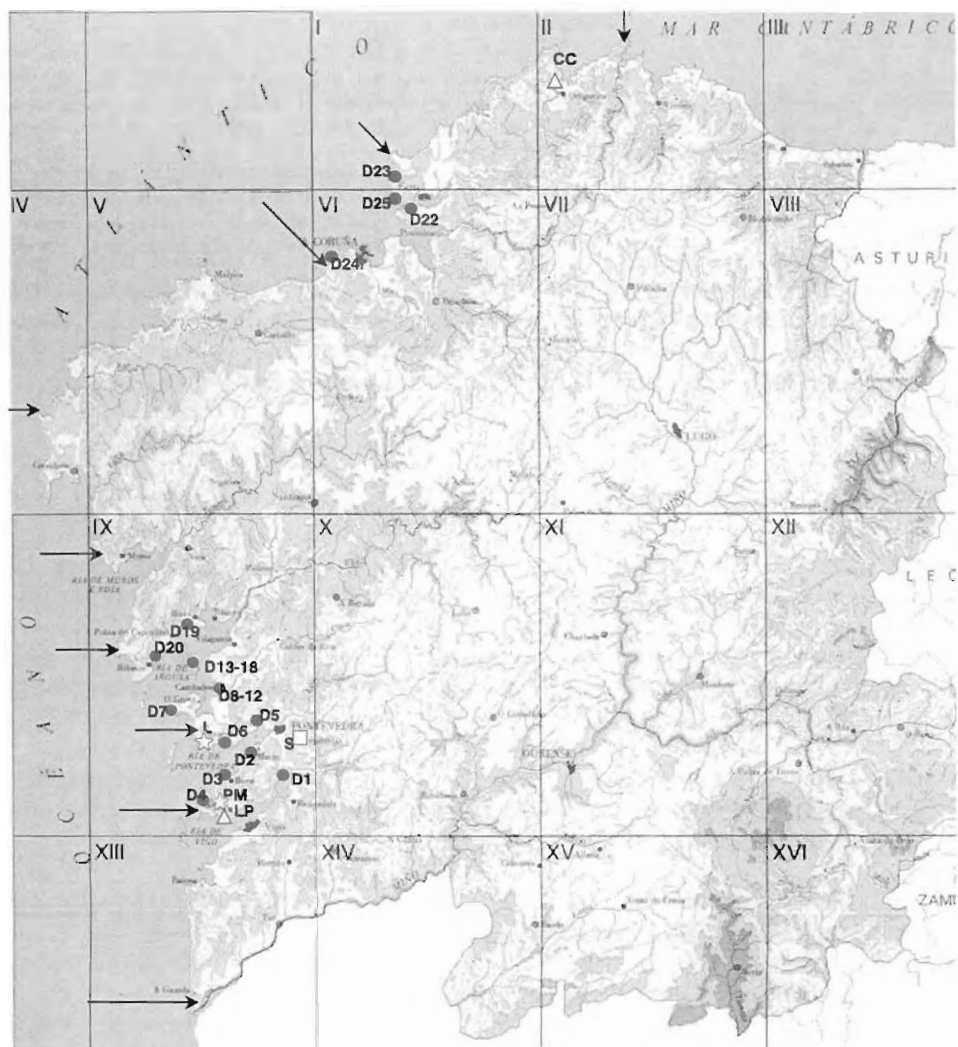
Real Decreto 308 / 1.993, de 26 de febrero, B.O.E. nº 74 " por el que se aprueba la Reglamentación técnico - sanitaria que fija las normas aplicables a la comercialización de moluscos bivalvos vivos".

Decreto 116/ 1.995, de 31 de marzo de la Conselleria de la Presidencia y Administración Pública " por el que se regula el control de biotoxinas en moluscos bivalvos y otros organismos procedentes de la pesca, marisqueo y acuicultura".

T. Yasumoto, C. Oshima, M. Yamaguchi. (1978) : Ocurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tohocu District. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 44, 1249.

AOAC Official Methods of Analysis (1990).

Official Methods of Analysis (1995).



Ubicación de empresas participantes en convenios con la Unidad de Control de Moluscos, Instituto de Acuicultura (Universidad de Santiago de Compostela, España).

- Centros de depuración de moluscos,
- Cocederos de moluscos,
- ☆ Fábricas de conservas y
- △ Productos del mar congelados.

Figura 4.- Análisis de Toxinas DSP-PSP realizados durante 1997-1998.

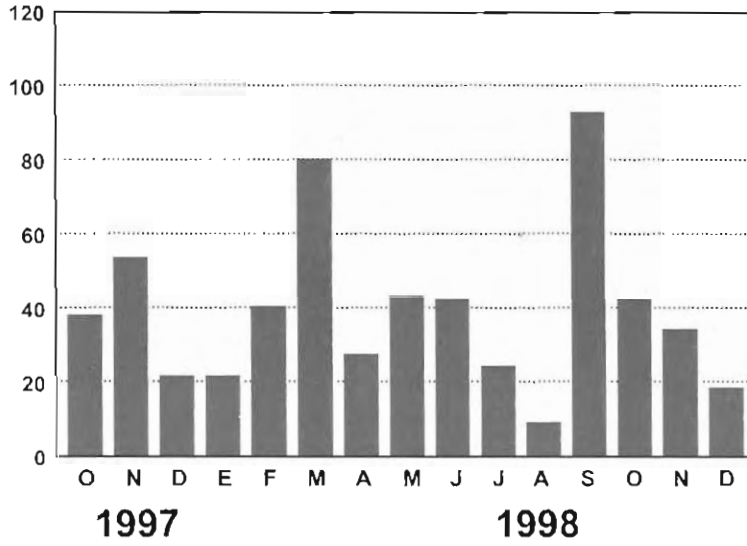


Figura 5.- Número de análisis por Rías durante 1997-1998.

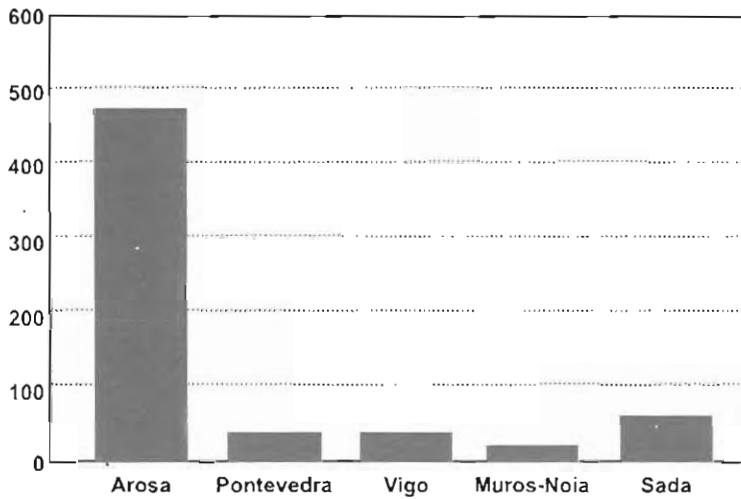
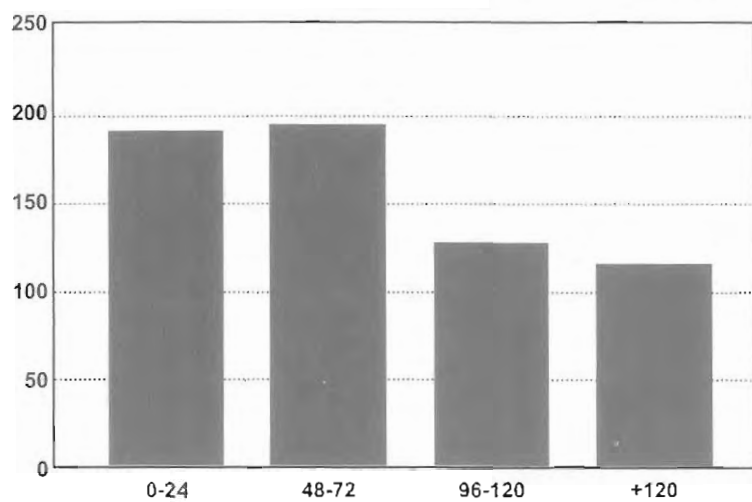


Figura 6.- Número de muestras analizadas por tiempo en depuración





UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA



Instituto de Acuicultura

Unidad de Control de Moluscos (UCM)

Campus universitario sur

15706 Santiago de Compostela - España

Tel: 981 563 100, Exts. 16043 - 16054

Tel. Móvil: 639 254 140 • Fax: 981 547 165

BOLETÍN DE RECOGIDA DE MUESTRAS

6070

Fecha / / Depuradora

Moluscos

Identificación de la muestra Lote N.º

Especie: Mejillón Almeja fina Almeja babosa Ostras
Berberecho Almeja japonesa Otros

Procedencia: Batea Cuadrícula
Zona Subzona Ría/Pais
Zona clasificada: A B

Fecha de recepción Hora

Hora de recogida Permanencia en depuración Piscina N.º

Análisis a efectuar: Microbiológico Toxinas

Observaciones:

Agua de mar

Identificación de la muestra

Lugar de toma de muestra Hora

Temperatura °C Oxígeno % sat. Salinidad ‰

Residuo de Cloro ppm pH

Observaciones

Firma del laboratorio:

Firma de la Empresa:

OCORRÊNCIA DE CIANOBACTÉRIAS E MICROCISTINAS EM AGUAS DOCES SUPERFICIAIS, NOS ANOS DE 1996-98, NAS REGIÕES DO CENTRO E SUL DE PORTUGAL

Paulo Pereira*, M. João Tavares*, Vitor Vasconcelos***, Susana Franca*

*Unidade de Biologia e Ecotoxicidade, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

**Direcção Geral de Saúde - Divisão de Saúde Ambiental

***Depto de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

RESUMO

A ocorrência e o desenvolvimento de florescências de Cianobactérias em águas doces superficiais envolve consequências nefastas para o ecossistema e está frequentemente associada à produção de hepatotoxinas nocivas para a saúde humana e animal. Em Portugal, a contaminação por cianobactérias de águas superficiais destinadas à produção de água para consumo humano e utilizadas para actividades recreativas, é um fenómeno frequente (Vasconcelos, 1993, 1996) e tem sido acompanhado no âmbito do Programa Nacional de Monitorização de Cianobactérias em Águas Superficiais Contaminadas.

Este trabalho apresenta dados obtidos desde 1996 na vigilância de diversas albufeiras do centro e sul de Portugal. Os resultados revelam situações problemáticas em termos de ocorrências de cianobactérias. De facto, na maioria dos casos, a dominância destas microalgas nas comunidades fitoplanctónicas não se limita às épocas mais quentes do ano e apesar das oscilações temporais observadas, os níveis de microcistinas podem permanecer elevados durante extensos períodos de tempo. Por outro lado, as variações bruscas na densidade fitoplanctónica e na toxicidade, em função da profundidade e localização espacial dos pontos de colheita, dificultam a definição de uma estratégia de amostragem representativa das condições verificadas na massa de água.

A eficiência de algumas Estações de Tratamento de Águas (ETA) na remoção de células e toxinas foi avaliada através da análise de amostras colhidas simultaneamente antes e após o tratamento. Os níveis observados comprovam a baixa eficiência dos sistemas convencionais (filtração, coagulação e desinfecção) no tratamento de águas contaminadas por cianobactérias tóxicas na origem, criando situações que podem pôr em risco a Saúde Pública.

ABSTRACT

The occurrence and development of cyanobacteria blooms in superficial freshwater has negative effects in the ecosystem and is frequently associated with hepatotoxin production, harmful for humans and animals. In Portugal, cyanobacterial contamination of superficial waters intended for human consumption and recreational activities is a frequent phenomenon (Vasconcelos, 1993, 1996) and has been monitored by the National Program of Monitorization of Contaminated Superficial Water.

This study shows the data collected since 1996 during the monitorization of several reservoirs in Central and South Portugal. Results show several problematic situations regarding the occurrence of cyanobacteria. In fact, in most cases, the dominance of these microalgae in the phytoplanktonic community is not limited to the hottest seasons and despite the time oscillations observed, the levels of microcystins remains high during long periods of time. On the other hand, sudden changes in the phytoplankton density and toxicity, depending on depth and spatial distribution of the sampling sites, makes the task of defining a good sampling strategy for the water bodies difficult.

The efficiency of some Water Treatment Stations in the removal of microalgae cells and toxins has been evaluated through the analysis of samples collected before and after the process. The levels observed prove the low efficiency of the commonly used systems (filtration, flocculation and disinfection) in the treatment of contaminated waters by toxic cyanobacteria, giving rise to situations that can cause a serious problem for human health.

INTRODUÇÃO

As cianobactérias são microrganismos procariotas, fotossintéticos, que se apresentam sob a forma de células isoladas, colónias filamentosas, ou agregados celulares sem forma definida. Podem povoar uma grande diversidade de meios aquáticos, marinhos ou de água doce e, em presença de condições ambientais favoráveis, normalmente associadas à eutrofização dos recursos hídricos (Bartram *et al.*, 1999), podem desenvolver-se rapidamente formando "blooms". Para além das consequências nefastas para o ecossistema, uma significativa percentagem destes blooms apresenta toxicidade [Cood *et al.*, 1989; Carmichael, 1994].

Existe uma grande variedade de toxinas associadas à presença de cianobactérias que são habitualmente classificadas em 4 grandes grupos, em função dos principais sintomas de intoxicação que provocam - neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas (Sivonen & Jones, 1999). Estas toxinas podem constituir um importante factor de risco para a saúde humana e animal (Falconer, 1993).

O desenvolvimento de florescências de cianobactérias em Portugal tem sido descrito desde o início dos anos 30 (Sampaio, 1933) e parece ser um fenómeno comum nas águas superficiais portuguesas. O estudo da toxicidade associada ao desenvolvimento de florescências em Portugal só se iniciou no início da década de 90 com os trabalhos de Vasconcelos *et al.* (1993, 1994, 1996), que apontam para uma elevada percentagem de ocorrências tóxicas, sobretudo atribuídas à presença de microcistinas (hepatotoxinas) associadas a *Microcystis aeruginosa*. Mais recentemente, foi também confirmada em Portugal a produção de toxinas PSP associada à presença de *Aphanizomenon flos-aquae* (Pereira *et al.*, in press). O acompanhamento sistemático dos recursos hídricos superficiais, no que respeita a cianobactérias e

toxinas associadas deverá, provavelmente, revelar a presença de outras toxinas ainda não detectadas até ao momento.

Dadas as evidências para efeitos agudos e crónicos na saúde humana, resultantes da exposição a estas toxinas (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999), torna-se fundamental avaliar as situações de risco de modo a prevenir, em tempo oportuno, eventuais episódios de intoxicação, resultantes do contacto e consumo de águas contaminadas.

Neste trabalho apresentam-se dados preliminares, relativos ao acompanhamento de várias albufeiras e reservatórios de água do Centro e Sul de Portugal. Amostras de água foram colhidas periodicamente a diferentes profundidades e em diferentes pontos do mesmo reservatório. Foram feitas análises fitoplanctónicas e toxicológicas, para identificação das espécies potencialmente tóxicas e quantificação das toxinas produzidas em cada local. A análise de amostras colhidas simultaneamente antes e após o tratamento convencional usado pelas ETAs para consumo público, permitiu fazer uma avaliação da eficiência do tratamento na remoção do fitoplancton e das toxinas associadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de estudo:

De entre os locais considerados mais afectados pela presença de cianobactérias, 5 reservatórios ou cursos de água do centro e Sul de Portugal foram escolhidos para este trabalho, em função do tipo de utilização a que se destinam: Santa Comba Dão (Viseu) e Guadiana (Mértola) - utilizados para consumo público; Montargil (Portalegre), Agolada e Magos (Santarém) - utilizados para actividades recreativas e agrícolas. Consideraram-se locais afectados aqueles em que, por uma inspecção preliminar das condições de cada massa de água no local, se detectaram desenvolvimentos anteriores de florescências, pela observação faixas esverdeadas junto à margem ou de flocos dispersos de algas verdes à superfície.

Amostragem:

A estratégia de amostragem (tipo, frequência, local e profundidade das colheitas) dependeu da avaliação da qualidade da água feita em análises anteriores e do fim a que esta se destina em cada caso.

Nas albufeiras usadas para actividades recreativas e agrícolas, foram colhidas amostras simples (2 litros), pontuais, à superfície ou a uma profundidade pré-estabelecida na coluna de água, junto à margem e em zonas de enseada geralmente voltadas contra o vento. Para o acompanhamento das massas de água utilizadas para consumo público, efectuou-se a colheita simultânea de amostras compostas de água bruta, resultantes da mistura de águas colhidas a diferentes profundidades, junto aos pontos de captação da ETA e de amostras de água tratada, colhidas à saída da ETA após o tratamento. Em ambos os casos, as amostras, acondicionadas em frascos de plástico rolhados, foram transportadas em arcas térmicas, mantidas a 4°C e ao abrigo da luz até ao laboratório, para processamento no próprio dia da colheita.

Processamento laboratorial das amostras :

Cada amostra foi dividida em 2 Sub-amostras, processadas separadamente para aná-

lise fitoplanctónica e determinação de toxicidade.

A quantificação fitoplanctónica foi efectuada ao microscópio invertido após fixação da amostra em solução de lugol e sedimentação em câmaras tubulares de 5-25ml (Utermöhl, 1958).

A quantificação de microcistinas foi feita por ELISA (Envirogard, Strategic Diagnostics Inc., Newark, USA) após tratamento da amostra com dois ciclos de congelamento/descongelamento, alternados com ultra-sons e seguidos de filtração (Millex HV13 - 0,45 µm, Millipore).

A quantificação de toxinas PSP nas células fitoplanctónicas foi feita segundo o método de extracção e quantificação por HPLC descrito por Oshima (1995). Resumidamente, as amostras foram concentradas por decantação ou centrifugação, as toxinas extraídas em ácido acético 0,5M e separadas cromatograficamente uma coluna de fase reversa C8 (Hypersil MOS 5µm, 150X4,6mm, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) antes de serem oxidadas e detectadas por fluorescência.

RESULTADOS

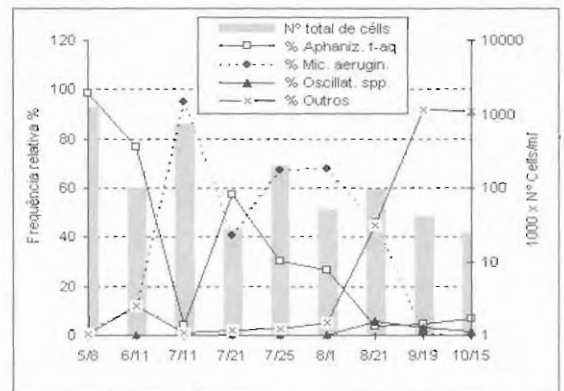
O gráfico da fig. 1 apresenta os resultados relativos à quantificação fitoplanctónica das amostras colhidas na albufeira de Montargil entre Maio e Outubro de 1996.

A comunidade fitoplanctónica, constituída fundamentalmente por cianobactérias, apresentou densidades muito elevadas durante todo o período considerado. Duas espécies potencialmente produtoras de toxinas, *Microcystis aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae* dominaram sucessivamente durante os meses de Maio a Agosto. No entanto também foram encontradas outras espécies potencialmente tóxicas, nomeadamente, *Oscillatoria* sp. e, *Anabaena flos-aquae*.

Durante os meses de Julho e Agosto foi detectada a produção de microcistinas. Esta produção coincidiu com o período de dominância de *M. aeruginosa*. Por outro lado, a presença de toxinas PSP foi detectada na amostra colhida a 6/11/96, fortemente dominada por *Aphanizomenon flos aquae*. As toxinas identificadas foram neoSTX, STX e GTX5 (fig.2) e a quantidade total de toxina registada foi de 9,65 µg equiv. STX / litro.

A fig.3. apresenta as densidades de *M. aeruginosa* e as concentrações de microcistinas associadas, detectadas em amostras colhidas à superfície e à profundidade de 0,5 metros, na albufeira de Agolada, nos meses de Julho e Agosto de 1998. Registaram-se grandes variações nos níveis de toxicidade e nas densidades celulares entre amostras colhidas no mesmo dia a diferentes profundidades, sendo sempre superiores ao nível da superfície, e

Fig. 1. Número total de células e frequência relativa das espécies mais abundantes na albufeira de Montargil durante os meses de Maio a Outubro de 1996.



entre amostras colhidas em diferentes dias à mesma profundidade.

A fig. 4 apresenta os resultados da monitorização de cianobactérias e microcistinas na albufeira de Magos durante os meses de Junho a Setembro de 1998. Neste caso foram efectuadas colheitas apenas à superfície mas em locais distintos da albufeira (margens opostas), de modo a detectar eventuais diferenças nas densidades celulares e nas concentrações de toxinas, associadas a uma distribuição horizontal não uniforme da florescência na massa de água. De facto, como era esperado, dada a natureza

Fig. 2. Análise por HPLC das toxinas PSP detectadas na amostra de Montargil colhida a 6 de Junho de 1996.

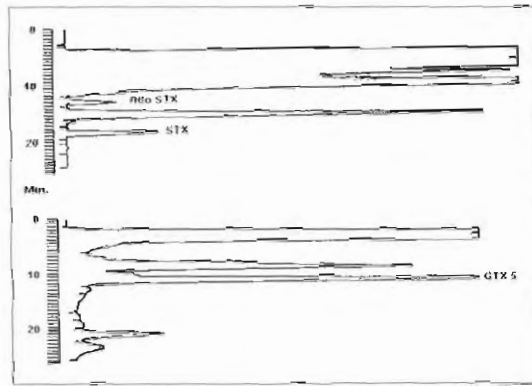


Fig.3. Densidade de *Microcystis aeruginosa* (Nº de células/ml) e concentração de microcistinas (µg/l) nas amostras da albufeira de Agolada colhidas simultaneamente à superfície e à profundidade de 0,5 m.

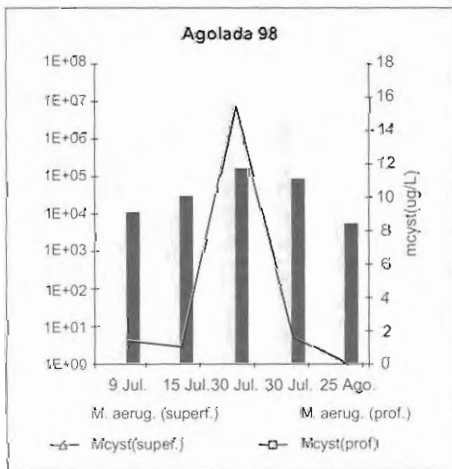
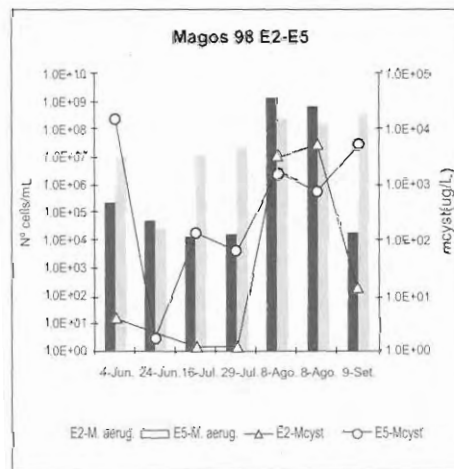


Fig.4. Densidade de *Microcystis aeruginosa* (Nº de células/ml) e concentração de microcistinas (µg/l) em amostras colhidas simultaneamente em dois locais distintos (E2 e E5) da albufeira de Magos.

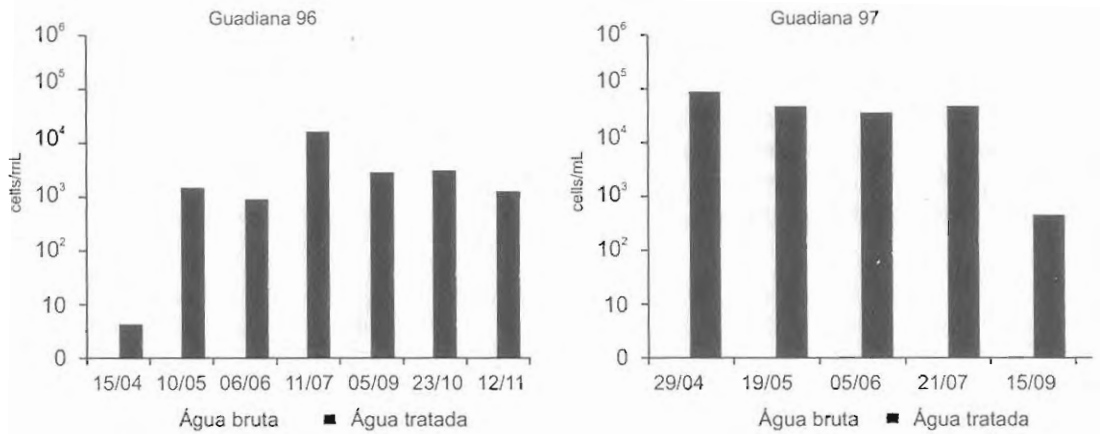


gregária de *M. aeruginosa* e a sua total dominância nas florescências ocorridas na albufeira de Magos, registaram-se grandes diferenças tanto na toxicidade como nas concentrações celulares desta cianobactéria, entre amostras colhidas no mesmo dia em diferentes pontos da albufeira. Refere-se que as concentrações mais elevadas de microcistinas foram sempre registadas nos pontos onde se registou a maior densidade fitoplanctónica e que para cada ponto, o aumento da densidade celular corresponde, de um modo geral, a um aumento da toxicidade.

No que respeita ao acompanhamento do rio Guadiana, realizado nos anos de 1996 e 1997 na zona de Mértola, a fig. 5 apresenta as densidades de cianobactérias, registadas na água bruta e após o tratamento efectuado na Estação de Tratamento de Água de Mértola. Os dados revelam uma total ineficácia deste tratamento (filtração, floculação e desinfecção) na remoção de células a partir de águas fortemente carregadas de matéria orgânica. No entanto,

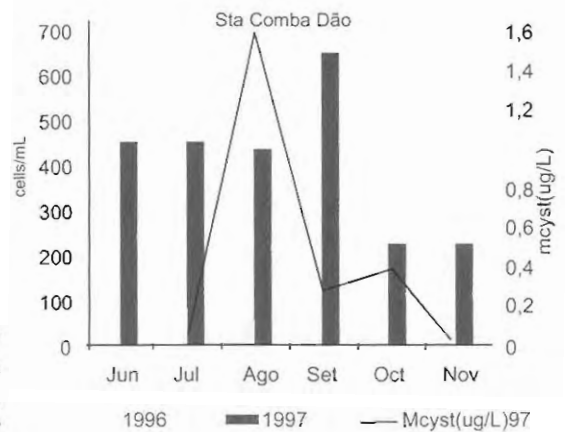
apesar das elevadas densidades e da comunidade fitoplanctónica ser fundamentalmente constituída por *Microcystis aeruginosa*, não foram detectadas microcistinas em nenhuma das amostras analisadas, quer em 1996, quer em 1997.

Fig. 5. Densidades fitoplanctónicas registadas em amostras colhidas no rio Guadiana, zona de Mértola, simultaneamente antes e após o tratamento realizado pela ETA de Mértola, em 1996 e 1997.



Em Santa Comba Dão, a eficiência da Estação de Tratamento de Água na remoção de organismos fitoplanctónicos e de toxinas associadas foi também avaliada durante a ocorrência de florescências de cianobactérias na água bruta, nos anos de 1996/97 (fig.6). A análise de amostras de água destinada a consumo público, colhidas após o tratamento final revelou a presença de células fitoplanctónicas, nomeadamente cianobactérias, em períodos de grande desenvolvimento algal na água bruta. Em 1996, não se registou presença de microcistinas nas amostras de água tratada, apesar de terem sido detectadas mais de 5.000 células fitoplanctónicas numa das amostras analisadas. Contudo, já em 1997, a situação parece ter sofrido um agravamento significativo, com a ocorrência de elevadas densidades celulares de microalgas na água tratada e níveis de toxicidade acima do nível de tolerância recomendado pela Organização Mundial de Saúde para águas de consumo (1,0 µg de microcistina/litro).

Fig. 6. Densidades fitoplanctónicas (nº cels/ml) e níveis de toxicidade (µg de microcistinas/l), registados em amostras de água tratada, destinadas a consumo público na Vila de Santa Comba Dão.



DISCUSSÃO

Em Portugal, o acompanhamento de florescências de cianobactérias em várias albufeiras e reservatórios de água tem revelado situações problemáticas de Norte a Sul do país. A frequente utilização de recursos hídricos superficiais como zonas de lazer e fontes de abastecimento para a rede pública expõe os utilizadores a uma eventual ingestão ou contacto directo com compostos de elevada toxicidade produzidos por cianobactérias. De facto, em muitos casos, a dominância destas microalgas na comunidade fitoplanctónica não se limita às épocas mais quentes do ano e a presença de elevados níveis de toxinas pode representar situações de risco para a saúde humana e animal, tanto do ponto de vista de intoxicação aguda, decorrente da exposição a grandes concentrações de compostos de alta toxicidade (tais como as toxinas PSP), como do ponto de vista crónico, dada a permanência das toxinas, nomeadamente microcistinas, na água por extensos períodos de tempo.

As ETAs consideradas neste trabalho, avaliadas quanto à capacidade de remoção de fitoplancton e de cianotoxinas, parecem não estar preparadas para fazer face às alterações da qualidade da água resultantes da ocorrência de blooms. A presença de microcistinas em níveis superiores aos recomendados pela O.M.S e de cianobactérias em densidades superiores a 10 000 cél/ml na água da rede atestam a ineficácia dos tratamentos convencionais nestas situações. A utilização de processos de desinfecção comuns na eliminação de algas para tratamento da água, revela-se ineficaz na remoção de toxinas já que ao provocar a lise celular, conduz apenas à libertação destes compostos para o meio e não à sua eliminação [Jones & Orr, 1994]. Vários casos de morbilidade, resultantes do consumo de água de rede pública proveniente de fontes superficiais contaminadas, são reveladores dos riscos associados a uma insuficiente depuração das cianotoxinas nos sistemas de tratamento de água [Hawkins, 1985; Thebault & Lesne, 1995]. Em situação de risco particularmente elevado, encontram-se os utentes de unidades de hemodiálise, frequentemente sujeitos a tratamentos que envolvem o contacto directo (por via endovenosa) com grandes quantidades de água [Araújo, 1995].

Para além da capacitação das ETA com equipamentos eficazes na remoção das toxinas (ozonização ou filtração por carbono activado), a gestão do risco requer uma vigilância permanente das águas usadas para consumo público e fins recreativos, com um diagnóstico rápido e seguro das ocorrências, que sustente a subsequente regulamentação do uso da água.

A monitorização dos reservatórios considerados neste trabalho envolveu a quantificação de fitoplancton em amostras colhidas periodicamente e a avaliação da toxicidade associada à presença de cianobactérias. Amostras simples, pontuais, colhidas a determinada profundidade na coluna de água permitiram recolher grandes concentrações algais e, portanto, determinar a presença de toxinas mesmo quando estas se apresentavam em quantidades vestigiais na massa de água. Contudo, em casos como os da albufeira de Agolada e de Magos, as amostras simples revelaram-se pouco representativas das condições verificadas em toda a massa de água, dadas as variações bruscas na densidade fitoplanctónica e na toxicidade, associadas à capacidade de deslocação vertical e horizontal das florescências sobretudo quando as espécies dominantes não se distribuem homoganeamente, como se revelou para *M. aeruginosa*.

Para além das variações espaciais, oscilações temporais na densidade e composição das comunidades fitoplanctónicas dificultam a previsão de situações de risco associadas à

contaminação de águas superficiais por cianobactérias. A presença de elevadas densidades de *Microcystis* nem sempre esteve associada à presença de toxinas. Com efeito, no Guadiana, a presença de uma florescência de *M. Aeruginosa* não foi acompanhada de produção de microcistinas. A presença simultânea de estirpes morfológicamente idênticas, produtoras e não produtoras de toxinas, tem sido descrita por outros autores (Shirai *et al.* 1991). Nestes casos, a toxicidade total na água parece ser determinada pela proporção de estirpes tóxicas e não tóxicas na comunidade fitoplanctónica (Sivonen and Jones, 1999). No caso do Guadiana, a ausência de microcistinas na presença de elevadas densidades de *Microcystis aeruginosa* só pode ser explicada pela presença maioritária de estirpes não produtoras destas toxinas.

O conjunto de situações estudadas neste trabalho exemplifica variações bruscas da toxicidade no tempo e no espaço; eventual presença de diferentes tipos de toxinas; e diferenças intraespecíficas nas características toxicológicas dos organismos envolvidos, e representam provavelmente fenómenos comuns nas florescências de cianobactérias. Salienta-se assim, a complexidade e o carácter de imprevisibilidade destas ocorrências, que exige, portanto, cuidados acrescidos na avaliação correcta do risco, real ou potencial, associado à contaminação de água por cianotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Araújo, F., 1995 - Effects of cyanobacteria on drinking water and human health: an epidemiological study in Évora, Portugal. *Assesing and Managing Health Risks from Drinking Water Contamination: Approaches and Applications* (Proceedings of the Rome Symposium) IAHS Publ., 233, 1995.
- Carmichael, W. W., 1994 - The toxins of Cyanobacteria . *Sci. Am.* 270: 64-72.
- Codd, G. A.; Bell, S. G.; Brooks, W. P., 1989 - Cyanobacterial toxins in water. *Wat. Sci. Tech.*, 21: 1-13.
- Falconer, I. 1993. Mechanisms of toxicity of Cyclic Peptide Toxins from Blue-green Algae. In: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. (Ian Falconer Eds). Academic Press, USA.
- Hawkins et al., 1985 - Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1292-1295.
- Jones, G.; Orr, P. T.; 1994 - Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreation lake as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Wat. Res.*, 28: 871-876.
- Kuiper-Goodman, T.; Falconer, I. and Fitzgerald, J., 1999. Human Health Aspects. In: *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health, Monitoring and Management*. (I. Chorus and J. Bartram Eds) WHO. Geneva.
- Oshima 1995, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Internat.* 78, 528-532.

- Pereira,P., Onodera,H., Andrinolo,D., Franca, S., Araújo,F., Lagos,N., and Oshima, Y. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*. In press.
- Sampaio, J., 1933. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. *Anais da Faculdade de Ciências do Porto*, XVIII: 142-153.
- Shirai,M., Ohtake,A., Sano,T., Matsumoto,S., Sakamoto,T., Sato,A.,Aida,T.,Harada,K-I, Shimada,T., Suzuki,M., and Nakano,M. 1991. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. *Applied Environmental Microbiology*. Vol.57-4.pp.1241-1245.
- Sivonen, K., & Jones, G. 1999. Cyanobacterial Toxins. In: *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health, Monitoring and Management*.
- Thebaul, L.; Lesne, J., 1995 - Les toxines des cyanobactéries: quels risques pour la santé?. *T.S.M.*, 12: 937-940.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. int. Ver. theor. angew. Limnol.* 9. 1-38.
- Vasconcelos, V.M, Sivonen, K., Evans W.,R., Carmichael, W.W. and Namikoshi, M., 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. *Wat. Res.* Vol. 30 (10). 2377-2384.
- Vasconcelos, V.M., 1993. Toxicity of Cyanobacteria in lakes of North and Central Portugal. Ecological implications. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25. 694-697.
- Vasconcelos, V.M., 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese freshwaters. *Arch. Hydrobiol.* 130. 439-452.

ENSAYOS DE DESINTOXICACIÓN DE PSP EN EL CORRUCO (*Acanthocardia tuberculata*).

(1) Ocaña, M.A1., (2) Moreno, O., (2) Santamaría, M. y (1) Mamán, L.

(1) Laboratorio de la Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero en el Rompido. CICESM "Agua del Pino". Carretera Punta Umbría - Cartaya s/n (Huelva).

(2) Departamento de Producción del CICESM "Agua del Pino". Delegación Provincial de Agricultura y Pesca. Apdo 104, 21071 Huelva.

JUSTIFICACIÓN

El molusco *Acanthocardia tuberculata* (corrucos) es de gran importancia en la industria pesquera andaluza de los litorales de las provincias de Málaga y Cádiz, debido a la existencia de una industria conservera que absorbe la producción para transformarla en el producto comercialmente denominado "langostillo".

Esta especie manifiesta un peculiar comportamiento respecto a las toxinas paralizantes, ya que se detectan valores anormalmente altos de las mismas, en zonas en las que las concentraciones detectadas de especies fitoplanctónicas potencialmente productoras de estas toxinas no son elevadas. Esto ha generado la necesidad del cierre de algunas zonas en las que tradicionalmente se pesca esta especie durante largos períodos, incluso de años, con el consecuente perjuicio para la industria pesquera.

Se han realizado varios estudios tendentes a explicar este extraño comportamiento, por los cuales se han descartado posibles causas como la formación de floraciones a partir de quistes de *Gymnodinium catenatum*, la intoxicación directa de los ejemplares a partir de los mismos, o la posible interferencia de metales como el Zinc en los resultados de los análisis (Márquez, 1993).

Ante este problema, se decide la realización de pruebas para establecer si el mantenimiento de ejemplares en un medio controlado libre de organismos potencialmente productores de PSP, disminuye los niveles de toxinas en un proceso que resulte económicamente rentable.

MATERIALES Y MÉTODOS

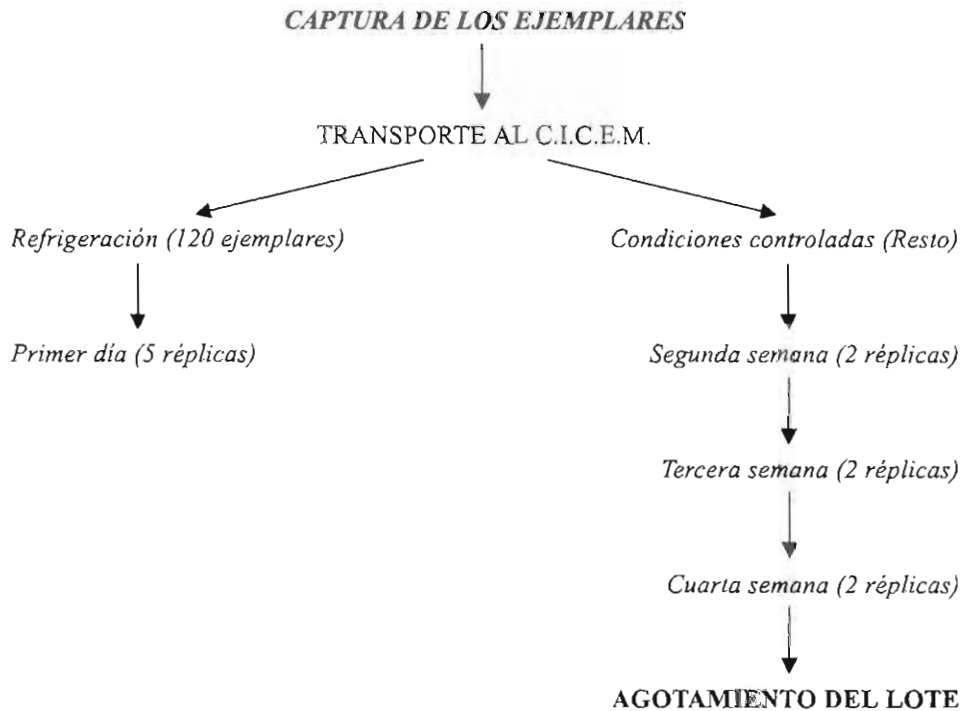
Se realizan dos ensayos de desintoxicación de corrucos en distintas épocas del año (1ª.- junio-julio, 2ª.- noviembre-diciembre).

El primer obstáculo a salvar es la forma de mantenimiento de los ejemplares en cautividad, es por ello que se ensayan varios sistemas, aunque las mortalidades apreciadas en

todos los sistemas, así como el número y frecuencia de los muestreos, condicionan la duración de los ensayos, que no es posible alargar durante más de un mes.

Por último, las condiciones quedan establecidas de la siguiente forma:

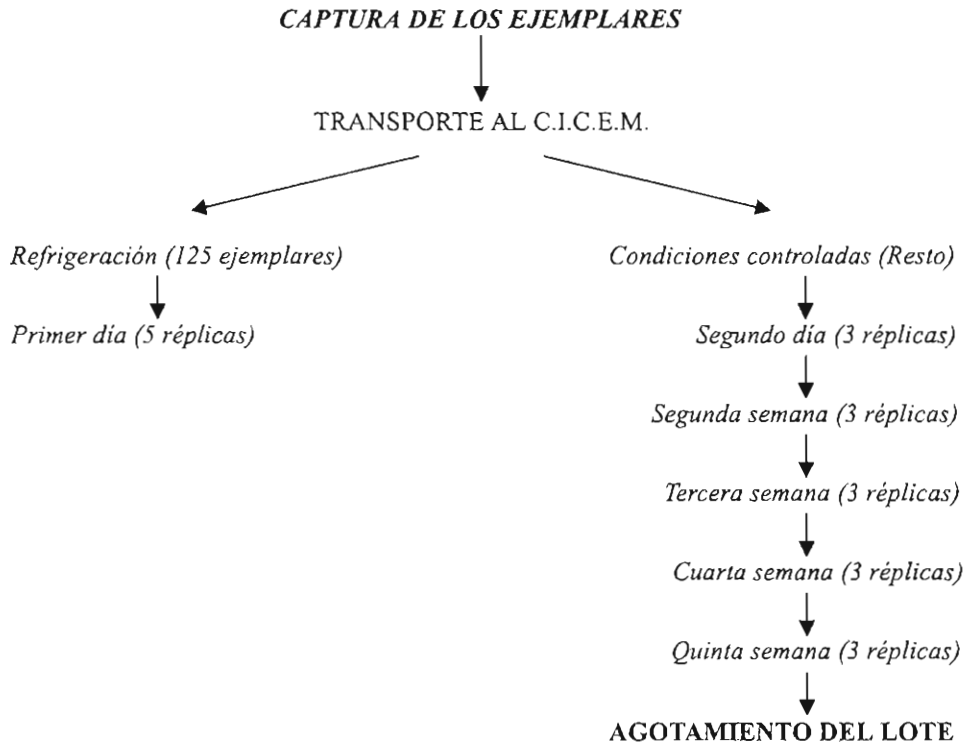
CONDICIONES DEL PRIMER ENSAYO DE DESINTOXICACIÓN



Para el primer ensayo se capturan 82 kg de corruco en la provincia de Málaga. Los ejemplares se transportan hasta el centro donde se realizan los ensayos (C.I.C.E.M. "Agua del Pino") separándose un primer lote para el análisis de 5 réplicas de 20 ejemplares al día siguiente al de su captura. El resto de los ejemplares se distribuyen en 4 tanques rectangulares de 1000 l de capacidad bajo circuito abierto (5 l/min) de agua de mar filtrada y pasada por un tratamiento con rayos ultravioleta. La temperatura media se mantuvo a $20.4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$ y la salinidad a $37.8 \pm 0.4 \text{ } \text{‰}$. La alimentación consistió en una mezcla de *Skeletonema costatum* con aportes adicionales de *Isochrysis galbana* Tiso, *Chaetoceros gracilis*, *Ch. calcitrans* y *Tetraselmis suecica* a una concentración aproximada de 106 céls/ml.

La experiencia se logró mantener durante 22 días, a partir del muestreo inicial, se realizaron muestreos por bioensayo de ratón semanales de dos réplicas de 20 ejemplares cada una. Diariamente se muestreó el agua con alimento para asegurar la no presencia de especies de fitoplancton potencialmente tóxicas.

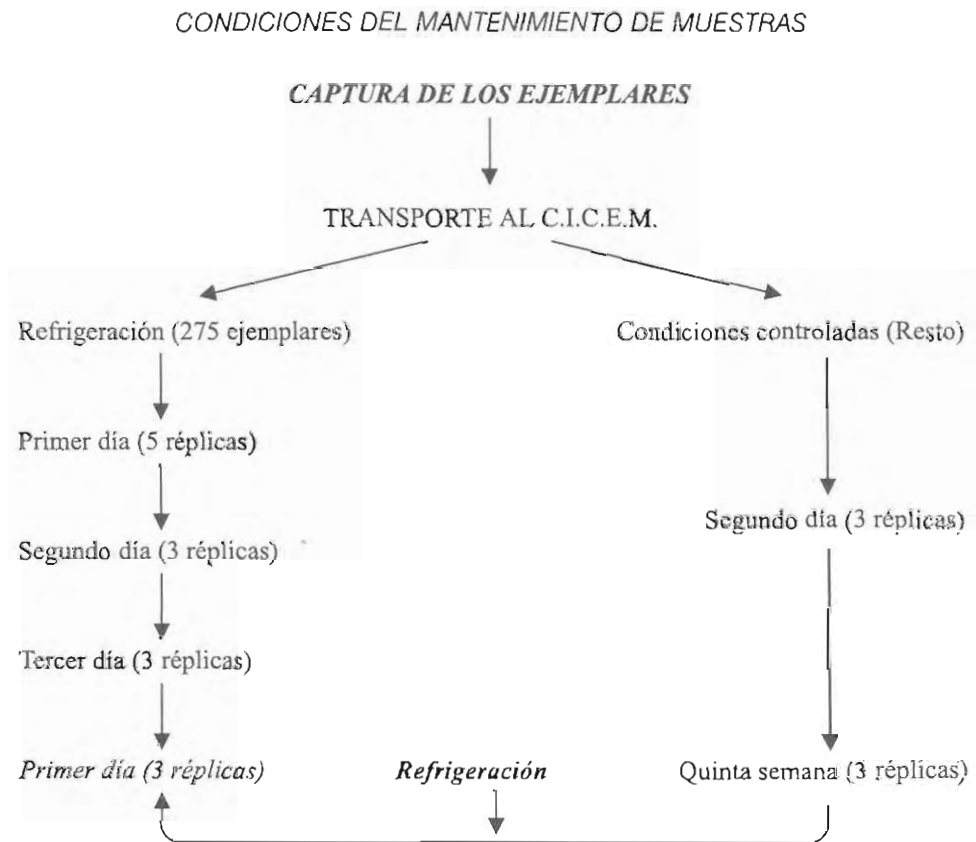
CONDICIONES DEL SEGUNDO ENSAYO DE DESINTOXICACIÓN



Para el segundo ensayo se capturan 240 kg de corruco en la provincia de Málaga. Los ejemplares se transportan hasta el C.I.C.E.M. "Agua del Pino" separándose un primer lote para el análisis de cinco réplicas por bioensayo de ratón al día siguiente al de su captura. El resto de los ejemplares se distribuyen en 4 tanques rectangulares de 5000 l de capacidad bajo circuito abierto de agua de mar filtrada (5 l/min) y pasada por un tratamiento con rayos ultravioleta. La temperatura media se mantuvo a $18.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.9$ y la salinidad a $37.2 \pm 0.4\text{‰}$. La alimentación consistió en una mezcla de *Skeletonema costatum* con aportes adicionales de *Isochrysis galbana T-iso*, *Chaetoceros gracilis*, *Ch. calcitrans* y *Tetraselmis suecica* a una concentración aproximada de 106 céls/ml.

La experiencia se logró mantener durante 34 días, a partir del muestreo inicial, se realizaron muestreos por bioensayo de ratón semanales de tres réplicas de 20 ejemplares cada una. Diariamente se muestreó el agua con alimento para asegurar la no presencia de especies de fitoplancton potencialmente tóxicas.

Los resultados de estas experiencias sugieren la realización de un nuevo ensayo el que se testea el posible efecto de la refrigeración de los ejemplares vivos sobre la cantidad de toxina.



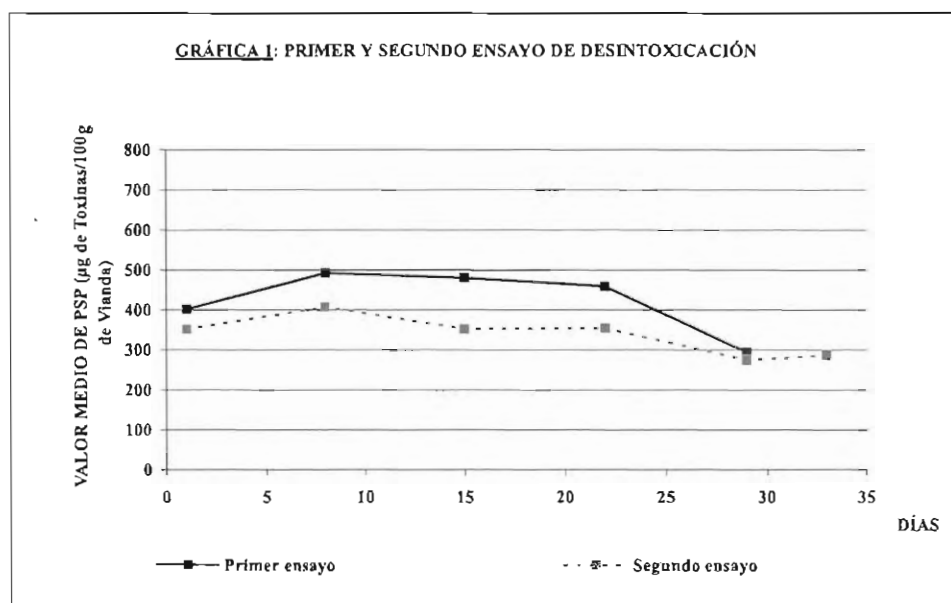
De los ejemplares capturados para la segunda experiencia de desintoxicación se mantienen 275 individuos en un refrigerador a 5 °C durante 12 horas. Los ejemplares se separan en 11 lotes de 25 individuos en mallas de plástico y se analizan según el bioensayo de ratón para la toxina PSP.

RESULTADOS

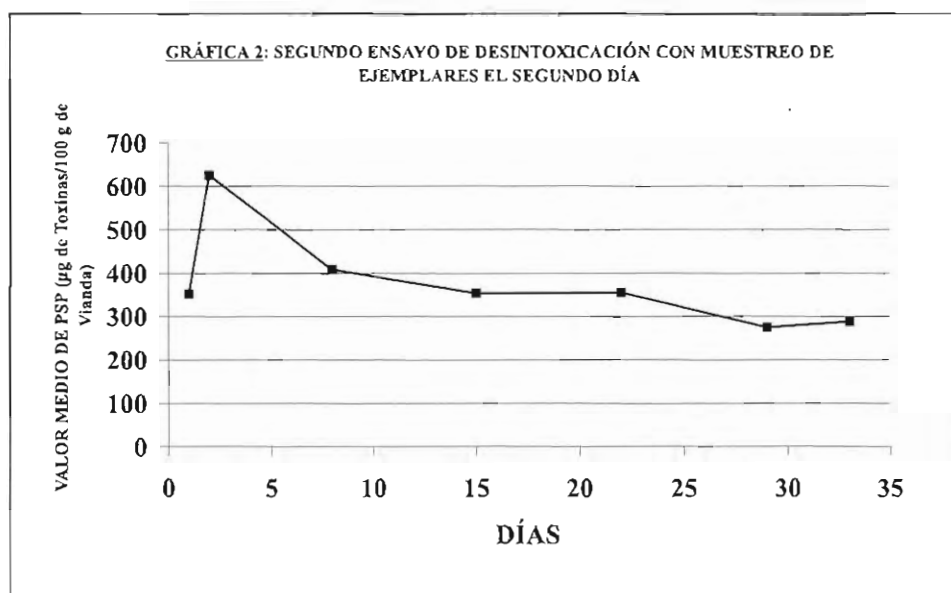
Con respecto a los dos ensayos de desintoxicación realizados, se aprecia una cierta bajada en los niveles de toxinas del orden del 20%.

La duración del proceso que fue de aproximadamente un mes, durante el cual se apreció una elevada mortalidad de la población en cautividad, que redujo el lote inicial.

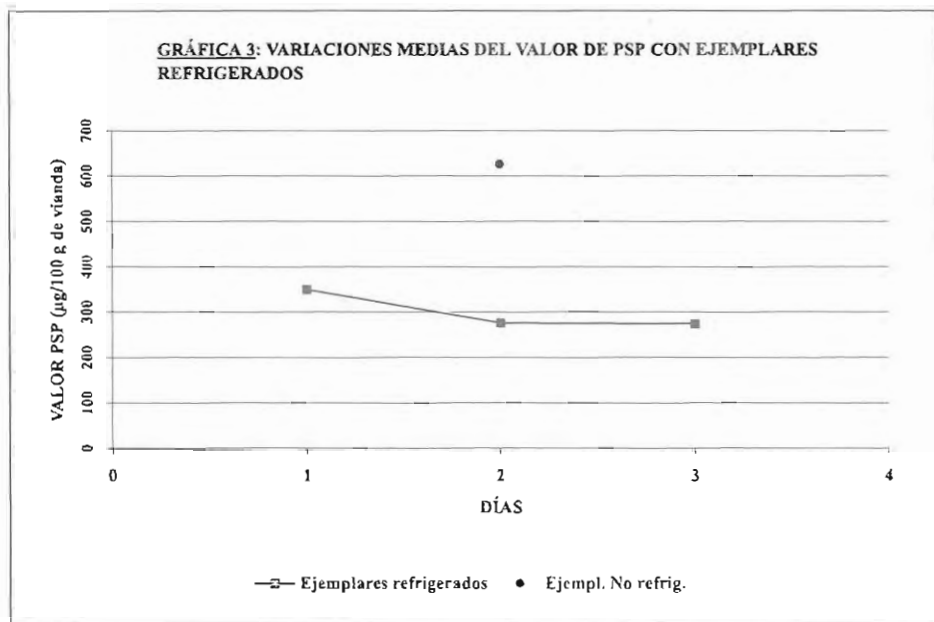
Es importante reseñar un punto curioso que se aprecia en el primer ensayo de desintoxicación, entre el primer y el segundo muestreo; los valores obtenidos en las cinco réplicas realizadas como muestreo inicial, son más bajos, que los obtenidos en la mayoría de los siguientes muestreos. Se decide repetir el ensayo de desintoxicación en otra época del año, los resultados respecto a la desintoxicación son similares, e incluso se repite el fenómeno por el cual los valores obtenidos en el primer muestreo son inferiores a los obtenidos en el siguiente muestreo semanal, hecho fuera de lógica teniendo en cuenta que los ejemplares se encuentran en un medio libre de organismos potencialmente tóxicos (Gráfica 1).



Esta variación en el contenido medio de toxina sugiere que la forma de mantenimiento de los ejemplares puede actuar sobre la cantidad media de toxina obtenida en el lote. Es por ello que se decide realizar un muestreo con tres réplicas entre el denominado "muestreo inicial" y el siguiente semanal durante el segundo ensayo de desintoxicación. Los resultados de este muestreo son muy superiores a los obtenidos en el teórico muestreo inicial, esta diferencia no se explica estadísticamente por diferencias en el peso de las muestras. Los resultados son incluso más elevados que los obtenidos en el siguiente muestreo semanal. (Gráfica 2). Esto sugiere que el cambio en las condiciones afecta al contenido tóxico de la población, hecho que Bricelj *et al.* (1998) explica en *Spisula solidissima* por transferencias entre tejidos.



Por otro lado, debido a los resultados obtenidos en el primer ensayo de desintoxicación se decide, en la siguiente experiencia de desintoxicación, separar un grupo de ejemplares para realizar un nuevo ensayo en el que se intenta probar el posible efecto de la refrigeración sobre el contenido de toxinas. Los resultados muestran una leve bajada en los valores obtenidos, del orden del 20% en los análisis realizados del primer día al segundo, y una estabilización en el nivel entre el segundo y el tercer día. Sin embargo, al analizar ejemplares mantenidos en las condiciones del segundo ensayo de desintoxicación el segundo día, se aprecia un incremento en la cantidad de toxina de las tres réplicas analizadas, como ya se ha reseñado en el párrafo anterior, no explicable por diferencias en peso de las muestras (Gráfica 3). Este aumento no es lógico si tenemos en cuenta que se ha comprobado la ausencia de especies de fitoplancton potencialmente tóxicas para esta toxina en el medio.

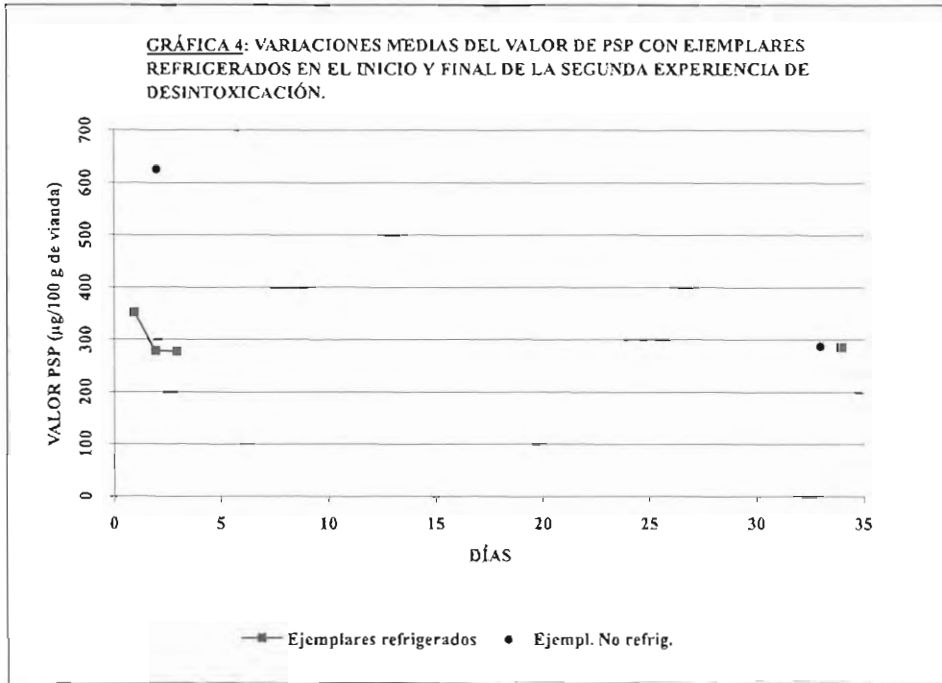


A fin de comprobar los resultados, se repite la experiencia con los ejemplares restantes del segundo ensayo de desintoxicación, analizando tres réplicas de éstos el último día de la experiencia y tres más al cabo de 24 horas en un refrigerador a 5 °C. En este caso no se encuentran diferencias entre los lotes analizados "en fresco" y los lotes refrigerados durante 24 horas. (Gráfica 4).

CONCLUSIONES

En resumen, la desintoxicación por depuración en condiciones controladas de la especie *Acanthocardia tuberculata*, es un proceso largo y demasiado costoso en ejemplares, instalaciones y personal para ser económicamente rentable.

Por otro lado, los resultados sugieren que el método de mantenimiento de las muestras influye en el contenido en toxina de las mismas, siendo un tema interesante para ser estudiado con métodos más finos de análisis.



BIBLIOGRAFÍA

- AOAC, 1995. AOAC Official Method 959.08 paralytic shellfish poison. In "Fish and other marine products". Cap. 35.1.37: 21.
- Márquez, I. (1993). Presencia de PSP en el corruco (*Acanthocardia tuberculata*) en el litoral de la provincia marítima de Málaga y distritos marítimos de la Línea y Algeciras. En: Mariño, J. Y Maneiro, J. (eds). Tercera Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas, Xunta de Galicia, pp 27-33.
- Estudio sobre la presencia de quistes dinoflagelados tóxicos en muestras de sedimento de la costa gaditana y el litoral malagueño. Estudio encargado por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía a la empresa EPTISA.
- Bricelj, V.M, et al.(1998). Temperature Effects on Kinetics of PSP Detoxification in Surfclams, *Spisula solidissima*. In Abstracts of The 6th Canadian Workshop on Harmful Marine Algae Abstracts. St Andrews, NB, Canada. 27-29 Mayo 1998.

TOXINOLOGÍA Y CONTENIDO TÓXICO DE *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* y *D. Caudata* DE LAS RÍAS BAJAS GALLEGAS

(1) M.L. Fernández, (2) B. Reguera, (2) I. Ramilo y (1) A. Martínez

(1) Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas. Sanidad Exterior de Vigo. Ministerio de Administraciones Públicas. Apto. 90, 36271 Vigo.

(2) Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Cabo Estay, Canido. Apto. 1552. 36280 Vigo.

RESUMEN

Se presentan resultados sobre el perfil de toxinas y contenido tóxico de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata*, especies asociadas a episodios recurrentes de presencia de toxinas diarreas en los bivalvos (DST) en las Rías Bajas gallegas, obtenidos de células aisladas por micromanipulación mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Estos resultados establecen la presencia de dinophysistoxina-2 (DTX2) en el perfil tóxico de *D. acuta* (hasta un 40% del total), y sugieren por primera vez la presencia de cantidades traza ($< 1 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) de ácido okadaico (OA) en *D. caudata*. El componente dominante de *D. acuminata* es el OA si bien no se puede descartar la presencia de pequeñas cantidades de DTX2 en esta especie. Se obtienen nuevos datos que confirman la variabilidad del contenido tóxico en células de la misma especie de *Dinophysis* durante distintos episodios anuales, e incluso durante el mismo episodio en células de arrastres mantenidos en laboratorio. Estos resultados corroboran el riesgo para la salud pública que supone el empleo de "índices de *Dinophysis*" como dato sustitutorio de los bioensayos de ratón en la detección precoz de toxinas diarreas en los bivalvos.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Dinophysis* son responsables de episodios recurrentes de ocurrencia de toxinas diarreas en los bivalvos (DST) que acarrear prolongadas prohibiciones de la extracción de bivalvos en las áreas de producción en las Rías Bajas gallegas. *D. acuminata* es la especie más persistente del género, presente durante todo el año, y responsable de episodios DST entre primavera y otoño; se han registrado densidades de hasta $3 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ de esta especie (Maneiro et al, somet.) y en años excepcionales se ha asociado con episodios DST de invierno con concentraciones inferiores a $2 \times 10^2 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$. Las ocurrencias de *D. acuta* son de carácter más estacional, y los episodios DST asociados a esta especie se dan sobretudo en septiembre-octubre; las densidades máximas registradas fueron de aproximadamente $5 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$. *D. caudata* es un componente minoritario del grupo *Dinophysis* en las rías, aparece siempre acompañando a otras especies del género y constituyendo un 5-20% del total de *Dinophysis* spp.; las concentraciones máximas registradas oscilan entre $2-7 \times 10^2 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ (Reguera et al., 1990; 1993 a y b; Blanco et al, 1995 y 1998). Las grandes variaciones en la relación Concentración de *Dinophysis* spp. / Toxicidad DSP en los bivalvos se justifican en parte por la variabilidad de contenido tóxico por célula observado en poblaciones naturales de

Dinophysis spp. Además, algunas especies de *Dinophysis* presentan cepas tóxicas en una localidad y cepas no tóxicas en otra. El mejor ejemplo de esto último lo constituye *Dinophysis norvegica*, uno de los principales agentes de episodios DST en los países escandinavos, mientras que repetidos análisis por CLAE de arrastres fitoplanctónicos ricos en esta especie en la costa este de Canadá (Lawrence *et al.*, 1998), han dado resultados negativos sobre la presencia de toxinas diarreicas.

Existen abundantes referencias en la literatura sobre estimaciones de contenido tóxico en células de *Dinophysis* spp. (ver Tabla I). Al no existir cultivos establecidos de estas especies, las estimaciones se han hecho a partir de arrastres de red de poblaciones naturales, de arrastres mantenidos en laboratorio un corto período de tiempo, y en casos excepcionales, a partir de laboriosos aislamientos de células individuales mediante micromanipulación de poblaciones naturales al microscopio óptico. Masselin *et al.* (1992) compararon la toxicidad celular de *D. sacculus* estimada a partir de arrastres multiespecíficos y a partir de aislamientos de células individuales, y observaron que los datos obtenidos de los arrastres eran hasta un orden de magnitud inferiores a los obtenidos de células aisladas por micromanipulación, Blanco *et al.* (1995) estimaron el contenido de toxina por célula y especie de *Dinophysis* mediante regresiones múltiples de los resultados de toxicidad y el conteo de células de las distintas especies de *Dinophysis* en arrastres de red multiespecíficos. Estos autores señalaron que la toxicidad estimada por célula era tanto mayor cuanto más se diluían los arrastres fitoplanctónicos excesivamente densos antes del análisis por CLAE.

Las estimaciones de toxicidad por célula de *Dinophysis* a partir de arrastres multiespecíficos, en las que se asume que sólo las células de *Dinophysis* spp son portadoras de toxinas diarreicas, pueden ser bastante precisas cuando hay una sola especie de *Dinophysis*, lo cual puede darse en las Rías Gallegas en algunas proliferaciones primaverales de *D. acuminata*. No obstante como inconvenientes del método podemos citar las posibles fuentes de imprecisión:

Perturbaciones del material acompañante, que dan lugar a cromatogramas con mucho "ruido químico" que dificulta la cuantificación;

- Posible pérdida de material tóxico, si en los densos arrastres fitoplanctónicos hay roturas de células y su contenido pasa al agua de filtrado. En este caso obtendríamos una subestimación de la toxicidad real;
- Presencia de especies microzooplanctónicas (ciliados, tintínidos) y dinoflagelados heterótrofos de tamaño próximo a las *Dinophysis* spp, que pueden preda sobre éstas, y contribuyen por tanto a la toxicidad global del filtro. En este caso, el cálculo obtenido al dividir la toxicidad total entre el número de células de *Dinophysis* spp en el filtro puede dar lugar a importantes sobreestimaciones de la toxicidad por célula;
- Se asume que la toxicidad por célula de cada especie de *Dinophysis* es constante durante los rangos de tiempo (1-2 semanas) acotados para el tratamiento estadístico de cada "pico" de toxicidad revelado por los controles rutinarios de toxinas DSP en los bivalvos.

Los trabajos realizados hasta la fecha sobre el perfil de toxinas de las distintas especies de *Dinophysis* se han centrado en la investigación de la presencia de OA, DTX1 y DTX2.

Tabla I. Concentración de toxinas DSP (OA Y DTXs) en poblaciones naturales de *D. acuminata*, *D. sacculus*, y *D. acuta* de distintas partes del mundo (nd = no detectado).

Especie	Origen	Toxicidad (pg · cel ⁻¹)	Tipo de muestra	Referencia
<i>D. acuminata</i>	Le Havre, Francia. (Junio 1984)	1.6 OA	Células aisladas por micromanipulación	Lee et al, 1989
	Bahía de Tokio, Japón (Junio 1984)	Trazas OA		
	Gulf St. Lawrence, Canada	25.5 OA	Células aisladas de arrastres multiespecíficos mantenidos en laboratorio	Cembella, 1989
	Gulmar Fjord, Suecia	· - 23.2 OA: 1.1 - 23 DTX1: nd - 0.2		Johansson et al, 1996
	Galicia, España	1 - 37 OA	Toxicidad global (serie temporal) de arrastres de poblaciones naturales multiespecíficas.	Blanco et al., 1995
Dinamarca	nd - 40 OA	Andersen et al., 1996		
<i>D. sacculus</i>	Bretaña, Franca	12.9 - 29.6 OA	Células aisladas (micromanipulación)	Masselin et al., 1992
	Delta del Ebro, España	1.2 - 5.7 OA	Arrastre <i>quasi</i> mono específico mantenido en laboratorio.	Delgado et al., 1996
<i>D. acuta</i>	Galicia, España (Octubre 87)	9.4 OA	Células aisladas (micromanipulación)	Lee et al, 1989
	Cork, Irlanda (Agosto, 96)	136 58 OA+78 DTX2		James et al, 1998
	Gulmar Fjord, Suecia	4 - 21 OA: nd -14 DTX1: nd - 7	Células aisladas de arrastres multiespecíficos mantenidos en laboratorio	Johansson et al., 1996
	Galicia, España	0.4 - 430 OA: 0.6 - 94 DTX2?: 0.5 - 169	Toxicidad global (serie temporal) de arrastres de poblaciones naturales multiespecíficas.	Blanco et al., 1995

En estudios con especies "cultivables" productoras de toxinas DSP, como *Prorocentrum lima*, se ha demostrado que el compuesto dominante almacenado por las células es la DTX4, un complejo derivado del OA, soluble en agua, en el que el grupo OH primario del diol-éster está esterificado con un grupo trisulfato. Cuando se rompen las células en los procesos de extracción, la DTX4, cuya potencia tóxica no ha sido evaluada, se hidroliza enzimáticamente al diol éster, y éste último se hidroliza a su vez convirtiéndose en OA. Así pues, la DTX4 y la enzima responsable de su hidrólisis estarían almacenadas en compartimentos celulares distintos (Quilliam *et al*, 1996). La presencia de este tipo de sustancias en células naturales de *Dinophysis* spp no ha sido investigada. A diferencia del OA, la DTX4 y los diol-ésteres no presentan el grupo carboxilo libre, y no pueden ser identificadas mediante técnicas habituales de derivatización con fluoróforos como el 9-Antrildiazometano (ADAM). Su estudio requiere la aplicación de espectrometría de masas acoplada a CLAE. No obstante, se puede hacer una estimación de estos compuestos calculando la diferencia de niveles de OA entre dos muestras de células de la misma población, una sometida a un proceso de inactivación enzimática, y otra en la que se ha favorecido la hidrólisis enzimática de estos compuestos. La diferencia de OA entre ambas extracciones será un índice de la cantidad de toxina que se encontraba en forma de DTX4 y/o diol-ésteres.

En el presente trabajo se presentan resultados preliminares del perfil de toxinas y toxicidad por célula de *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* aisladas por micromanipulación a partir de arrastres de red de poblaciones naturales fitoplanctónicas multiespecíficas recogidos durante episodios de DSP en las Rías de Pontevedra y Vigo en 1997-1998. Los objetivos de este estudio son:

1. Determinar el perfil de toxinas (toxinología) y el contenido de toxina por célula (toxicidad) de las distintas especies de *Dinophysis* asociadas a los episodios de DSP en Galicia;
2. Investigar la presencia de formas conjugadas del OA (diol-ésteres y DTX4)
3. Estimar la contribución de cada especie en los distintos episodios tóxicos;
4. Estudiar la relación de la variabilidad de toxicidad por célula con los distintos morfotipos (tamaño, forma) presentes en distintas estaciones del año, y distintas condiciones ambientales y etapas del crecimiento poblacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de Células de *Dinophysis* spp

Las células de *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* se aislaron a partir de arrastres verticales con redes planctónicas (10-20 μm de luz de malla). Los arrastres se realizaron durante episodios DST acaecidos en las Rías Bajas en septiembre de 1997 y 1998, y en junio de 1998. Los arrastres se pasaron por malla de 100-150 μm para eliminar organismos microzooplanctónicos que interfirieron en los aislamientos y que pastan sobre las *Dinophysis* spp haciendo disminuir su número. Los aislamientos se hicieron por micromanipulación del arrastre con micropipetas capilares, en cámaras de sedimentación, al microscopio invertido, con objetivos de 25x y 100x. Las células aisladas se transfirieron dos o tres veces más a sendas cámaras con agua de mar filtrada (0.22 μm) para asegurar la ausencia de cualquier célula acompañante, y por último fueron depositadas en un pequeño tubo, cuyo contenido (y posterior

aclarado con agua de mar estéril) se filtró muy suavemente, mediante una trompa de vacío, a través de filtros Whatman GF/C de 2 cm de diámetro, previamente tratados a 400 °C durante 6 h. Los filtros marcados se congelaron a -30 °C hasta el momento de la extracción. En la Tabla II se relaciona el número de células aisladas de cada especie en cada episodio. En el caso de *D. acuta* se hicieron aislamientos de células el mismo día que se tomaron del campo, y dos aislamientos posteriores, 5 y 9 días después de la recogida respectivamente; durante ese tiempo el arrastre se mantuvo en un contenedor de plástico en cámara isoterma con fotoperíodo L:O 14:10, a 15 °C. Durante el episodio de *D. acuminata* de junio/98 se obtuvieron dos muestras de células aisladas de esta especie a partir del mismo arrastre: una destinada a la determinación de OA libre (previniendo la hidrólisis de formas conjugadas de las toxinas DSP mediante inactivación de las enzimas), y otra destinada a la investigación indirecta de la presencia de formas conjugadas provocando la hidrólisis enzimática de las mismas a OA.

Extracción y Análisis de Toxinas por CLAE

La mayor parte de los extractos se obtuvieron aplicando el método de Lee *et al.* (1987) con ligeras modificaciones: Se hace una doble extracción de cada filtro mediante sonicación con 2 ml de metanol (80%) durante 15 mn, centrifugación y decantación del sobrenadante. Los extractos combinados se llevan a un volumen final de 5 ml. Una alícuota de esta muestra (n ml), a la que se añade la mitad de volumen de H₂O (0.5 n ml), se extrae dos veces con 1.5 n ml de cloroformo. El extracto clorofórmico se lleva a un volumen preciso y posteriormente se seca con sulfato sódico. Una alícuota del extracto clorofórmico se evapora y se somete posteriormente a derivatización.

Las muestras de *D. acuminata* de junio/98 se sometieron a un procedimiento similar al de Quilliam *et al.* (1996): Un primer filtro se suspendió en 0.5 ml de Tris-HCL (50 mM, pH 7.4) y se introdujo en agua hirviendo 3 mn. Con este procedimiento se destruyen las enzimas antes de la extracción y se previene la hidrólisis de las formas conjugadas. Posteriormente se añadió 2 ml de metanol y se sonicó la muestra durante 1 mn. Después de 10 mn de centrifugación se decantó el sobrenadante en tubo de vidrio. El filtro se sometió dos veces más a una extracción con 1 ml de metanol 80%. Un segundo filtro se suspendió en 0.5 ml de Tris-HCL (50 mM, pH 7.4) y se sumergió en nitrógeno líquido. Posteriormente se procedió a descongelar la muestra a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24 horas. Con esto se estimula la hidrólisis enzimática de las formas conjugadas del OA. Seguidamente se añadió 2 ml de metanol al 80% y se realizó el mismo tratamiento que con el primer filtro. Los extractos metanólicos obtenidos por ambos procedimientos se someten al procedimiento general de extracción, purificación y derivatización. La derivatización se realizó con reactivo ADAM (SERVA). Como estándares se utilizaron OA adquirido al National Research Council (NRC, Canadá), y DTX2 amablemente cedida por K. James (Cork, Irlanda). Las características del sistema fueron: Hewlett-Packard 1050, Merck Superspher 100-RP18 (4 ml, 250 x 4 mm); fase móvil, Me CN:H₂O (80:20, flujo 1.1 ml min⁻¹); temperatura de la columna 35°C; detector de fluorescencia HP 1046A, con longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 412 nm respectivamente.

RESULTADOS

En la Tabla II se relacionan las fechas de aislamientos de células, número de células aisladas, y número de células correspondiente a la alícuota inyectada en el cromatógrafo, y contenido promedio de toxinas por célula. La figura 1 muestra ejemplos de algunos de los cromatogramas obtenidos de especies de *Dinophysis* y de los estándares inyectados.

Dinophysis acuminata: Se detectó OA en todas las muestras. En las muestras de Junio del 98, sometidas a dos tipos de extracción, no se observaron diferencias significativas en los resultados ($9.9 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ y $7.9 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ respectivamente) que pudieran indicar la presencia de formas conjugadas del OA en las células analizadas. Se observa un minúsculo pico con un tiempo de retención similar al de la DTX2. Las muestras de septiembre presentan una toxicidad celular dos veces superior ($21.7 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) a la de junio.

Dinophysis acuta: en las tres muestras analizadas se detectó OA y DTX2. En las dos primeras muestras la proporción OA:DTX-2 fue aproximadamente 3:2. Se observan importantes diferencias cuantitativas entre las muestras de arrastres mantenidos en el laboratorio (55.1 y $24.1 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) en relación con las muestras en que los aislamientos de células se realizaron el mismo día de recogida del arrastre ($10.7 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$).

Dinophysis caudata: Aparece en el cromatograma un pico muy pequeño en el mismo tiempo de retención que el OA que podría interpretarse como trazas de OA ($\sim 0.7 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Resultados previos sobre la estimación de toxicidad de células de *Dinophysis* spp han puesto de manifiesto que existe una gran variabilidad en los valores obtenidos para cada especie en distintas zonas del mundo o incluso en la misma localidad. Al no disponerse de cultivos de estas especies, resulta difícil determinar si esta variabilidad se debe a que estamos trabajando con cepas distintas de toxicidad muy diversa, o si por el contrario se trata de las mismas cepas respondiendo a distintas condiciones ambientales, o a poblaciones con distinta tasa de crecimiento y biovolumen. En el caso del complejo *D. acuminata*, el problema se complica por la gran variabilidad morfológica, o plasticidad, que presenta esta especie. Es necesario, pues, obtener repetidas estimaciones de toxicidad por célula en series temporales durante distintas estaciones del año, y relacionar estos valores con el tamaño/forma de las células, y aún mejor, acompañar estos estudios de otros que determinen la variabilidad genética de las células procedentes de distintos episodios.

En estos resultados preliminares se establece por primera vez la presencia de DTX2 en *D. acuta* de las Rías Bajas gallegas. Esta toxina fue primeramente identificada en mejillones irlandeses (Hu *et al.*, 1992). Blanco *et al.* (1995) detectaron picos con comportamiento cromatográfico idéntico a la DTX2 en los análisis de muestras de arrastres fitoplanctónicos de las rías gallegas y sugirieron que la aparición de este compuesto pudiera estar asociada con la ocurrencia de *D. acuta*. Gago *et al.* (1996) y Vale y Sampayo (1996) confirmaron la presencia de DTX2 en mejillón de Galicia y Portugal respectivamente. Vale y Sampayo (1998) mostraron que la aparición de DTX2 en bivalvos portugueses va asociada a la ocurrencia de *D. acuta*, mientras que James *et al.* (1998) demostraron mediante μCLAE y espectrometría de masas que la DTX2 es la toxina predominante en *D. acuta* en Irlanda. La razón OA : DTX2 obtenida para *D. acuta* es aproximadamente 3:2. Curiosamente, esta misma razón se observa en los datos obtenidos por Blanco *et al.* (1995) a partir de análisis de arrastres de poblaciones naturales multiespecíficas entre las que se incluía *D. acuta*.

Resulta sorprendente el gran incremento de toxicidad observado en las células de *D. acuta* que se aislaron del arrastre tras 5 días de mantenimiento en el laboratorio. Una posible explicación sería que la tasa de división celular fue muy reducida (quizás por las manipulaciones del arrastre, o condiciones subóptimas en las cámaras de cultivo), mientras que continuaba la

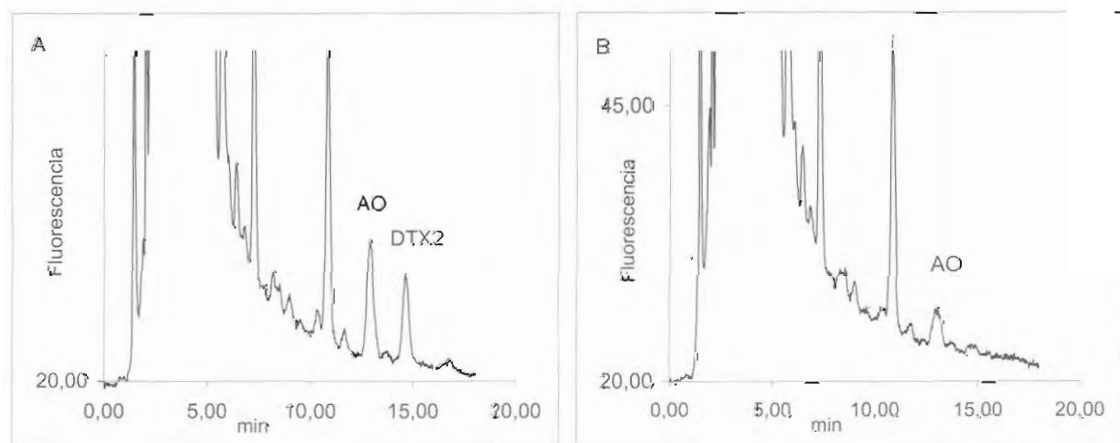
síntesis de toxinas DSP, estimándose la tasa de producción de toxina por célula en 0.33 d^{-1} . El descenso de toxina por célula obtenido tras 7 días de mantenimiento artificial revelaría el principio del decaimiento del arrastre. Los resultados obtenidos en este análisis y en estimaciones previas de Blanco *et al.* (1995) nos muestran que la DTX2 puede constituir hasta un 40% del total de toxinas. Ello no supone un problema en los análisis rutinarios mediante bioensayo de ratón, que estiman el efecto biológico del conjunto de toxinas diarreas, pero si podría serlo en el caso de métodos alternativos que no fueran muy sensibles a la detección de esta toxina.

Se confirma la variabilidad de contenido tóxico en *D. acuminata*. Los valores de otoño ($21.7 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$), dos veces más altos que los de verano (promedio: $9 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$), unido a las altas concentraciones celulares ($26 \times 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) alcanzadas (Maneiro *et al.*, sometido), explican la intensidad de los episodios de DSP en las Rías Bajas en 1998 (Salgado *et al.*, este volumen) en los que la especie de *Dinophysis* dominante fue *D. acuminata*. Al menos en la muestra estudiada no se detectaron DTX4 ó ésteres del OA, DTX2 ó DTX1. No obstante, los escasos datos disponibles no nos permiten descartar su presencia, quizás minoritaria, ni la posible presencia de DTX-2 en esta especie (de lo que también existen algunos indicios en el trabajo de Blanco *et al.*, 1995) de igual manera que la DTX1 acompaña al OA en *D. acuta* y *D. acuminata* de los fiordos noruegos (Johansson *et al.*, 1996). La presencia de acyl-derivados ha sido demostrada en bivalvos gallegos (Fernández *et al.*, 1996) y portugueses (Vale *et al.*, 1999), pero hasta la fecha nadie ha demostrado la presencia de ésteres o DTX4 en células de *Dinophysis* ó en bivalvos expuestos a proliferaciones de especies de este género. Yasumoto *et al.* (1985) hipotetizaron que los acyl-derivados podrían resultar de transformaciones metabólicas en las glándulas digestivas de los bivalvos. Suzuki *et al.* (1999) han aportado pruebas de la conversión de DTX1 (transmitida por *D. fortii*) en DTX3 en las vieiras japonesas (*Patinopecten yessoensis*). Con respecto a la posible ocurrencia de diol-ésteres ó DTX4 en bivalvos, Quilliam *et al.* (1996) sugirieron que en el caso de que los bivalvos ingirieran fitoplancton conteniendo estos compuestos, las esterases presentes en las glándulas digestivas de los moluscos los hidrolizarían a OA, DTX1 o DTX2.

La presencia de cantidades traza de OA en *D. caudata*, en una única muestra analizada, de septiembre de 1997, requiere confirmación en futuros análisis. No obstante, Blanco *et al.* (este volumen), aplicando análisis de regresión múltiple a los resultados de toxicidad de arrastres fitoplanctónicos en 1994 (año en que *D. caudata* fue más abundante que lo normal) concluyeron que esta especie, en el período estudiado, debía contribuir poco ó nada a la toxicidad global obtenida. Los datos presentados en este trabajo constituyen el primer ensayo de toxicidad en células de *D. caudata* aisladas por micromanipulación. Okaichi *et al.* (1967) reportaron muertes de peces asociadas a mareas rojas de esta especie en el Golfo de Tailandia y en el Mar Interior de Seto, pero no se investigaron las posibles causas (anoxia, elevado nivel de toxinas...) de la muerte de los peces. Tahri-Joutei (1998) señala a *D. caudata* como potencial agente de episodios diarreicos en Marruecos. Los datos presentados en este trabajo constituyen los primeros resultados sobre determinación de toxinas DST por CLAE en células de *D. caudata* aisladas por micromanipulación.

Tabla II. Contenido tóxico ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) de distintas especies de *Dinophysis* de poblaciones naturales de las Rías de Vigo y Pontevedra aisladas por micromanipulación.

Especie	Fecha de arrastre	Fecha de Aislamiento	Nº de células aisladas	Nº células inyectadas	Toxicidad ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$)
<i>D. acuminata</i>	06.98	06.98	461 491	201 199	9.9 OA 7.9 OA
	8.09.98	9.09.98	857	246	21.7 OA
	9.10.97	10.10.97	1250	308	10.7 6.3 OA 4.4 DTX-2
<i>D. acuta</i>	9.10.97	14.10.97	1214	412	55.1 33.1 OA 22.0 DTX-2
	9.10.97	16.10.97	534	175	24.1 18.4 OA 5.7 DTX-2
	9.10.97	10.10.97	1388	342	0.73 OA

Figura 1. Cromatogramas de análisis por CLAE de extractos de células aisladas por micromanipulación de a) *D. acuta* de octubre del 97; b) *D. acuminata* de junio del 98.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al "Centro de Control da Calidade do Medio Mariño" (Xunta de Galicia) por sus alertas de la presencia de especies potencialmente tóxicas y toxicidad en los bivalvos, que constituyen un apoyo logístico imprescindible para nuestro trabajo; a Elena Ávila por su apoyo técnico y a la tripulación del B.O. "J.M.Navaz" por su constante servicio en la recogida de arrastres fitoplanctónicos siempre que fueron requeridos. Este trabajo ha sido financiado con fondos de los proyectos MAR95-1791 y MAR98-0978 (CICYT) y del proyecto 11.02 del Instituto Español de Oceanografía.

REFERENCIAS

- Andersen, P., Hald, B., and Emsholm, H. (1996). Toxicity of *Dinophysis acuminata* in Danish coastal waters. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds.) Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO Publishers, pp. 281-284.
- Bermúdez de la Puente, M., Salgado, C., y Arévalo, F. (este volumen). Episodios tóxicos detectados en las Rías Gallegas durante los años 1997 y 1998: resultados y evolución.
- Blanco, J., Fernández, M.L., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E., and Martínez, A. (1995). From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Harmful Marine Algal Blooms. Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien P. and Marcaillou-Le Baut C. (eds.). Lavoisier, París, pp. 777-782.
- Blanco, J., Moroño, A., Pazos, Y., Maneiro, J., and Mariño, J. (1998). Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rías: environmental and biological influences. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. and Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, pp. 204-207.
- Blanco, J., Pazos, Y., Arévalo, F., Salgado, C., Bermúdez de la Puente, M., Maneiro, J., y Moroño, A. (este volumen). Contenido de ácido okadaico de las células de *Dinophysis* responsables de varios episodios tóxicos en las Rías Gallegas.
- Cembella (1989). Occurrence of okadaic acid, a major diarrhetic shellfish toxin, in natural populations of *Dinophysis* spp from the Eastern coast of North America. J.Appl. Phycol. 1: 307-310.
- Delgado, M., Garcés, E., and Camp, J. (1996). Growth and behaviour of *Dinophysis sacculus* from NW Mediterranean Sea. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds.) Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO Publisher pp. 261-264.
- Fernández, M. L., Míguez, A., Cacho E., and Martínez, A. (1996). Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. Toxicon 34 (3): 381 - 387.
- Gago-Martínez, A., Rodríguez-Vázquez, J.A., Thibault, P., and Quilliam, M.A. (1996). Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. Nat. Toxins, 4 (2), 72-79.
- Hu, T., Doyle, J., Jackson, D., Mar, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A. and

- Wright, J.L.C. (1992). Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992, 39-41.
- James, K.J., Bishop A.G., Healy, B.M., Roden, C., Sherlock, I.R., Twohig, M., Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L. (1999). Efficient isolation of the rare diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. *Toxicon*. 37(2)343-357.
- Johansson, N., Granéli, E., Yasumoto, T., Carlsson, and Legrand, C. (1996). Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds.) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO Publishers, pp. 277-280.
- Lawrence, J.E., Bauder, A.G., Quilliam, M.A., and Cembella, A.D. (1998). *Prorocentrum lima*, a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada.). In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., and Wyatt, T. (Eds.) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, pp. 78-79.
- Lee, J.-S., Yanagi, T., Kenma, R., and Yasumoto, T. (1987). Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 51: 877-881.
- Lee, J-S., Igarashi, T.T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., and Yasumoto, T. (1989) Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.*, 1, 147-152.
- Masselin, P., Lassus, P., and Bardouil, M. (1992). High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *J. Appl. Phycol.* 4:385-389
- Okaichi, T. (1967). Red tides found in and around the Seto Island Sea in 1965. *Tech. Bull. Fac. Agricul. Kagawa Univ.* 15: 181-185.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N.W. and Windust, A.J. (1996). Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds.) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO Publishers, pp. 289-292.
- Reguera, B., Bravo, I., and Fraga, S. (1990). Distribution of *Dinophysis acuta* at the time of a DSP outbreak in the rías of Pontevedra and Vigo (Galicia, NW Spain). *International Council for the Exploration of the Sea*, C.M. 1990/L:14.
- Reguera, B., Bravo, I., Marcaillou-Le Baut, C., Masselin, P., Fernández, M.L., Míguez, A., and Martínez, A. (1993a). Monitoring of *Dinophysis* spp and vertical distribution of okadaic acid on mussel rafts from Ría de Pontevedra (NW Spain). In: Smayda T.J., and Shimizu Y. (Eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 553-558.
- Reguera, B., Bravo, I., Mariño, J., Campos, M.J., Fraga, S., and Carbonell, A. (1993b). Trends in the occurrence of *Dinophysis* spp in Galician coastal waters. In: Smayda T.J., and Shimizu Y. (Eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 559-564.
- Suzuki, T., Ota, H., and Yamasaki, M. (1999). Direct evidence of transformation of

dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37 (1): 187-198

Vale, P. and Sampayo, M.A. (1996). DTX-2 in Portuguese bivalves. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds.) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO Publishers, pp. 539-542.

Vale, P., Sampayo, M.A.M., and Quilliam, M. (1998). DSP complex toxin profiles relation with *Dinophysis* spp occurrence and domoic acid confirmation by LC-MS in Portuguese bivalves. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., and Wyatt, T. (Eds.) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, pp. 503-506.

Vale P., Sampayo M.A. (1999). Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* 37, 1109-1121.

Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Sano M., Matsumoto G., and Clardy J. (1985). Diarrhetic Shellfish Toxins. *Tetrahedron* 41, 1019-1025

NOVOS RESULTADOS SOBRE ESTUDOS DE TOXICIDADE PSP EM DINOFLAGELADOS E BACTÉRIAS ASSOCIADAS

Paulo Pereira*, Dario Andrinolo**, Filomena Sam-Bento*, Paula Alvito*
Claudia Martins* e Susana Franca*

*Unidade de Biologia e Ecotoxicidade, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

**Laboratório de Bioquímica de Membrana, Faculdade de Medicina -Universidade de Chile

Agradecimentos:

A realização e apresentação deste trabalho foi suportada pelo Programa PRAXIS XXI (Projecto 2/2.1/MAR/1730) do Ministério da Ciência e Tecnologia. Parte do trabalho decorreu durante a estadia de um dos autores (D.A.) na Unidade de Biologia e Ecotoxicidade do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, financiada pelo Convénio Bilateral de Cooperação Científica ICCTI (Portugal) / CONICYT (Chile).

RESUMO

O possível envolvimento de bactérias associadas a dinoflagelados na produção de toxinas, proposto por Silva no início da década de 60 (Silva, 1962), tem sido estudado, quer através da comparação da toxicidade manifestada em culturas antes e após a remoção de bactérias associadas, quer com a demonstração de capacidade de produção autónoma de PSP em bactérias isoladas. Contudo, ambas as abordagens revelam resultados contraditórios e insuficientes.

Neste trabalho pretendeu-se determinar eventuais alterações no perfil toxicológico e no crescimento de culturas não axénicas de *Gymnodinium catenatum* tóxico e *Alexandrium lusitanicum* não tóxico, exercidas pela introdução de bactérias não tóxicas isoladas de diferentes dinoflagelados. A introdução das bactérias realizou-se com a inoculação de 100ul de cultura bacteriana a meio da fase logarítmica de crescimento em 50ml de cultura de dinoflagelados em início de fase logarítmica de crescimento. Foram utilizadas duas bactérias isoladas de cada uma das culturas de dinoflagelados usadas e três bactérias obtidas de uma cultura de *Alexandrium catenella* isolado da costa Chilena. Resultados preliminares obtidos por HPLC, indicam que a composição de toxinas PSP produzidas por *G. catenatum* se mantém constante (GTX 1,3,4,5) antes e após a inoculação das bactérias nas culturas. Foram, no entanto, detectadas alterações nas quantidades relativas e totais de toxinas produzidas por célula. Pelo contrário, a introdução das mesmas bactérias em *A. lusitanicum* não provocou

qualquer alteração toxicológica nas culturas deste dinoflagelado que, como se mostra parece ter perdido a capacidade de produzir toxinas. O aumento da toxicidade de culturas algais axénicas, após a re-introdução das bactérias isoladas, tem sido descrito por diversos autores (Bates *et al.*, 1995; Doucette & Powell, 1998). Para alguns casos, este aumento parece ser produzido apenas com a re-introdução de bactérias isoladas da própria estirpe, enquanto que para outros, pode surgir igualmente com a inoculação de bactérias distintas, taxonomicamente e quanto à origem. A comparação das modificações induzidas pela introdução das bactérias de diferentes origens no perfil tóxico e no crescimento de culturas não axénicas de *G. catenatum*, não permitiu detectar a existência de qualquer efeito de especificidade taxonómica de interacção bactéria-dinoflagelado na determinação das características toxicológicas e no crescimento deste dinoflagelado.

ABSTRACT

The possible involvement of bacteria associated to dinoflagellates in toxin production, first described by Silva in the beginning of the 60's (Silva, 1962) has been studied either through the comparison of the toxicity of cultures before and after the removal of the associated bacteria (Bates *et al.*, 1995; Doucette & Powell, 1998) or by studies showing the possibility of autonomous production of PSP toxins by isolated bacteria (Kodama *et al.*, 1990). However, until now both approaches have revealed contradictory and insufficient results.

This study intends to show possible changes in toxic profile and growth of non-axenic cultures of the toxic *Gymnodinium catenatum* and non-toxic *Alexandrium lusitanicum* after the introduction of non-toxic bacteria isolated from different dinoflagellates. 100 ul of a mid-exponential growth bacterial culture was inoculated in 50 ml of the dinoflagellate culture at the beginning of the exponential growth phase. Two different bacteria isolated from these studied dinoflagellates and three other bacteria isolated from *Alexandrium catenella* were used. Preliminary results obtained by HPLC showed the stability of the toxic profile of *G. catenatum* (GTX 1,3,4 and 5) before and after bacterial inoculation. However changes were observed on the toxin balance and on the total toxicity per cell. On the other hand, the introduction of the same bacteria on *A. lusitanicum* did not show any toxicity change. It is noteworthy that the strain used in this study seems to have lost toxicity. Previous work had showed the enhancement of dinoflagellates toxicity by the introduction of bacteria. However, the comparison of changes induced by the introduction of bacteria of different origins in the toxic profile and growth of non-axenic culture of *G. catenatum* did not show the existence of taxonomic specificity on the interaction bacteria/dinoflagellate in the determination of the toxicological characteristics and growth of this dinoflagellate species.

INTRODUÇÃO

Para compreender a relação entre dinoflagelados e bactérias associadas, tem sido estudada a sua influência no desenvolvimento de "blooms" (Imai *et al.*, 1993, Fukami *et al.* 1991) e na produção de toxinas (Prokic, *et al.* 1996; Kim *et al.*, 1993). Sob este aspecto, a suposta participação de bactérias isoladas de dinoflagelados na produção de toxinas pode envolver tanto a síntese bacteriana de toxinas, como a influência indirecta das bactérias na produção algal de toxinas. Ambas as hipóteses tem sido testadas, quer através da comparação da toxicidade manifestada em culturas algais axénicas e não axénicas (Kim *et al.*, 1993, Doucette & Powell, 1998), quer com a demonstração de capacidade de produção autónoma de PSP em bactérias isoladas (Kodama *et al.*, 1990; Gallacher *et al.*, 1997). Contudo, ambas as abordagens têm revelado resultados contraditórios e ainda insuficientes. Se por um lado, o efeito da axenicidade nas características toxicológicas de dinoflagelados em cultura parece não ser

uniforme (Kim *et al.*, 1993; Franca *et al.*, 1996; Doucette & Powell, 1998), por outro, levantam-se questões quanto às toxinas produzidas pelas estirpes de bactérias isoladas de espécies tóxicas, nomeadamente, a reduzida quantidade de toxinas produzidas pelas bactérias até agora isoladas, que não explica as diferenças encontradas na toxicidade das culturas algais de origem, antes e após a remoção das bactérias.

Este trabalho pretende estudar a capacidade de produção autónoma de toxinas PSP em 5 bactérias isoladas de 3 estirpes de dinoflagelados pertencentes aos géneros *Alexandrium* e *Gymnodinium* e determinar eventuais alterações no perfil toxicológico e no crescimento de culturas de *Gymnodinium catenatum* e *Alexandrium lusitanicum*, exercidas pela introdução das bactérias no meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de dinoflagelados:

Culturas não axénicas de *A. lusitanicum* LME 18.1 (=AL18, Dodge, 1982), isolado da Lagoa de Óbidos, Portugal, e de *G. catenatum* LME 348 (Balech, 1988), isolado de Sagres, Portugal, foram mantidas, respectivamente, em meio ASP7 (Provasoli, 1963), e meio GPM (Loeblich, 1975), à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, luminosidade de 3500 Lux, 14:10 L:D. O crescimento das culturas foi acompanhado por contagem periódica de células fixadas com glutaraldeído ao microscópio óptico. Parte das culturas foi recolhida no final da fase exponencial do crescimento e concentrada por centrifugação (1200 rpm, 15 min, 10°C) para análise toxicológica.

Cultura de bactérias:

Foram utilizadas 5 estirpes de bactérias isoladas de dinoflagelados conforme os procedimentos descritos por Franca *et al.* (1995,1996), mantidas em meio SWC (Haygood & Nealson, 1985) ou marine Broth (DIFCO) (500ml), em permanente agitação, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$: *Pseudomonas stutzerii*, isolada de LME 18.1; *Pseudomonas diminuta*, isolada de LME 348; e 3 bactérias não identificadas - estirpes A, G e U (Alvito *et al.* 1997) - isoladas a partir de *Alexandrium catenella* ACC07 proveniente do Chile (Lagos, 1998).

Inoculação de bactérias nas culturas de dinoflagelados:

A introdução das bactérias nas culturas de dinoflagelados realizou-se no início da fase logarítmica de crescimento dos dinoflagelados. Para o inóculo, 1 ml de cada cultura bacteriana a meio da fase logarítmica de crescimento foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 20 min., a 8°C . O sobrenadante foi decantado e o pellet ressuscitado em 1 ml de meio esterilizado ASP7 ou GPM, segundo o destino da bactéria. 100 ml do ressuscitado (correspondente a 100.000 células bacterianas, aprox.) foram inoculados em 50 ml de cultura algal. Todas as bactérias foram inoculadas em duplicado. Culturas não inoculadas serviram de controlo. O número de bactérias viáveis inoculadas em cada cultura foi calculado por plaqueamento triplicado do ressuscitado em Marine agar e SWC agar. Este procedimento permitiu também verificar a pureza da cultura bacteriana no momento da inoculação.

Extracção e análise de toxinas PSP:

A extracção do pellet celular obtido no final da fase exponencial de crescimento dos dinoflagelados, foi feita em ácido acético 0,5M segundo o protocolo descrito por Oshima (1995).

O extracto foi filtrado por ultra-free (Millipore) antes da análise por HPLC.

As culturas bacterianas, recolhidas na fase final do crescimento exponencial, foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante 20 min. a 8°C. Os pellets foram liofilizados, ressuscitados em 2 ml de ácido acético 0,5M e submetidos a 3 ciclos de extracção constituídos por congelação/descongelação, ultra vibração (5000rpm, 50 seg.) em esferas de zircónio (Mini Bead Beater, Biospec Products, OK, USA) e banho de ultrasons (60 seg.). Os extractos foram centrifugados e os pellets re-extraídos. O sobrenadante resultante das duas extracções foi eluído numa coluna C18 (sep-pak) previamente condicionada e concentrado em speed-vac (Savant, mod. AES100, NY, USA) até um volume final de 500 µl.

A detecção e quantificação de toxinas foi feita por HPLC, segundo o método descrito por Oshima (1995). As análises foram efectuadas num sistema Shimadzu (Model LC-6A), usando uma coluna de fase reversa (Hypersil MOS 5µm, 150X4,6mm, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). As concentrações de toxinas nos extractos foram determinadas por comparação das áreas de cada pico com as dos picos correspondente na solução padrão (Oshima, 1995).

RESULTADOS

1. Produção autónoma de toxinas nas bactérias analisadas

Não foram detectadas toxinas PSP nos extractos das bactérias isoladas.

A fig. 1 mostra os cromatogramas relativos à análise de toxinas C1-C4. A sua autenticidade foi testada por remoção da solução oxidante no sistema de reacção pós-coluna, dada a coincidência dos tempos de retenção de alguns dos picos registados nas bactérias (fig.1.A-E) com os da solução padrão (fig.1.Pd). Nestas condições os compostos observados nos extractos bacterianos mantêm-se fluorescentes, ao contrário do que se verifica para a mistura padrão.

As fig.s 2 e 3 mostram os cromatogramas relativos à análise de toxinas GTX1-5 e STXs, respectivamente. Não foram detectados quaisquer compostos com tempos de retenção semelhantes aos das soluções padrão.

2. Influência da introdução das bactérias no crescimento de *A. lusitanicum* e *G. catenatum*

A fig. 4 apresenta as curvas de crescimento das culturas de *A. lusitanicum* e *G. catenatum* controlo (não inoculadas com bactérias) e das culturas inoculadas com cada uma das bactérias estudadas. As culturas controlo de *A. lusitanicum*, apresentam um

Fig 1. Análise de toxinas C1-C4 em condições normais (coluna esquerda) e após remoção do oxidante (coluna direita), na solução padrão (Pd) e para cada uma das bactérias isoladas: A- bactéria A; B- bactéria G; C- Bactéria U; D- *Pseudomonas diminuta*; E- *P. stutzerii*

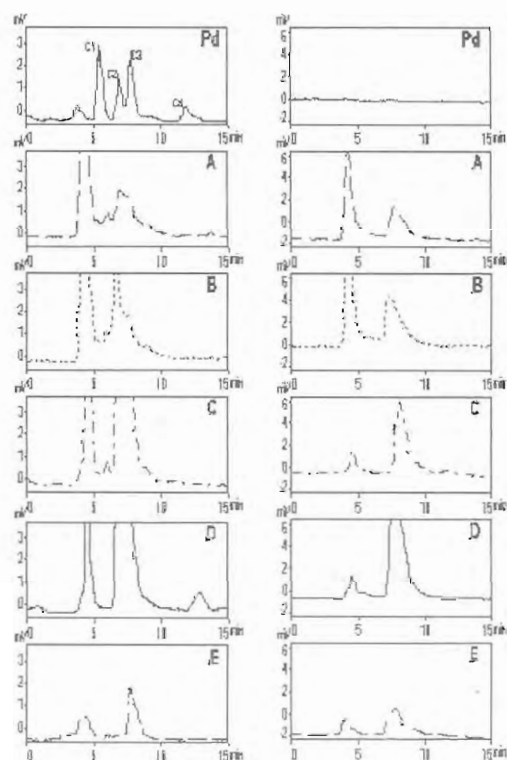


Fig.2 Análise de toxinas do grupo GTX na solução padrão e em cada uma das bactérias indicadas.

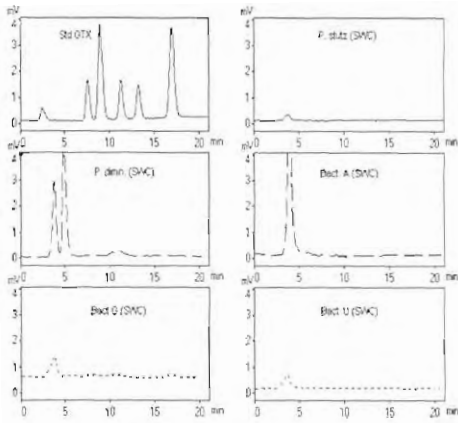
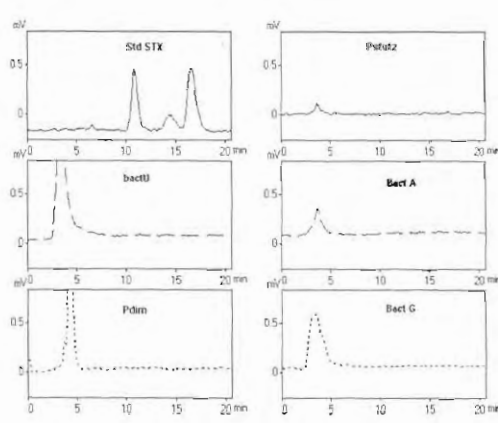


Fig.3 Análise de toxinas do grupo STX na solução padrão e em cada uma das bactérias indicadas.



crescimento exponencial até ao décimo sétimo dia, seguido de um súbito decréscimo detectado no dia 20. Um padrão de crescimento muito semelhante foi igualmente observado nas culturas de *G. catenatum*, ainda que as densidades celulares atingidas sejam sensivelmente inferior nesta estirpe. Em qualquer dos casos, quer para o *A. lusitanicum*, quer para o *G. catenatum*, não se registaram diferenças significativas no padrão e nas taxas de crescimento entre as culturas controlo e as culturas introduzidas com bactérias. Apenas nas culturas introduzidas com *Pseudomonas stutzerii* se registou, nos primeiros 17 dias, uma ligeira oscilação nas curvas de crescimento de ambas as espécies, que contrasta com o crescimento contínuo obtido durante esse período nas restantes culturas.

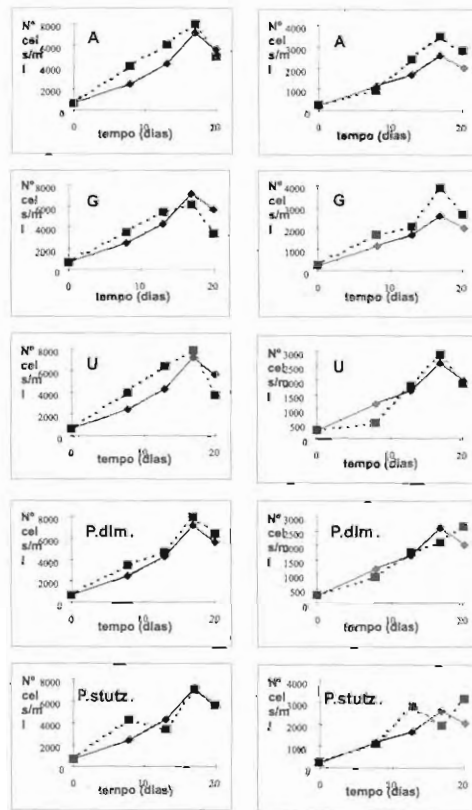
Contudo, mesmo nestes casos, as culturas parecem recuperar bem, atingindo densidades iguais (no caso do *A. lusitanicum*) ou superiores (no caso do *G. catenatum*) às das culturas controlo, ao fim dos 20 dias em que foram seguidas.

3. Influência da introdução das bactérias na produção de toxinas PSP:

3.1. *Em Gymnodinium catenatum*:

A figura 5 apresenta os cromatogramas relativos à análise de toxinas C1-C4 (fig.5.a.), GTX1-5 (fig.5.b) e STXs (fig.5.c.), nas soluções

Fig. 4. Curvas de crescimento das culturas de *A. lusitanicum* (gráficos da coluna esquerda) e de *G. catenatum* (coluna direita): a tracejado - culturas controle; a cheio - culturas inoculadas com cada uma das bactérias indicadas (A, G, U, P. Dimin. e P. Sturz.). Os pontos representam valores médios dos duplicados de cada cultura.



padrão e nas culturas controle de *G. catenatum* LME 348. O perfil toxicológico, com produção de C1, C2 e C4 e GTX 1, 3, 4 e 5, corresponde ao anteriormente descrito para esta estirpe, em idênticas condições de cultura (Franca *et al.*, 1993).

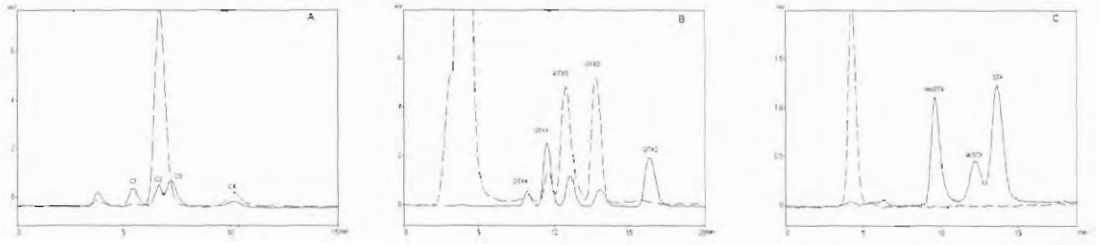


Fig. 5. Cromatogramas relativos à análise de toxinas C1-C4 (A), GTX 1-5 (B) e STXs (C) nas soluções padrão (linha contínua) e nas culturas controle de *G. Catenatum* (a tracejado).

A figura 6 apresenta os cromatogramas de *G. catenatum* em culturas controle e culturas

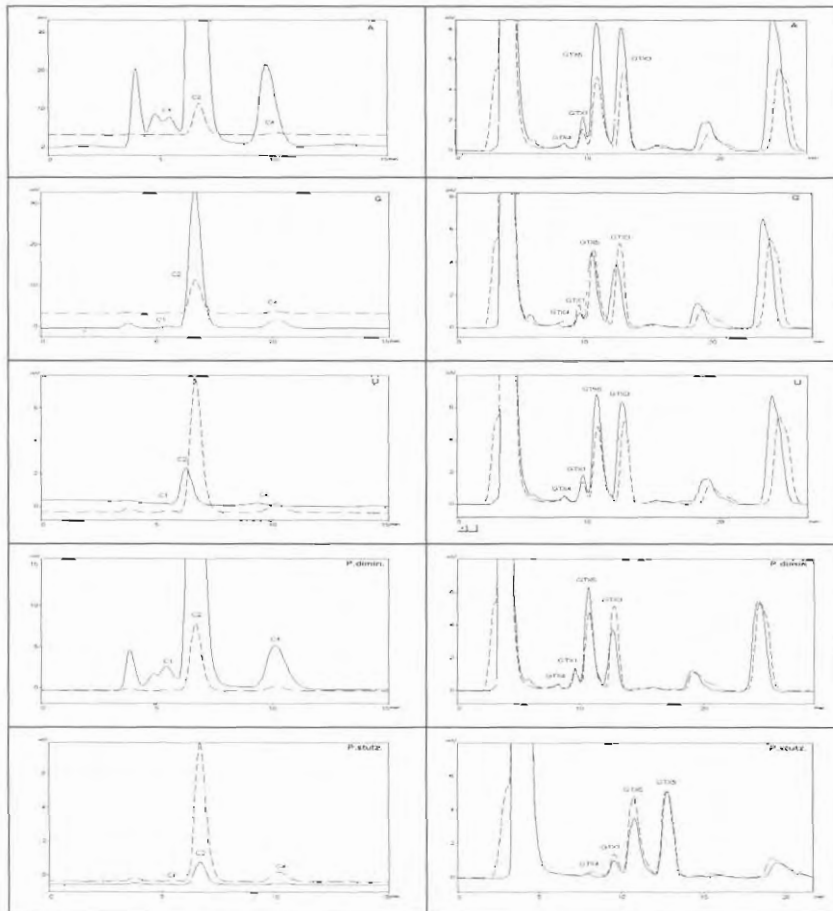


Fig. 6. Análise de toxinas C1-C4 e GTX 1-5 em culturas de *G. catenatum* inoculadas com cada uma das bactérias indicadas no respectivo cromatograma. A tracejado estão representados os cromatogramas das culturas controle (apresentados na fig 5.)

inoculadas com cada uma das com bactérias, para os grupos C1-C4 e GTX 1-5.

Os gráficos da figura 7 resumem os resultados obtidos nas análises de HPLC para as diferentes culturas de *G. catenatum* com a representação das quantidades relativas (% mole) e totais (fmol/cel.) de toxinas obtidas para cada cultura.

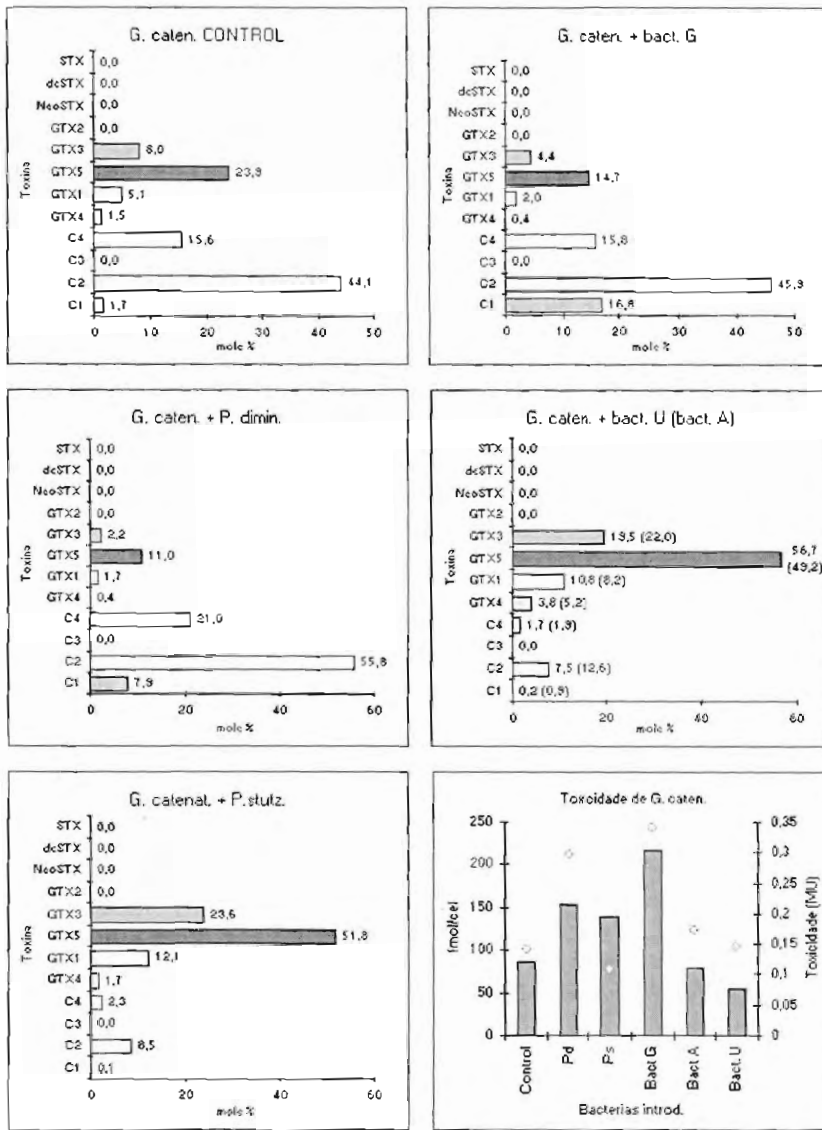


Fig. 7. Perfis toxicológicos - mole% (gráficos de barras horizontais); quantidades totais de toxinas produzidas por célula - fmole/célula (barras verticais); e toxicidades totais - MU (ponts), registrados nas culturas de *G. catenatum* controle e inoculadas com cada uma das bactérias assinaladas. A toxicidade total foi calculada pela soma das toxicidades específicas das toxinas presentes em cada cultura e é dada em "mouse units" (MU) definidos como a quantidade de toxina necessária para matar um ratinho de 20 g em 15 minutos.

3.2. *Em Alexandrium lusitanicum*:

Os cromatogramas relativos à análise de toxinas PSP nas soluções padrão e nas culturas controle de *A. lusitanicum* estão representados na fig.8. Não foram detectadas quaisquer toxinas PSP nos extractos das deste clone, onde anteriormente foi identificada a produção de toxinas PSP (Franca *et al.*, 1996; Doucette & Powell, 1998). A inoculação das bactérias no meio de cultura deste dinoflagelado não produziu qualquer alteração toxicológica, mantendo-se a ausência de toxinas nos extractos das culturas inoculadas (cromatogramas não mostrados).

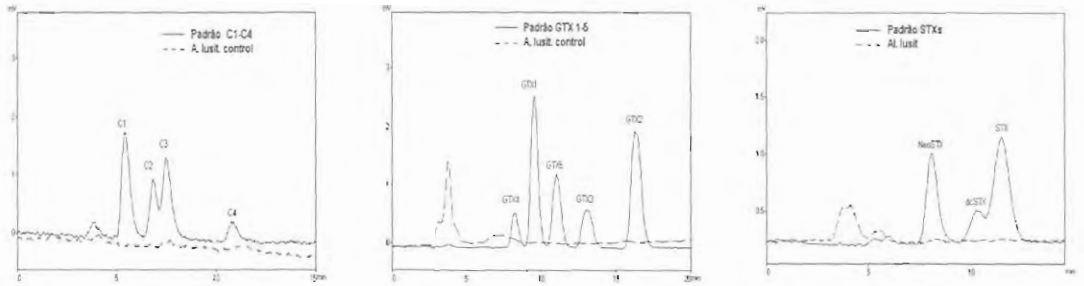


Fig. 8. Cromatogramas relativos à análise de toxinas C1-C4, GTX 1-5 e STXs nas soluções padrão (linha contínua) e nas culturas controle de *A. lusitanicum* (a tracejado).

DISCUSSÃO

As bactérias isoladas não parecem ter capacidade autónoma de produção de toxinas PSP. De facto, a sobreposição de alguns componentes da matriz bacteriana dos extractos analisados, com tempos de retenção próximos dos de toxinas C1-C4, poderá ter induzido a uma falsa identificação de compostos tóxicos, tal como anteriormente evidenciado para *Moraxella* sp. (Shimizu, 1996). Esta evidência introduz uma alteração na orientação dos estudos sobre a influência das bactérias na produção de toxinas PSP nos dinoflagelados.

Verificou-se também, que a introdução das bactérias testadas no meio de cultura dos dinoflagelados não provocou perturbações significativas no crescimento das microalgas.

Relativamente à influência das bactérias na produção de toxinas, destaca-se, nestes ensaios preliminares, que a inoculação das bactérias nas culturas de *G. catenatum* não provocou alterações na composição de toxinas produzidas, que se manteve idêntica à das culturas não inoculadas. Contudo, as quantidades relativas de cada toxina parecem variar entre culturas inoculadas com diferentes bactérias. Assim, enquanto que nas culturas inoculadas com as bactérias U e *Pseudomonas stutzerii*, as toxinas do grupo GTX são produzidas em maior quantidade, nas culturas inoculadas com as bactérias G e *Pseudomonas diminuta*, as toxinas do grupo C1-C4 parecem ser as dominantes. As culturas controle, não inoculadas com bactérias, apresentam um perfil intermédio, com predominância das toxinas C4 e GTX5.

Relativamente às quantidades totais de toxinas produzidas por célula, observaram-se diferenças significativas entre as diferentes culturas de *G. catenatum*. Assim, se por um lado, nas culturas inoculadas com as bactérias A e U se registou um pequeno decréscimo na quantidade total de toxinas produzidas por célula, quando comparadas com as culturas padrão, nas culturas inoculadas com as bactérias G, *Pseudomonas stutzerii* e *P. diminuta*, essa

quantidade registou um aumento significativo. No caso das culturas inoculadas com *P. stutzerii* esse aumento não foi acompanhado de um aumento na toxicidade dado que a toxicidade específica de GTX5 (160MU/mole), toxina predominante nestas culturas, é muito inferior à toxicidade específica de C2 (239MU/mole), que predomina na cultura controle. Em todas as restantes culturas inoculadas com bactérias, se registou um aumento da toxicidade, relativamente à toxicidade das culturas controle (fig.9.f).

O aumento da toxicidade de culturas algais axénicas, após a introdução das bactérias isoladas, tem sido descrito por diversos autores (Kim *et al.*, 1993; Bates *et al.*, 1995; Doucette & C. Powell, 1998). Para alguns casos, este aumento parece ser produzido apenas com a re-introdução de bactérias isoladas da própria estirpe (Doucette & C. Powell, 1998), enquanto que para outros, pode surgir igualmente com a inoculação de bactérias distintas, taxonomicamente e quanto à origem (Bates *et al.*, 1995). A comparação das modificações induzidas pela introdução das bactérias de diferentes origens no perfil tóxico e no crescimento de culturas não axénicas de *G. catenatum*, não permitiu detectar a existência de qualquer efeito de especificidade taxonómica de interacção bactéria-dinoflagelado na determinação das características toxicológicas e no crescimento deste dinoflagelado. Do mesmo modo, a reintrodução de *Pseudomonas stutzerii* no seu clone de origem, *A. lusitanicum* LME18.1, não produziu qualquer efeito na toxicidade deste dinoflagelado que parece ter perdido a capacidade de produção de toxinas PSP.

BIBLIOGRAFÍA

- Franca, S., Pinto, L., Alvito, P., Sousa, I., Vasconcelos, V., Doucette, G. 1996. Studies on prokariotes associated with PSP producing dinoflagellate. In: T.Yasumoto, Y.Oshima and Y.Fukuyo, (eds) Harmful and Toxic Algal Blooms (IOC of UNESCO). pp347-350.
- Prokic, I., Brümmer, F., Brigge, T., Görtz, H., Gerdt, G., Schütt, C., Elbrachter, M., and Müller, W. 1998. Bacteria of the Genus *Roseobacter* associated with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Protist.* 149: 347-357.
- Silva, E.S. 1962. Some observations on marine dinoflagellates cultures. III-*Gonyaulax tamarensis* Leb. and *Peridinium trochoideum* Lemm. *Not. Est. Inst. Biol. Mar.* 26:1-24.
- Provasoli, L. 1963. Growing marine seaweeds. Reprinted from "Proceedings of the 4th International Seaweed Symposium" (Biarritz, 1961). Pergamon Press, Oxford.UK. 9-17.
- Loeblich A.R., III, 1975. A seawater medium for dinoflagellates and the nutrition of *Cachonia niei*. *Journal of Phycology*, 11:80-86.
- Doucette G. & Powell C. 1998. Algal-bacterial interactions: can they determine the PSP-related toxicity of dinoflagellates? In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T., (eds.) Harmful Algae. (Xunta de Galicia and IOC of UNESCO). pp.406-409.
- Kodama, M.; Ogata, T.; Sakamoto, S.; Sato, S., Honda, T. and Miwatani, T. 1990, Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon*, 28, pp707-714
- S. Franca P. Alvito I. Sousa V. Mascarenhas 1993. The dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from the coast of Portugal: observation on development, toxicity and ultrastructure. In: Smayda, T.J. Shimidzu, Y (eds). Toxic phytoplankton Blooms in the Sea, Elsevier, Ny, pp. 869-874.

- Franca, S., Sousa, I., Alvito, P., Gago, A., Rodriguez-Vasquez, J.A., Leão, J.M., Comesaña, M., Thibault, P., Burdaspal, P., Bustos, J., and Legarda, T., 1996b The toxin profile of some PSP toxin producing dinoflagellates occurring in Portuguese coastal waters as determined by alternative analytical methods. In: T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo, (eds) Harmful and Toxic Algal Blooms (IOC of UNESCO). pp.519-522.
- S. Franca, S. Viegas, V. Mascarenhas, L. Pinto, and G.J. Doucette, in: Harmful Marine Algal Blooms, P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou, eds. Lavoisier, Paris, pp. 45-51 (1995)
- P. Alvito, I. Sousa, P. Falcão, S. Franca, N. Lagos, in VIII International Conference on Harmful Algae (Abstracts and Posters Classification). Vigo, Spain. (1997)
- Kim, C.H., Sako, Y, and Ishida, Y. 1993. Variation of toxin production and composition in axenic cultures of *Alexandrium catenella* and *A. tamarense*. Nippon Suisan Gakkaishi. 59. Pp. 633-639
- Imai, I., Ishida, Y., Hata, Y. 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga sp.*, isolated from the coastal sea of Japan. Mar. Biol. 116: 527-532.
- Fukami, K.; Yuzawa, A.; Nishijima, T.; Hata, Y. 1991. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. Nippon Suisan Gakkaishi. 58: 1073-1077.
- Bates, S.S.; Douglas, D.J., Doucette, G.J., Leger, C. 1995. Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. Nat. Toxins 3: 428-435.
- Shimidzu, Y., Giorgio, C., Koerting-Walker, C., and Ogata, T. 1996. Nonconformity of bacterial production of paralytic shellfish poisons-neosaxitoxin production by a bacterium strain from *Alexandrium tamarense* Ipswich strain and its significance. In: T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo, (eds) Harmful and Toxic Algal Blooms (IOC of UNESCO). Pp. 359-362.

ESTUDIO SOBRE LA TOXICIDAD DE *Haliotis Tuberculata*. HIPÓTESIS SOBRE SU POSIBLE ORIGEN

Bravo¹, I., J.M. Franco², P. Molist³, M. Lastres⁴, A. Alonso³ y M. Zapata⁵

(1) IEO, Centro Oceanográfico de Vigo, Apto 1552, 36280 Vigo. (2) Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, dirección actual en (1). (3) Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidade de Vigo, 36200 Vigo. (4) IGAGA, Illa de Arousa, Vilanova, Pontevedra. (5) Centro de Investigacións Mariñas Aptado 13, 36620 Vilanova de Arousa.

Los resultados sobre la toxicidad de tipo PSP del gasterópodo *Haliotis tuberculata* procedente de la costa gallega sugieren una alta capacidad de las orejas de mar para retener las toxinas en la epidermis del pié o bien una producción de las toxinas desde el mismo. En la presente comunicación se presentan los primeros resultados sobre contenido de toxinas de *Haliotis tuberculata* de 18 y 30 meses de edad procedentes de cultivos. Los valores de toxicidad detectados fueron muy inferiores a los encontrados para adultos del medio natural, observándose también un incremento de toxinas significativo entre los de 18 y los de 30 meses. Si bien se observó un perfil de toxinas igual que el mencionado en la bibliografía sobre la toxicidad de este molusco, se observaron cambios importantes en cuanto a la distribución de la misma en distintas partes del cuerpo.

Se ha estudiado la estructura de la epidermis del pié del molusco donde se detecta el contenido tan elevado de toxinas, observándose, que es un epitelio prismático simple en el cual se encuentran numerosas células secretoras de mucopolisacáridos y células de revestimiento que presentan gran cantidad de gránulos de melanina y que poseen, muchas de ellas, autofluorescencia correspondiente a la presentada por los pigmentos fotosintéticos. Se describen brevemente los resultados a microscopía óptica y electrónica de transmisión de ese epitelio.

Palabras clave: *Haliotis tuberculata*, oreja de mar, toxicidad PSP, epitelio de *Haliotis tuberculata*

INTRODUCCIÓN

La oreja de mar es un molusco gasterópodo que no se consideró comercialmente importante en Galicia hasta la década de los 80 en que comenzó a explotarse como recurso por el elevado precio que pagaba el mercado japonés. En Abril de 1991 se realizaron los primeros análisis de biotoxinas en estos moluscos detectándose toxinas PSP en todos los individuos analizados por debajo del límite legal. En 1993 se cerró la comercialización de la oreja de mar gallega debido a su toxicidad y a que no se producía una detoxificación natural de las mismas.

A partir de entonces se han llevado a cabo diversos estudios (Martínez *et al.*, 1993, Bravo *et al.*, 1996, Bravo *et al.*, 1999) en torno a este molusco encaminados a caracterizar su toxicidad:

1. La composición de toxinas PSP en *H. tuberculata* fue: 83-100% y 79-100% de dcSTX, el resto STX, en los estudios de 1994 y 1995 respectivamente.
2. En ningún estudio se detectó toxicidad media inferior a 80 μg STX eq/100 g. No encontrándose nunca un individuo con contenido de toxinas cero. Además no se observó disminución de contenido de toxinas en individuos mantenidos en laboratorio en condiciones controladas.
3. No se observaron diferencias significativas entre el contenido de toxinas de las orejas de mar de varias zonas de Galicia (Costa de Lugo, norte de A Coruña y rías de Pontevedra y Vigo).
4. La relación dcSTX/STX es inversamente proporcional a la talla. Los individuos de talla de más de 95 mm mostraron aproximadamente 10 veces más STX en relación a la cantidad de dcSTX que los individuos menores de 65 mm.
5. Los valores de contenido de toxinas en el epitelio del manto fueron significativamente mucho más elevados que para las vísceras y el resto del molusco. Comparando los datos por gramo de cada parte, el epitelio fue 300 veces más tóxico. Teniendo en cuenta los pesos de cada parte para cada individuo el epitelio contuvo como media 2.6 veces más toxina que el resto.

En la presente comunicación se dan nuevos datos de toxicidad de *Haliotis tuberculata* procedentes de cultivos de laboratorio y se comparan con los mencionados en los trabajos anteriores. Además se describen los resultados preliminares de estudios encaminados a la determinación del origen de su toxicidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los análisis de toxinas de *Haliotis tuberculata* procedentes de cultivos se realizaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) siguiendo los métodos descritos en Bravo *et al.*, 1999. Se analizaron separadamente las vísceras, el pie y el epitelio de 10 y 18 individuos de 30 y 18 meses respectivamente, procedentes todos de experimentaciones que se están llevando a cabo en el Instituto Galego de Formación en Acuicultura sobre el crecimiento de la oreja de mar.

Para el estudio de la estructura celular del epitelio se utilizaron especímenes procedentes del medio natural (Baiona, ría de Vigo) para los cuales se comprobó previamente su contenido de toxinas por CLAE. Los cortes histológicos se realizaron con material fijado en formaldehído tamponado para el estudio a microscopía óptica y en el líquido de Karnovsky en el caso de la microscopía electrónica.

La observación de la autofluorescencia del epitelio se realizó a partir de pequeños trozos ultracongelados con nitrógeno líquido, cortados con criostato y observando la fluorescencia en microscopio Zeiss equipado con epifluorescencia (450-490 y 510-560 nm)

Para la extracción de pigmentos hidrosolubles (ficobiliproteínas) se extrajo el epitelio de un espécimen y se congeló/descongeló varias veces en tampón fosfato (0,2 M, pH 7,2). Se centrifugó a 5000 revoluciones/min y el sobrenadante se filtró por 0,22 μ m. El espectro de absorción se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160A y el de fluorescencia mediante un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis de toxinas de individuos de 18 y 30 meses nacidos en cultivos de laboratorio mostraron un perfil de toxinas idéntico al observado en adultos del medio natural y que coincide con los ya mencionados en estudios anteriores (Bravo *et al.*, 1999), sin embargo el contenido en toxinas fue significativamente muy inferior (figura 1). Además se diferenciaron de las del medio natural en la distribución de las toxinas en las distintas partes del cuerpo de los moluscos (figura 2). Se observa que en términos de μ gr de toxinas/gr de cada parte del molusco, el epitelio tenía más toxina aunque no alcanza los valores tan elevados que mencionan Bravo *et al.*, 1999. En términos de toxina total por individuo las orejas de mar procedentes de cultivo presentaron porcentualmente un contenido de toxinas mucho más elevado en el músculo del pie que en el epitelio y vísceras (figura 2b). Se obtuvieron valores medios del 90% de las toxinas en el músculo, valores muy diferentes al 23% que mencionan aquellos autores para individuos adultos del medio natural.

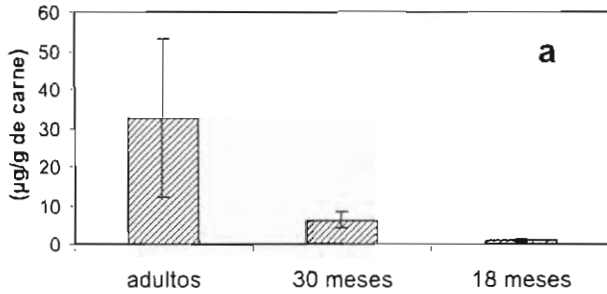


Figura 1. Toxicidad de *Haliotis tuberculta* procedente de cultivos (30 y 18 meses) y adultos del medio natural.

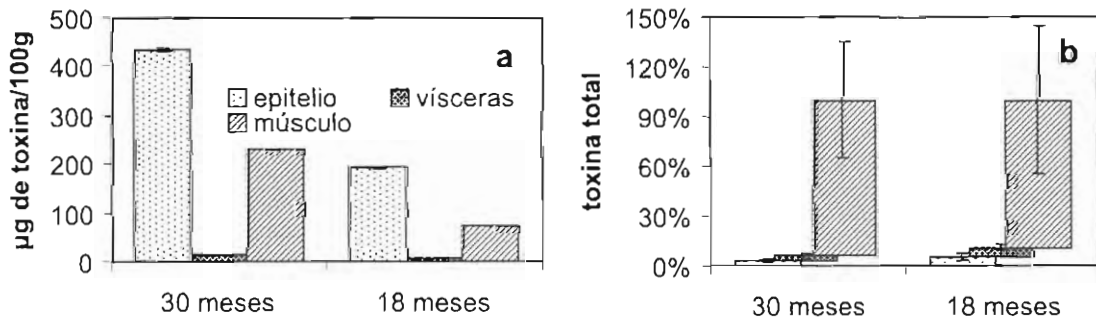


Figura 2. Distribución de la toxicidad por partes del moluscos para individuos nacidos en el laboratorio; a) μ gr de toxina/peso; b) % de toxina total/individuo

Los valores de contenido de toxinas de las orejas de mar de 18 meses de edad son significativamente menores que los observados para las de 30 meses (figura 1), lo cual sugiere una adquisición progresiva de las toxinas con la edad. Sin embargo, ante los resultados que se muestran en la figura 2 no está claro que esta adquisición se realice a través del epitelio como podían sugerir las elevadas concentraciones de toxinas detectadas en el mismo y mencionadas por los autores citados anteriormente.

Dado el papel desconocido pero de cualquier forma sugerente que parece tener la epidermis del pie del *Haliotis tuberculata* en cuanto a su toxicidad se refiere, nuestros estudios se han encaminado al estudio citoimmunohistológico del epitelio.

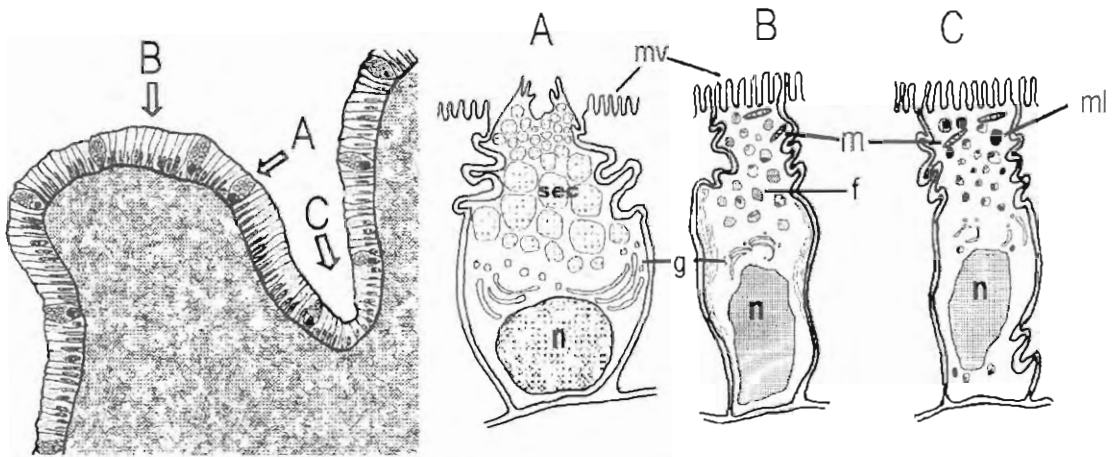


Figura 3. Esquema de un corte longitudinal de la epidermis del pie de *Haliotis tuberculata* y los tres tipos básicos de células epiteliales. A) Célula secretora. B) Célula epidérmica de revestimiento situada en las crestas de los pliegues. C) Célula epidérmica situada en los valles de los pliegues; n, núcleo; sec, gránulos de secreción; mv, microvellosidades; g, Golgi; m, mitocondria; f gránulos fluorescentes; ml gránulos de melanina.

A simple vista la piel del haliotis tiene un característico color verde que se alterna con bandas más oscuras casi negras formando un reticulado superficial. La capa externa de la piel es mucilaginoso lo cual le da un aspecto muy liso y lubricado. Este epitelio en corte longitudinal se observa con abundantes pliegues dispuestos verticalmente, formando lo que hemos denominado crestas para las partes altas y valles para la zona plegada (figura 3). A microscopía óptica se observa como la epidermis está formada por un epitelio prismático simple cuyas células presentan gran cantidad de granos de algún compuesto relacionado con la melanina como hemos demostrado con la técnica de decoloración de la melanina por el agua oxigenada. Granos que se acumulan más densamente en las células de los valles que en las de las crestas. Además la tinción PAS ha revelado que entre las células de revestimiento se encuentran gran cantidad de células secretoras que contienen mucopolisacáridos. A microscopía electrónica estas células presentan núcleo indentado y basal y un complejo de golgi muy desarrollado con gran cantidad de vesículas asociadas (figura 3). Características que recuerdan a las células caliciformes del intestino y tráquea de mamíferos. En las crestas las células epiteliales son las que le dan el color verde al epitelio y fluorescen en rojo/anaranjado al microscopio de epifluorescencia cuando se les ilumina con luz azul (450-490 nm), característica de la clorofila y fluorescen en rojo cuando se les ilumina con luz verde (510-560 nm) característica de las ficobiliproteínas. Las células del fondo de los valles carece de esta autofluorescencia y las

células tienen muchos gránulos de melanina lo que les da un aspecto casi negro.

La microscopía electrónica también nos muestra las células de revestimiento como células que presentan gran cantidad de microvellosidades en cuyo interior hay microfilamentos. Al microscopio electrónico se observa que las células de revestimiento de las crestas presentan vesículas de diversos contenidos en su interior, es decir vesículas desde electrón claras a electrón densas. Algunas de las cuales contienen cisternas apiladas de manera apretada que no recuerdan ni al complejo de golgi ni al retículo endoplasmático pero sí a apilamientos de tilacoides. Este último tipo de vesículas son escasas pero se encuentran únicamente en las crestas, es decir los lugares que emiten autofluorescencia.

Para corroborar la presencia en ese epitelio de pigmentos fotosintéticos como la clorofila y las ficobiliproteínas se realizó el espectro de absorción por espectrofotometría y el espectro de fluorescencia por espectrofluorimetría. El extracto hidrosoluble presentó un máximo de absorción entorno a 650 nm que se corresponde al equivalente para la aloficocianina (Glazer 1994), ficobiliproteína presente en las cianobacterias y rodofíceas. Por espectrofluorimetría se detectó un máximo de emisión de fluorescencia en 660-670 nm (el espectro de excitación con esa emisión máxima fue de 460-487 nm), lo cual se corresponde también con el espectro de fluorescencia para la aloficocianina (Prezelin & Boczar, 1986). Los espectros acetónicos mostraron un espectro con unos máximos que se corresponden a los espectros de la clorofila a y los feopigmentos, a éstos se correspondería el pico encontrado entre 404-408 (409,5 para la feofitina y feoforbidos, la clorofila a tiene un máximo en 430). Estos derivados de la clorofila a cuya estructura se diferencia de la de aquella en la falta del átomo de Mg (para la feofitina) como centro de la estructura tetrapirrólica y también la falta del grupo fitol (para los feoforbidos) son compuestos que se producen por degradación de la clorofila y se encuentran frecuentemente en muestras de sedimentos, en heces de herbívoros, pero también hay referencias de feofitinas en fitoplancton y plantas superiores (Jeffrey *et al.*, 1997).

Hasta ahora no se conoce el origen de esos pigmentos fotosintéticos en el epitelio de las orejas de mar, ni se ha identificado ningún alga conocida que responda a las características celulares que se observan al microscopio electrónico de esos gránulos autofluorescentes. En la actualidad se está trabajando sobre la hipótesis de que esos gránulos sean endosimbiontes y que estén relacionados de alguna forma con el alto contenido en toxinas del epitelio. Además de los correspondientes estudios citológicos del epitelio del *Haliotis tuberculata* se están llevando a cabo diversos estudios de carácter inmuno-histoquímico para determinar la localización de la toxicidad en los distintos tipos de células epiteliales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ana García la ayuda técnica prestada en la preparación de extractos de oreja de mar para análisis de toxinas, así como a Carmen Alvarez en la realización de cortes histológicos. Las muestras para el MET fueron realizadas por Suso Mendez del Centro de Apoyo Científico y Tecnológico a la Investigación de la Universidad de Vigo. Este trabajo ha recibido financiación del proyecto MAR95-1849 (CYTMAR).

BIBLIOGRAFÍA

- Bravo I., E. Cacho, J.M. Franco, A. Miguez, M.I. Reyeró and A. Martínez. 1996. Study of PSP toxicity in *Haliotis tuberculata* from the Galician coast. In: Harmful and toxic algal blooms, (Yasumoto, Oshima y Fukuyo). IOC of UNESCO, pp. 421-424.
- Bravo I., I. Reyeró, E. Cacho and J.M. Franco. PSP in *Haliotis tuberculata* from the galician coast: geographical distribution, toxicity by lengths and parts of mollusc. *Aquatic Toxicology*. 46(2): 79-85. 1999.
- Glazer A. N. 1994. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology* 6: 105-112.
- Jeffrey S.W., R.F.C. Mantoura y T. Björnland. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. En: *Phytoplankton pigments in oceanography*, (Jeffrey, Mantoura y Wright, eds). Unesco, pp.449-559.
- Martínez A., J.M. Franco, I. Bravo, M. Mazoy and E. Cacho. 1993. PSP toxicity in *Haliotis tuberculata* from NW Spain. En: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, (Smayda y Shimizu, eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 419-453.
- Prezelin B.B. & B.A. Boczar. 1986. Molecular bases of cell absorption and fluorescence in phytoplankton: potencial applications to studies in optical oceanography. En: *Progress in Phycological Research*, vol. 4. (Round & Chapman, eds). Biopress Ltd., pp. 350-484.

EFECTO DEL ACIDO OKADAICO SOBRE LA TASA DE CAPTACION Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN CELULAS NHLF (NORMAL HUMAN LUNG FIBROBLASTS)

F. Leira (1); J.M. Vieites (1); M.R. Vieytes (2); L.M. Botana (3)

(1) ANFACO-CECOPECA. Campus Universitario de Vigo. 36310 Vigo

(2) Dpto. de Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria de Lugo. 27002 Lugo

(3) Dpto. de Farmacología. Facultad de Veterinaria de Lugo. 27002. Lugo

INTRODUCCION

Las toxinas DSP pertenecientes al grupo del ácido okadaico y derivados ejercen una potente inhibición sobre un tipo de enzimas muy abundantes en el citosol de las células de mamíferos, las proteínas fosfatasa (fundamentalmente PP1 y PP2A) (Bialojan y Takai, 1988; Haystead *et al.*, 1989), que actúan regulando procesos de fosforilación y defosforilación proteica a nivel celular. Esta fosforilación reversible de proteínas constituye uno de los mecanismos más importantes de regulación de la actividad de las células eucariotas, por lo que su inhibición es susceptible de desencadenar una amplia gama de respuestas biológicas en función del sistema celular considerado, tal y como ha sido constatado por diferentes investigadores. Así, se ha demostrado que la inhibición de las proteínas fosfatasa ejercida por las toxinas del grupo del ácido okadaico y derivados repercute en aspectos tan variados de la función celular como el metabolismo energético (Tanti *et al.*, 1991; 1994), actividad secretora (Waschulewski *et al.*, 1996), organización del citoesqueleto (Fiorentini *et al.*, 1996), ciclo celular (Giese *et al.*, 1995), funcionalidad plaquetaria (ArtÇanuthurry *et al.*, 1996), expresión génica (O'Brien *et al.*, 1994), diferenciación celular (Wei, 1995), transporte de membrana (Lynch *et al.*, 1994) y respuesta inmune (Estévez *et al.*, 1994), entre otras. Estos ejemplos ilustran el amplio espectro de respuestas biológicas asociadas a la acción del ácido okadaico, lo que confiere un elevado interés al estudio de respuestas celulares susceptibles de modelización en sistemas perfectamente caracterizados. La posibilidad de establecer una correlación entre la concentración de ácido okadaico y la intensidad de una respuesta celular medible de forma rápida, sensible y fiable en sistemas *in vitro* ha sido evaluada en este trabajo utilizando un modelo celular normal (fibroblastos de pulmón humano), sobre el que se ha estudiado el efecto del ácido okadaico en la tasa de captación-metabolismo celular de la glucosa, utilizando para ello el derivado fluorescente 2-[N-7-(nitrobez-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucosa (2-NBDG), desarrollado por Yoshioka *et al.* (1996).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Para la realización de los ensayos se utilizaron fibroblastos normales de pulmón humano

(NHLF) suministrados por Biowhittaker Inc. (Walkersville, USA). Tras la recepción de los crioviales en el laboratorio, las células se inocularon en frascos de cultivo celular de 25 cm² de superficie con una densidad de siembra de 2.500 células/cm². Previamente a la adición del inóculo celular, los frascos de cultivo fueron precondicionados (37 °C; 5% CO₂; 30 min) con 5 mL de medio de cultivo de fibroblastos tipo 2, Bulletkit[®] (Biowhittaker Inc., Walkersville, USA). La incubación se realizó a 37°C con un 5% CO₂ hasta obtener un 70-90% de confluencia celular, renovando diariamente el medio de cultivo. Una vez alcanzado el grado óptimo de confluencia, las células fueron transferidas a un tubo estéril tras la disgregación con EDTA/tripsina, ajustando la concentración del cultivo a 12.500 células/mL para su siembra en placa de microtitulación (200 µL/pocillo). Una vez sembradas, las placas se mantuvieron en el incubador (37°C; 5% CO₂) durante 48 h, transcurridas las cuales se añadieron por triplicado diferentes concentraciones (0,1-1.000 nM) de ácido okadaico (Alexis corp., Suiza) diluido en el medio de cultivo celular.

Ensayo de utilización de glucosa

La influencia del ácido okadaico sobre la tasa de utilización de glucosa por los fibroblastos se determinó utilizando el derivado fluorescente 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglucosa (2-NBDG; Molecular Probes, Oregón, USA). La respuesta celular a la incorporación del derivado fluorescente de la glucosa se caracterizó inicialmente añadiendo diferentes concentraciones de 2-NBDG (1-100 µM) al medio de cultivo, realizando la lectura fluorimétrica (lexc:466 nm; lem: 540 nm) tras lavado con solución de Hank's a los 5, 15, 30, 60 y 120 min de la incorporación de la 2-NBDG. Los resultados obtenidos (figura 1) mostraron una rápida captación de la 2-NBDG por los fibroblastos, con un pico máximo de fluorescencia a los 5 min de la adición. Tras su incorporación por las células, se observó una rápida metabolización de la 2-NBDG (reflejada en un rápido descenso de la señal fluorimétrica, proporcional a la concentración de 2-NBDG utilizada), con una estabilización de la respuesta hacia los 30 min posteriores a la adición.

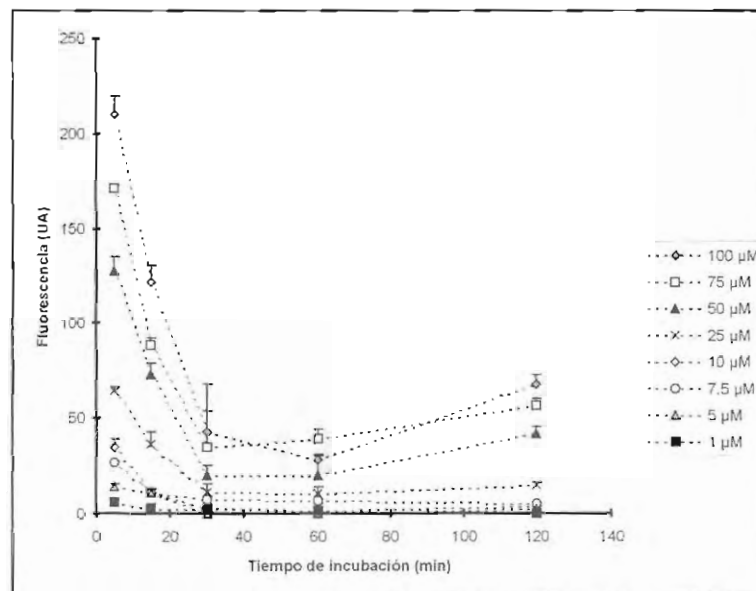


Fig. 1.-Evolución de la respuesta fluorimétrica tras la incorporación de 2-NBDG (1-100 µM) al medio de cultivo de células NHLF (media+SD; n=3; UA: Unidades Arbitrarias)

Una vez comprobadas las características de la respuesta celular a la adición de 2-NBDG, el efecto del ácido okadaico sobre la tasa de utilización de la glucosa por los fibroblastos se determinó repitiendo el mismo ensayo con 2-NBDG 100 μ M y distintas concentraciones de ácido okadaico (0,1-1.000 nM), realizando la lectura a los mismos tiempos de incubación establecidos en el caso del ensayo inicial. Transcurridos los períodos de incubación prefijados, se eliminó el medio de cultivo celular, lavando con solución de Hank 's previamente a la lectura fluorimétrica. La acción del ácido okadaico sobre la tasa de utilización de la glucosa se determinó en función de las diferencias observadas en la señal fluorimétrica frente a controles de células sin adición de okadaico.

Adicionalmente a las referencias obtenidas con la incubación simultánea de ácido okadaico y 2-NBDG en ensayos a corto plazo, se realizaron ensayos paralelos añadiendo el derivado fluorescente de la glucosa tras la incubación de las células con ácido okadaico durante períodos de tiempo más prolongados (1, 4, 12 y 24 horas). Una vez transcurridos los tiempos de incubación establecidos se retiraron 100 μ L del medio de cultivo, añadiendo 100 μ L de 2-NBDG 100 μ M. Tras una incubación adicional de 5 min, se determinó la respuesta fluorimétrica previa eliminación del medio de cultivo y lavado con solución de Hank 's.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo de utilización de 2-NBDG por los fibroblastos muestra una correlación directa con la concentración de ácido okadaico en el medio de cultivo, asociándose a un descenso en la señal fluorimétrica que indica una activación del transporte y metabolismo celular de la glucosa en fibroblastos expuestos a la acción del ácido okadaico. Tal y como se aprecia en la figura 2, las células incubadas con ácido okadaico presentan una respuesta fluorimétrica inferior a la observada en los controles, disminuyendo de forma proporcional conforme se incrementa la concentración de okadaico. La confirmación de que el descenso observado en la respuesta fluorimétrica se corresponde realmente con un incremento en la metabolización de la 2-NBDG

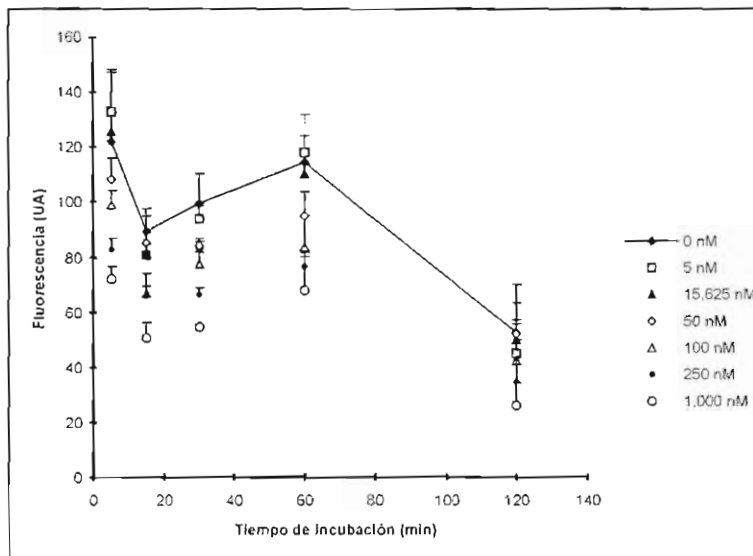


Fig. 2.-Evolución de la respuesta fluorimétrica generada por la presencia de 2-NBDG en fibroblastos de pulmón humano incubados durante 120 min con 2-NBDG (100 μ M) y ácido okadaico (0-1.000 nM) (media +SD; n=3; UA: Unidades Arbitrarias)

se obtuvo repitiendo los ensayos sin eliminación del medio de cultivo ni lavado con solución de Hank's. La lectura directa sobre el medio de cultivo con 2-NBDG muestra igualmente un descenso en la señal fluorimétrica directamente relacionado con la concentración de ácido okadaico en cada pocillo.

El incremento observado en la tasa de utilización de glucosa por los fibroblastos (expresada como descenso porcentual de la respuesta fluorimétrica frente a controles de células sin adición de okadaico) se ajusta en todos los casos a una curva logarítmica (figuras 3 y 4), con un porcentaje máximo de reducción de la respuesta fluorimétrica estabilizado en torno a un 40-50% de la respuesta observada en los controles para una concentración de ácido okadaico de 1.000 nM ($1/2 \gg 100$ nM).

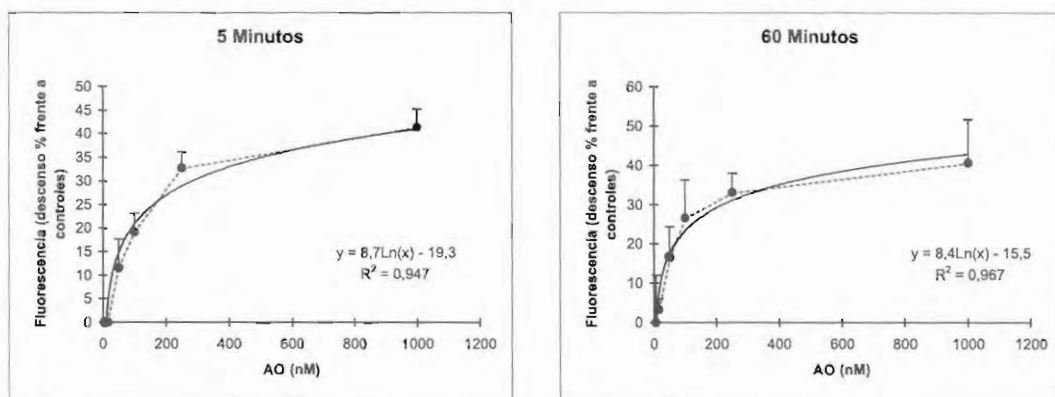


Fig. 3.- Efecto del ácido okadaico sobre la tasa de utilización de glucosa (evaluada como descenso porcentual de la señal fluorimétrica generada por la presencia de 2-NBDG frente a controles sin okadaico) en fibroblastos de pulmón humano (lecturas a los 5 y 30 min; 2-NBDG: $100 \mu\text{M}$) (media \pm SD; $n=3$)

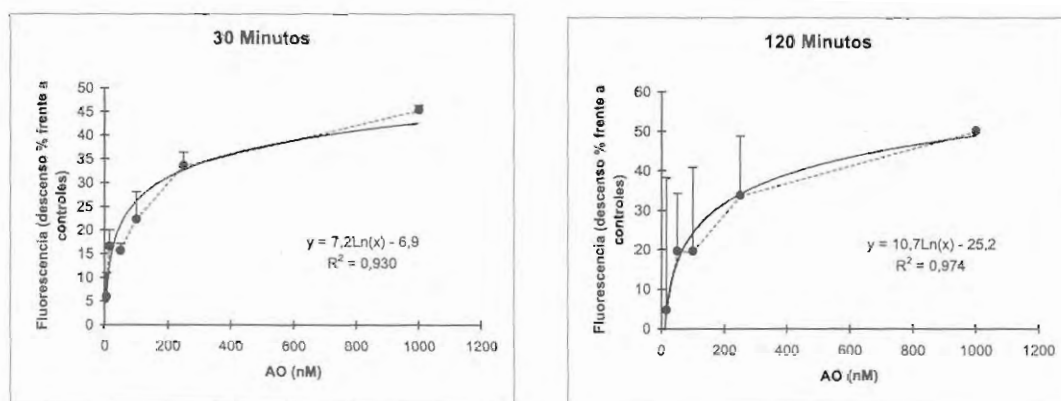


Fig. 4.- Efecto del ácido okadaico sobre la tasa de utilización de glucosa (evaluada como descenso porcentual de la señal fluorimétrica generada por la presencia de 2-NBDG frente a controles sin okadaico) en fibroblastos de pulmón humano (lecturas a los 60 y 120 min; 2-NBDG: $100 \mu\text{M}$) (media \pm SD; $n=3$).

Al igual que sucede en los ensayos a corto plazo, el efecto estimulador del ácido okadaico sobre la tasa de utilización de la 2-NBDG se mantiene en los ensayos realizados con períodos de incubación más prolongados (1@24 horas). Los resultados obtenidos añadiendo la 2-NBDG tras el período de incubación con ácido okadaico muestran también (tras una incubación adicional de 5 minutos) una reducción de la respuesta fluorimétrica directamente relacionada con la concentración de ácido okadaico, tal y como se aprecia en la figura 5. La reducción observada se ajusta (al igual que sucedía en los ensayos a corto plazo con incubación simultánea de 2-NBDG y ácido okadaico) a una curva logarítmica (figura 6). Los porcentajes de reducción obtenidos coinciden con los descritos en el apartado anterior, situándose el máximo en torno a un 40-50% de la respuesta observada en los controles para las mayores concentraciones ensayadas de ácido okadaico (1.000 nM).

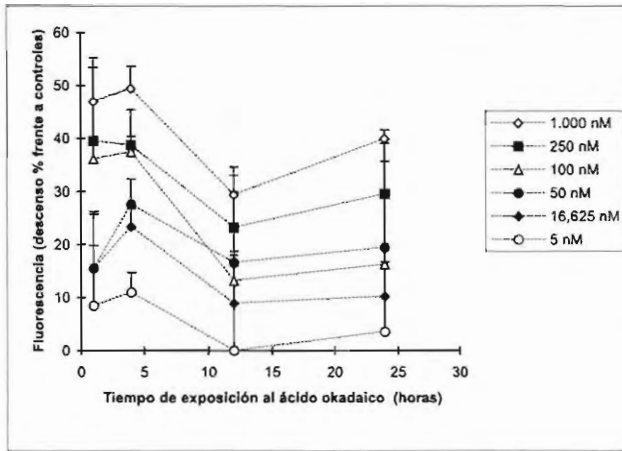


Fig. 5.- Evolución de la tasa relativa de utilización de glucosa (evaluada como descenso porcentual de la señal fluorimétrica generada por la presencia de 2-NBDG frente a controles sin okadaico) en fibroblastos de pulmón humanos (lecturas tras 1, 4, 12 y 24 horas de incubación con okadaico; 5 minutos de incubación adicional tras añadir 2-NBDG 100 μ M) (media + SD; n=3).

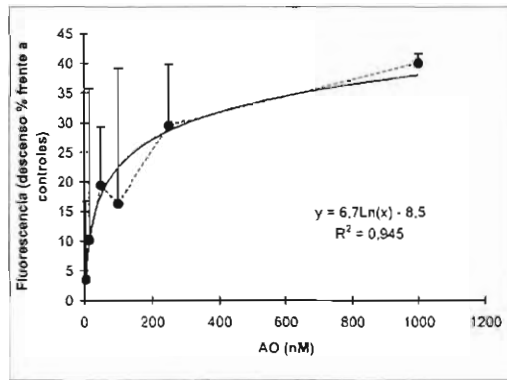


Fig. 6.- Tasa relativa de utilización de glucosa (evaluada como descenso porcentual de la señal fluorimétrica generada por la presencia de 2-NBDG frente a controles sin okadaico) en fibroblastos de pulmón humanos incubados durante 24 horas con ácido okadaico; 5 minutos de incubación adicional tras añadir 2-NBDG (100 μ M) (media + SD; n=3).

La utilización de la 2-NBDG ha permitido confirmar el efecto estimulador del ácido okadaico sobre la tasa de captación y metabolismo celular de la glucosa por los fibroblastos durante todo el período de incubación estudiado (5 min-24 horas), tal y como había sido previamente descrito por otros autores (Tanti *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1993; Shisheva y Shecter, 1994; Venkatesan y Davidson, 1995; Rondinone y Smith, 1996; Zierath *et al.*, 1997). Tanti *et al.* (1991) demostraron el efecto tipo insulina del ácido okadaico en células musculares, en las que produce un aumento significativo en la captación de glucosa, desapareciendo dicho efecto si se tratan previamente las células con insulina. El aumento observado en el transporte y utilización de glucosa (efecto tipo insulina) por los fibroblastos alcanza un valor máximo para una concentración de okadaico de 1000 nM (1/2: \cong 100 nM), lo que coincide con los datos indicados por Robinson *et al.* (1993), que señalan un efecto estimulador del ácido okadaico sobre el transporte de glucosa en hemidiafragmas de rata, correspondiendo la respuesta máxima con una concentración de okadaico de 1000 nM (1/2: \cong 100 nM). En todos los ensayos realizados, el aumento en la tasa de captación y metabolismo celular de la glucosa muestra una correlación significativa con la concentración de ácido okadaico, por lo que la utilización de 2-NBDG en un ensayo de estas características representa una opción de interés dentro de la selección de respuestas celulares susceptibles de generar un protocolo de análisis cuantitativo. La sensibilidad, rapidez y repetibilidad (CV: 11 %) del ensayo descrito, junto con otras ventajas inherentes a los ensayos realizados en placa de microtitulación lo convierten en una alternativa interesante para su aplicación en los estudios *in vitro* del metabolismo celular de la glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Artçanuthurry, V.; Grelac, F.; Mclouf, J.; Martin-Cramer, E.; Levy-Tolédano, S. (1996) Serine/threonine dephosphorylation may be involved in tyrosine phosphorylation: a new mode of signal transduction in platelets. *Semin. Thromb. Hemost.*, 22: 317-26.
- Bialojan, C.; Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.*, 256, 283-90.
- Estévez, M.D.; Vieytes, M.R.; Louzao, M.C.; Botana, L.M. (1994). Effect of okadaic acid on immunologic and non-immunologic histamine release in rat mast cells. *Biochem Pharmacol.*, 47: 591-3.
- Fiorentini, C.; Matarrese, P.; Fattorossi, A.; Donelli, G. (1996). Okadaic acid induces changes in the organization of F-actin in intestinal cells. *Toxicon*, 34: 937-45.
- Giese, G.; Wieggers, W.; Kubbies, M.; Scherbarth, A.; Traub, P. (1995). Okadaic acid co-induces vimentin expression and cell cycle arrest in MPC-11 mouse plasmacytoma cells. *J. Cell Physiol.*, 163: 145-54.
- Haystead, T.A.J.; Sim, A.T.R.; Carling, D.; Honnor, R.C.; Tsukitani, Y.; Cohen, P.; Hardie, D.G. (1989). Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*, 337, 78-81.
- Lynch, C.J.; Mader, A.C.; McCall, K.M.; Ng, Y.C.; Hazen, S.A. (1994). Okadaic acid stimulates ouabain-sensitive $^{86}\text{Rb}(\text{+})$ -uptake and phosphorylation of the Na^+/K^+ -ATPase alpha-subunit in rat hepatocytes. *FEBS Lett.*, 355: 157-62.
- O'Brien, R.M.; Noisín, E.L.; Granner, D.K. (1994). Comparison of the effects of insulin and

- okadaic acid on phosphoenolpyruvate carboxykinase gen expression. *Biochem. J.*, 303: 737-42.
- Robinson, K.A.; Boggs, K.P.; Buse, M.G. (1993). Okadaic acid, insulin and denervation effects on glucose and amino acid transport and glycogen synthesis in muscle. *Am. J. Physiol.*, 265, 36-43.
- Rondinone, C.M.; Smith, U. (1996). Okadaic acid exerts a full insulin-like effect on glucose transport and glucose transporter 4 translocation in human adipocytes. Evidence for a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *J. Biol. Chem.*, 271, 18148-53.
- Shisheva, A.; Shechter, Y. (1994). A dynamic system for suppression and re-expression of insulin and pervanadate bioresponses in rat adipocytes. Treatment with okadaic acid and staurosporine. *Biochem Pharmacol.*, 47:1537-44.
- Tanti, J.F.; Gremeaux, T.; Van Obberghen, E.; Le-Marchand-brustel, Y. (1991). Effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases-1 and 2-A, on glucose transport and metabolism in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 266, 2099-2103.
- Tanti, J.F.; Grémeaux, T.; Van Obberghen, E.; Le-Marchand-Brustel, Y. (1994). Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 269: 6051-7.
- Venkatesan, N.; Davidson, M.B. (1995). Differential regulation of glucose transport and glucose transporter (GLUT-1) gene expression by vanadate, phorbol ester and okadaic acid in L6 skeletal muscle cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37:773-83.
- Waschulewski, I.H.; Kruse, M.L.; Agricola, B.; Kern, H.F.; Schmidt, W.E. (1996). Okadaic acid disrupts Golgi structure and impairs enzyme synthesis and secretion in the rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 270:G939-47.
- Wei, L.; Yung, B.Y. (1995). Effects of okadaic acid and vanadate on TPA-induced monocytic differentiation in human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Lett.*, 90: 199-205.
- Yoshioka, K.; Takahashi, H.; Homma, T.; Saito, M.; Oh, K. B.; Nemoto, Y.; Matsuoka, H. (1996). A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys Acta*, 1289: 5-9.
- Zierath, J.R.; Houseknecht, K.L.; Gnudi, L.; Kahn, B.B. (1997). High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT-4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes*, 46: 215-23.

CONTENIDO DE ÁCIDO OKADAICO DE LAS CÉLULAS DE *Dinophysis* RESPONSABLES DE VARIOS EPISODIOS TÓXICOS EN LAS RÍAS GALLEGAS

J. Blanco¹; Y. Pazos²; F. Arévalo²; C. Salgado²; M. Bermudez de la Puente²; J. Maneiro²; A. Moroño².

(1) Centro de Investigacións Mariñas. Pedras de Corón S/N. Apto. 13. 36620 Vilanova de Arousa. Pontevedra. España.

(2) Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. Peirao de Vilaxoán S/N. Vilagarcía de Arousa. Pontevedra. España.

RESUMEN

Con objeto de determinar la contribución de diversas especies de *Dinophysis* a los episodios de DSP que se producen en las Rías Gallegas, se obtuvieron muestras concentradas de plancton de diversos episodios que tuvieron lugar en la Ría de Pontevedra, se determinaron las abundancias de las especies de *Dinophysis* y se cuantificó por HPLC-FD el contenido en ácido okadaico. Utilizando los datos obtenidos se trató de identificar las especies responsables de los episodios y su contenido en ácido okadaico por célula, utilizando métodos de regresión múltiple. Las únicas especies claramente tóxicas fueron *D. acuminata* y *D. acuta*, con contenidos celulares de ácido okadaico variables. *D. caudata* aparece como poco o nada tóxica y de las restantes especies *D. rotundata*, *D. tripos*, *D. diegensis* y *D. skagi* no pueden extraerse conclusiones sólidas.

INTRODUCCIÓN

Los episodios de tipo diarreico provocados por moluscos (Diarrhetic Shellfish Poisoning) DSP, y especialmente por su toxina mayoritaria, el ácido okadaico, son los que producen mayor número de cierres de comercialización del mejillón cultivado en Galicia, y por tanto las mayores pérdidas económicas. La mitigación de las repercusiones de dichos episodios, incluyendo el incremento de la seguridad de los consumidores, pasa por conseguir una buena predicción de la intensidad de los episodios y por la duración de los mismos, para lo cual resulta indispensable disponer de estima fiables del contenido en toxinas de las células de los organismos que las producen. Dada la imposibilidad de cultivar las especies del género *Dinophysis*, resulta muy difícil obtener estos valores experimentalmente, ya que resulta obligado proceder al aislamiento de las células por medio de micromanipulación en cantidades suficientes para que la toxina que contienen pueda ser detectada y a su posterior análisis. Dado que en la mayor parte de los episodios de DSP que se registran en las Rías Gallegas se encuentran implicadas simultáneamente varias especies del género *Dinophysis*, hemos tratado de estimar los contenidos tóxicos de cada una de ellas por medio de técnicas de regresión múltiple, partiendo de las concentraciones de ácido okadaico en el plancton y de las concentraciones de células de distintas especies. Esta aproximación ya fue empleada por Blanco *et al.* (1995) aunque en aquella ocasión no se incluían concentraciones elevadas de especies como *D. caudata*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante varias proliferaciones de organismos del género *Dinophysis*, en la Ría de Pontevedra, se recolectaron muestras de plancton concentradas con red de 10 μm de malla las cuales posteriormente se filtraron sobre filtros de fibra de vidrio Watman GF/C. El ácido okadaico contenido en los filtros se extrajo mediante sonicación de estos en metanol 80% y centrifugación (10 minutos a 3000 rpm). Las concentraciones de ácido okadaico fueron determinadas por HPLC utilizando el método cromatográfico de Lee *et al.* (1987) con una columna LiChroCart 125-4 (Merck), con fase estacionaria LiChrospher 100, RP 18 de 5 μm , un sistema cromatográfico Waters 600E, inyector automático (Wisp 700, Waters) y detector de fluorescencia (Waters 474). La concentración de células en el concentrado de las diversas especies de *Dinophysis* implicadas se realizó por medio de recuento al microscopio.

Los datos obtenidos fueron procesados utilizando técnicas de regresión múltiple para determinar las especies responsables de la toxicidad y estimar su concentración de ácido okadaico por célula y las posibles dependencias entre las variables independientes fueron analizadas mediante análisis factorial. Para el procesado con ambas técnicas se utilizó el paquete estadístico Minitab 12.

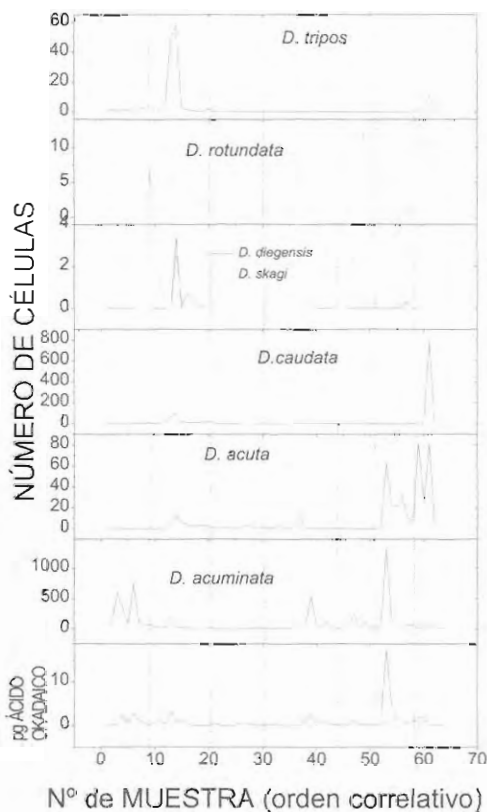


Figura 1.- Concentración de ácido okadaico y de células de las especies de *Dinophysis* en las muestras de plancton empleadas para el estudio. Los distintos episodios considerados se han separado por líneas verticales

RESULTADOS

Considerando conjuntamente todas las muestras obtenidas se obtiene un R^2 de 0.775 y tres especies con contribución significativa: *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata*, con coeficientes (ng de ácido okadaico por célula) de 0.0075, 0.0607 y -0.0059 respectivamente. Dada la carencia de sentido biológico del coeficiente negativo de *D. caudata*, se eliminó esta última especie de la regresión estimándose de esta forma coeficientes de 0.0080 y 0.0607, para las dos primeras especies, con una regresión que explica el 73.4% de la varianza. El análisis de los residuales de esta regresión mostró que, en general, éstos tienen una relación inversa con la concentración de *D. acuminata*, con únicamente dos excepciones, una de las cuales resulta ser el pico más importante de concentración de ácido okadaico y por lo tanto, tiene un peso elevado en la regresión. La eliminación de este lleva a incluir en la regresión dos variables, *D. acuminata* y *D. acuta* con coeficientes más bajos que en la regresión anterior (0.0034 y 0.0194, respectivamente). En el pico anómalo de concentración de toxinas existe más ácido okadaico del esperable por las células de *D. acuminata* y *D. acuta* existentes, en caso de que la concentración de ácido okadaico por

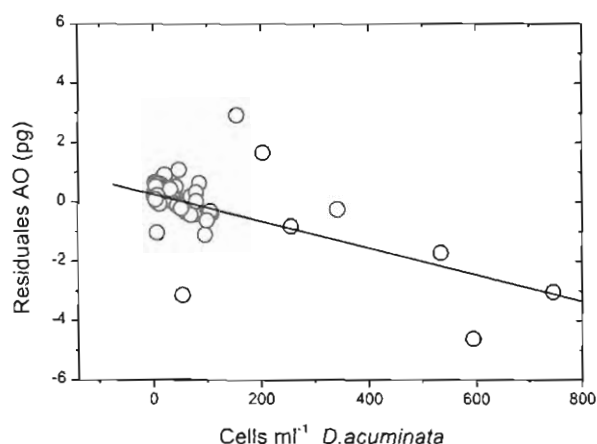


Figura 2.- Distribución de los residuales de la regresión que engloba todos los datos, excluyendo el máximo de ácido okadaico

microscopio. La explicación más probable resulta, por tanto, que existan diferencias de contenido en toxinas entre distintas proliferaciones de la misma especie, por lo cual optamos por dividir el período estudiado en siete subperíodos que coincidían con las distintas proliferaciones de la mayor parte de las especies.

En el primer episodio (subperíodo) la contribución de ninguna de las especies estudiadas resultó significativa. El análisis de los residuales mostró, en este caso, un punto anómalo con muy poco ácido okadaico para la concentración de células presentes. La eliminación de este caso produce que en la regresión se incluya únicamente *D. acuminata* con una concentración de ácido okadaico por célula de 0.0038 ng que, al menos en principio, ha de tomarse con cautela dado que la eliminación del punto anómalo no está plenamente justificada. En el segundo episodio, únicamente resulta significativo el efecto de *D. acuminata*, sí bien con una concentración de AO por célula mucho mayor que el primer episodio y mayor también que en la estimación general ($R^2 = 0.9$). En el episodio 3 se detectan pequeñas concentraciones de OA pero no son atribuibles a ninguna de las especies de *Dinophysis* detectadas. En los episodios 4 y 5, nuevamente *D. acuminata* fue la única especie con efecto significativo en la concentración de AO, con contenidos celulares estimados de 0.0042 y 0.0038 ng de AO, en el ambos casos, muy similar a la estimación del episodio 1. En el episodio 6 tanto *D. acuminata* como *D. rotundata* tuvieron efectos significativos, con coeficientes de 0.0133 y 0.550. La estimación correspondiente al contenido en ácido okadaico de *D. rotundata* es excesivamente alta y aunque resulta significativa aporta muy poco a la explicación de la varianza total. Por tanto se volvieron a analizar los datos una vez excluida *D. rotundata* de la regresión. *D. acuminata* resultó la única especie significativa, explicando un 96% de la varianza y con contenido tóxico de 0.0128 ng de AO/célula, muy similar al obtenido en el episodio 3. En el episodio 7 ninguna especie tuvo una contribución significativa.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados de este estudio, la única especie que puede ser claramente asociada a la presencia de ácido okadaico en el plancton es *Dinophysis acuminata*, si bien, globalmente, *D. acuta* también aparece asociada a este tóxico. *D. caudata*, que alcanzó concentraciones elevadas no pudo ser asociada a la concentración de ácido okadaico y en las

célula sea constante a lo largo de todos los episodios detectados. Ni el análisis de regresión ni la inspección visual de las distribuciones temporales de las especies de *Dinophysis* permiten identificar otros organismos responsables a parte de *D. acuminata* y *D. acuta*, e incluso hacen dudar que *D. acuta* pueda contribuir sustancialmente a esta elevada concentración de toxinas. La posibilidad de que se deba a material particulado, no cuantificable como células, parece también improbable ya que la obtención de la muestra se realizó con red de plancton y por tanto no quedan retenidas partículas pequeñas que pudieran pasar desapercibidas en los recuentos al

ocasiones en la que entró en la regresión lo hizo con coeficiente negativo para lo cual no existe ningún mecanismo razonable. Parece, pues, que la estimación del efecto de esta especie está muy afectado por el error y por tanto resulta esperable que en los episodios muestreados no contenga ácido okadaico o que su concentración sea extremadamente baja. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Blanco *et al.* (1995) para proliferaciones registradas entre 1990 y 1993 en la misma zona. *D. rotundata* únicamente apareció como tóxica en un episodio, a pesar de que estuvo presente en la mayor parte de los episodios estudiados. Una situación similar la detectaron en Blanco *et al.* (1995), encontrando *D. rotundata* asociada a ácido okadaico en algunos episodios, pero no en otros.

La mayor parte de las estimaciones de contenido celular de ácido okadaico obtenidas en este estudio están en el rango de las encontradas previamente en la zona (Blanco *et al.* 1995). Resultan especialmente relevantes varios aspectos de los resultados obtenidos, sobre todo, las diferencias de toxicidad de *D. acuminata* entre episodios, la relación de sus máximos con contenidos tóxicos más bajos de los esperados y la toxicidad por célula de *D. rotundata* obtenida en uno de los episodios estudiados. Los contenidos en ácido okadaico de las *D. acuminata* parecen estar en torno a dos valores 3 pg/cel y 13 pg/cel, sugiriendo que se trata de razas con características de acumulación de ácido okadaico diferentes, aunque, dados los conocimientos actuales sobre el efecto de los nutrientes en el contenido tóxico de *Dinophysis* (Johanson *et al.* 1996) bien podrían también originarse en diferencias de disponibilidad de nutrientes en los distintos episodios. La existencia de menor contenido tóxico en los máximos ya fue detectada en episodios de *D. acuminata* y *D. fortii* en Japón por Sato *et al.* (1996), aunque las bases fisiológicas de estas diferencias se desconocen. La estimación de toxicidad por célula que se obtiene para *D. rotundata* parece irrealmente elevada ya que 0.5 ng supone una proporción considerable de la biomasa celular de dicha especie, y aunque Blanco *et al.* (1995) han estimado toxicidades por célula altas en algún episodio de esta especie (123-124 pg/cel) la presente estimación no parece realista.

Las restantes especies consideradas en el estudio, *D. tripos*, *D. skagi* y *D. diegensis* no parecen tener efecto en los contenidos de ácido okadaico de los filtrados, quizás porque su abundancia durante el estudio ha sido baja, o quizás por que su contenido de AO es bajo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por la acción "Las condiciones oceanográficas y el fitoplancton tóxico en las Rías Gallegas de 1992 al 2001 con especial referencia a las proliferaciones de *Dinophysis acuminata*. Agradecemos la asistencia técnica de S. Roura, F. Arnedo, P. García, I. Lemos y A. López del departamento Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton, la de S. Muñiz del departamento de Biotoxinas, ambos del Centro de Control de Calidade do Medio Mariño así como la de M. C. Mariño del Centro de Investigacións Mariñas.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, P. Hald, B. & Emsholm H. 1996. Toxicity of *Dinophysis acuminata* in Danish coastal waters. En: Yasumoto, T., Oshima, Y & Fukuyo Y. Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO, pp 281-284
- Blanco, J., Fernández, M.L., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E. & Martínez, A. (1995). From *Dinophysis spp* toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. En: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P. & Marcaillou, C., Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier-Intercept, Paris, pp 777-782.

- Johanson, P., Granéli, E., Yasumoto, T., Carlson, P. & Legrand, C. 1996. Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions. En Yasumoto, T, Oshima, Y & Fukuyo Y. Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO, pp 277-280
- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenna, R. & Yasumoto, T. (1987). Fluorimetric detection of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem. 51: 877-881
- Sato, S., Koike, K & Kodama, M. 1996. Seasonal variation of Okadaic acid and Dinophysistoxin-1 in *Dinophysis spp.* In association with the toxicity of scallop. En Yasumoto, T, Oshima, Y & Fukuyo Y. Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO, pp 285-288

BIOENSAYOS DSP: SINTOMATOLOGÍA ATÍPICA EN LOS RATONES. OBSERVACIONES PRELIMINARES

C. Salgado, F. Arévalo, M. Bermúdez de la Puente, Y. Pazos, J. Maneiro y A. Moroño
Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. Peirao de Vilaxoán s/n. 36.611 Villagarcía de Arosa. Pontevedra.
E-mail: cccmm@cccmm.cesga.es

RESUMEN

El Centro de Control da Calidade do Medio Mariño (CCCMM) es el organismo oficial, dependiente del Gobierno Autónomo, encargado del seguimiento y control del fitoplancton tóxico y de las biotoxinas marinas en Galicia. Durante los análisis habituales de control de la biotoxina DSP en moluscos bivalvos se observó una sintomatología atípica en los ratones inyectados, cuyo rasgo más característico consiste en un derrame de líquido entre el cráneo y la piel. En casos severos se observaron muertes entre las 18 y las 48 horas. Los análisis histopatológicos de los animales muertos revelaron una congestión generalizada de todos los órganos siendo especialmente importantes los daños en hígado y bazo. Se descartó la presencia de PSP, AO y derivados, PTX, YTX, ASP, KT-3 y contaminación por metales pesados. El "tóxico" responsable de esta sintomatología es soluble en acetona, en éter y en MeOH 80%. El resultado más relevante obtenido hasta la fecha es que este tipo de sintomatología puede evitarse si, tras la inyección, los ratones se mantienen en oscuridad, lo cual sugiere la posibilidad de que algún agente en presencia de la luz pueda ocasionar fotosensibilización en los animales de experimentación.

INTRODUCCIÓN

El Departamento de Biotoxinas del CCCMM lleva a cabo el programa de seguimiento y control de las toxinas de origen fitoplanctónico en los organismos marinos. Para el desarrollo de este objetivo se realiza la determinación y cuantificación de las biotoxinas de tipo PSP, DSP y ASP en un amplio rango de moluscos destinados al consumo humano asegurando, de esta forma, la calidad sanitaria de los mismos. Este departamento trabaja en estrecha relación con el Departamento de Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton del CCCMM que se ocupa del seguimiento y control de las poblaciones fitoplanctónicas y de las variables físico-químicas y biológicas en las aguas costeras de Galicia. En el Departamento de Condiciones Oceanográficas y Fitoplancton se realizan recuentos de la comunidad fitoplanctónica completa presente en las muestras, fijadas con lugol, mediante microscopía invertida en cámaras de sedimentación de Uthermohl.

En este trabajo se describe una sintomatología atípica observada al realizar el control de las biotoxinas DSP aplicando el método del biensayo en ratón descrito por Yasumoto ⁽¹⁾ al análisis de mejillones cultivados en batea.

DESCRIPCIÓN DE LOS SÍNTOMAS

Transcurridas aproximadamente 14 horas después de ser inyectados los ratones, éstos presentan una gran actividad (se rascan y se frotan la cabeza como si algo les picase o molestase). Más tarde, hacia las 14-24 horas muestran un derrame de líquido entre el cráneo y la piel, tienen tendencia a permanecer en las partes altas de la jaula en donde la intensidad de la luz es menor, presentan un aspecto febril y, un gran porcentaje de ellos manifiestan una disminución notable de su capacidad de visión. El pelo pierde brillo y se cae fácilmente cuando se cogen los ratones con las pinzas. En un estadio final, los ratones muestran un aspecto

SÍNTOMAS	
≅ 14 horas	Gran actividad
14-24 horas	Derrame en la cabeza Preferencia por las zonas de menor intensidad de luz Aspecto febril Pérdida de visión El pelo pierde brillo y se cae fácilmente Los ratones permanecen postrados y presentan un aspecto
redondeado	
24-48 horas	Necrosis de orejas
18-36 horas	Muerte en casos severos

Tabla 1. Descripción de los síntomas.

redondeado, permanecen postrados y se observa necrosis de las orejas.

El análisis histopatológico de los animales muertos revela una congestión generalizada en todos los órganos, degeneración vacuolar en el hígado y necrosis aislada de hepatocitos. En el bazo se observa metaplasia meloide y se confirma el edema subcutáneo en la piel de la cabeza.

PRESENCIA DE OTRAS SUSTANCIAS TÓXICAS

La presencia de toxicidad de tipo PSP se descartó por el resultado negativo en el bioensayo de PSP realizado a las muestras y la ausencia, en el agua, de especies fitoplanctónicas productoras de esta toxicidad.

La ausencia de biotoxinas ASP se descartó, además de por la sintomatología de los ratones, totalmente diferente a la sintomatología típica de la intoxicación por biotoxina amnésica, por el resultado negativo obtenido en el análisis de ácido domoico por CLAE.

Por CLAE se observó ausencia o trazas de AQ, que en ningún caso explicarían los síntomas observados. La presencia de azaspiroácido se descartó al no coincidir la sintomatología descrita para este tipo de toxina (2) con la realmente observada.

La presencia de contaminación asociada a metales pesados se descartó igualmente por análisis de las muestras frente a este tipo de contaminantes.

Se emplearon diversas técnicas de bioensayo en ratón para toxinas DSP, Yasumoto et al en 19781, Yasumoto et al en 19843 y el protocolo descrito por Míguez (4) en la III Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas, obteniéndose el mismo resultado en todos los casos, lo que permite afirmar que el "tóxico" responsable de esta sintomatología es soluble en acetona (Yasumoto 1978), en éter (Yasumoto 1984) y en MeOH 80% (Protocolo Ibérico de extracción de toxinas DSP).

BÚSQUEDA DE ORGANISMOS RESPONSABLES

Se realizaron diversos estudios para tratar de relacionar los momentos de aparición de esta sintomatología en los ratones con la presencia de alguna especie fitoplanctónica en el medio marino.

En un primer estudio se comparó la evolución temporal de la sintomatología con la evolución temporal de las poblaciones de 96 especies diferentes de fitoplancton que se habían cuantificado en las muestras (nº cél/L), no encontrándose ninguna relación clara. A continuación se agruparon las especies en diatomeas y dinoflagelados y se observó una tendencia a la aparición en momentos de abundancia de dinoflagelados.

En un segundo estudio se realizaron una serie de experimentos para tratar de concentrar agua de mar procedente de las zonas de producción en momentos en los que se presentaba la sintomatología y tratar de reproducir dicha sintomatología en el laboratorio realizando bioensayos a partir de los filtros que contenían las células. Inicialmente se realizó un arrastre en la Ría de Vigo con una manga de plancton de 10 µm de luz, recogiendo el equivalente a 1.800 L de agua de mar. El extracto obtenido de los filtros GFD (2.7 m) se inyectó a los ratones, no apreciándose síntomas en las 48 horas posteriores a la inyección. Una alícuota de esta muestra se observó por microscopía; la comunidad estaba dominada por especies de diatomeas cosmopolitas (*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros spp.*, etc.). El análisis del contenido estomacal de mejillones de la misma muestra que los que presentaban la sintomatología, reveló la presencia de *Protoperidinium diabolium*, *Scropsiella trochoidea* y polen de pino, especies,

1^{er} experimento:	Relación sintomatología – presencia en el agua de 96 especies diferentes de fitoplancton
2^o experimento:	Arrastres de red (≈ 1.800 L):
	Filtro GFD ^{bioensayo} Sin síntomas a las 48 h
	Bioensayo Cangas-G: Síntomas y muertes
	Contenido estomacal Cangas-G: <i>P. diabolium</i>
	<i>S. trochoidea</i>
	Polen de pino
3^{er} experimento:	Arrastres de red (≈ 13.000 L):
	Filtro GFD ^{bioensayo} Muerte en menos de 3 minutos
	Bioensayo Ribeira-B: Síntomas y muertes

Tabla 2. Experimentos realizados con agua de mar.

todas ellas, de cubierta resistente. Teniendo en cuenta la elevada tasa de filtración del mejillón⁽⁵⁾ y el número de individuos necesarios para realizar un bioensayo se contempló la posibilidad de que el volumen de agua filtrada (1.800 L) fuese insuficiente; por ello, en un segundo intento se realizó un arrastre en la Ría de Arosa con manga de plancton recogiendo el equivalente a 13.000 L de agua de mar; el resultado obtenido al realizar el bioensayo con el extracto de los filtros GFD fue de muerte de los 3 ratones inyectados en un tiempo inferior a los 3 minutos, lo cual nos lleva a asociar la muerte de los ratones a una cantidad elevada de sales.

BIOENSAYOS: EXPOSICIÓN DE LOS RATONES A LA LUZ Y A LA OSCURIDAD

Los resultados más relevantes de este trabajo (Fig. 1) se obtuvieron cuando a partir de extractos de mejillón positivos para este tipo de sintomatología se realizaron bioensayos por duplicado; de esta manera, un grupo de ratones inyectados se tuvieron en observación manteniéndolos a la luz (tubos fluorescentes de iluminación artificial del laboratorio), mientras que otro grupo de ratones inyectados se tuvieron en observación manteniéndolos en oscuridad.

Los resultados obtenidos revelan que en los ratones del 1^{er} grupo (los mantenidos a la luz) se observan muertes entre las 20-24 horas, mientras que en el grupo de ratones mantenidos en oscuridad, no se aprecian síntomas en 60 horas de observación.

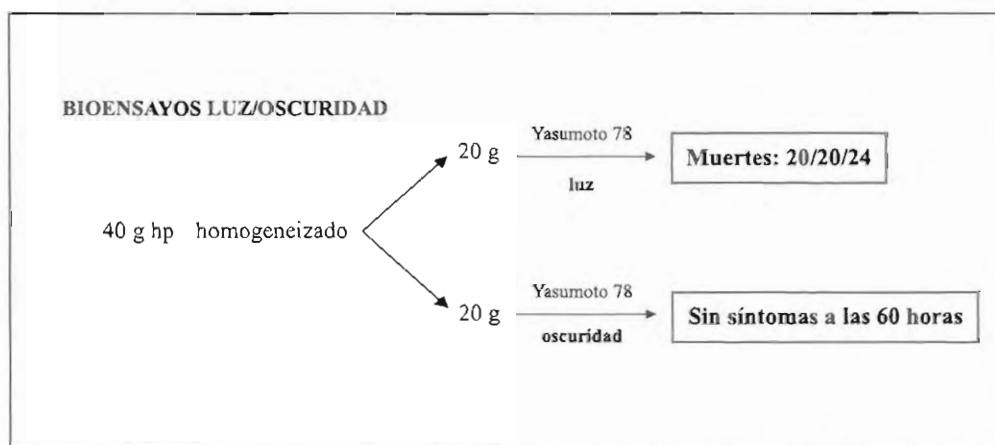


Figura 1. Esquema de los bioensayos realizados: observación luz/oscuridad.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El organismo responsable de la aparición de este tipo de sintomatología podría ser tanto una diatomea como un dinoflagelado o incluso organismos del nano-, pico- o bacterioplancton. Es importante destacar que a la hora de relacionar los momentos de aparición de estos fenómenos con la presencia de alguna especie fitoplanctónica en las muestras de agua, se parte con la desventaja de que las muestras de las estaciones oceanográficas no coinciden exactamente con las muestras recogidas para el análisis de biotoxinas, ni en el espacio ni en el tiempo. Podría ocurrir que, existiendo un organismo responsable, produjese su efecto a pesar de estar en bajas concentraciones, por lo que el método de relacionar sintomatología con el número de células de especies fitoplanctónicas en las muestras oceanográficas no sería válido para identificar el organismo responsable.

Al intentar reproducir en el laboratorio la sintomatología observada en los ratones a partir de la extracción de los filtros resultantes de la concentración de agua de mar con mangas de fitoplancton se obtuvieron unos resultados que nos permiten plantear la posibilidad de que, teniendo en cuenta el retraso de tiempo en la identificación de la sintomatología (14 horas) y la elevada tasa de renovación del agua en las Rías, ⁽⁶⁾ el agua que se estaba tomando para este estudio no correspondiera realmente con la que habían filtrado los mejillones que producían la sintomatología. Quedan abiertas diversas líneas de actuación: por un lado, la posibilidad de repetir este experimento realizando arrastres de red de modo que la cantidad de agua filtrada a través de la red sea intermedia entre 1.800 L y 13.000 L, tratando de reducir el tiempo entre la detección de la sintomatología y la toma de muestras de fitoplancton; por otro lado, se plantea la posibilidad de que la causa de este tipo de sintomatología no quede retenida en los filtros GFD que posteriormente se extraen sino que esté disuelta en el agua de mar y que, independientemente de la cantidad de agua filtrada, en el análisis por bioensayo del extracto de los filtros nunca se observará el tipo de sintomatología que nos ocupa, por lo que trataremos de utilizar sistemas de concentración basados en centrifugación. Finalmente un tercer planteamiento sería el posible origen del compuesto causante de esta sintomatología en el propio metabolismo del mejillón.

Los resultados obtenidos al realizar los bioensayos y mantener los ratones en observación a la luz o en oscuridad se pueden explicar por la posible presencia de compuestos fotosensibles que provocan una serie de síntomas relacionados con la exposición a la luz. En la bibliografía hay descritos casos de dermatitis en personas asociados al consumo de orejas de mar,^{(7),(8)} e incluso se llegó a aislar el compuesto causante que resultó ser el pirofeofóbido a₉ un compuesto resultante de la degradación de la clorofila.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44, 1249-1255. 1978.
2. Ito E., Terao K., McMahon T., Silke J., Yasumoto T. En: "Harmful Algae" B. Reguera, J. Blanco, M^a L. Fernández y T. Wyatt (Eds.) Xunta de Galicia y Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO 1998.
3. Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto K., Clardy J. En: Seafood toxins, Ragelis E. P., Ed. ACS 207-214. 1984.
4. Míguez de Francisco A. En: "Tercera Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas" J. Mariño y J. Maneiro (Eds.) Xunta de Galicia. Consellería de Pesca, Marisqueo y Acuicultura 1993.
5. Navarro E., Iglesias J. I. P., Pérez-Camacho A. y Labarta U. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 198, 175-189. 1996.
6. Rosón G., Álvarez-Salgado X. A., Pérez F. F. Estuar. Coast. Shelf. Sci 44, 249-262. 1997.
7. Hashimoto Y., Naito K., Tsutsumi J. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 26, 1216-1221. 1960.
8. Hashimoto Y., Tsutsumi J. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 27, 859-866. 1961.
9. Tsutsumi J., Hashimoto Y. Agric. Biol. Chem. 28, 467-470. 1964.

ENSAYOS DE DESINTOXICACIÓN DE ASP EN VIEIRAS (*Pecten spp.*)

Fernández, L.¹; Marco, J.¹; Moreno, O.²; Santamaría, M.²

1 D.a.p. Laboratorio de El Rompido. Crta. Punta Umbria - Cartaya s/n, 21.459 Cartaya, Huelva.

E-mail: rompido@dap.es

2 C.I.C.E.M. "Agua del Pino", Dpto. de Producción. Delegación Provincial de Agricultura y Pesca.

Apdo. 104. 21.071 Huelva.

INTRODUCCIÓN

Justificación

En el año 1.997, el C.I.C.E.M. "Agua del Pino" en colaboración con la empresa D.a.p. (Desarrollo Agrario y Pesquero para Andalucía), presenta un proyecto de "Ensayos de Desintoxicación de Moluscos Bivalvos", cuyo objetivo principal es el intento de encontrar un tratamiento sencillo y adecuado para la eliminación de la biotoxina paralizante acumulada habitualmente en corruco y vieira procedentes de los bancos naturales de la región mediterránea.

Debido a la desintoxicación natural en la vieira de la toxina paralizante en este periodo, y ante la imposibilidad de hacer un estudio de dicha toxina en este molusco, se plantea realizar la experiencia de desintoxicación en medio controlado para esta misma especie, en relación con la toxina amnésica, debido a los altos niveles que de esta toxina presenta la vieira en ese mismo periodo.

Antecedentes

En febrero de 1.997 coincidiendo con una floración de *Pseudo-nitzschia spp.*, se comienza a observar una sintomatología indicativa de la presencia de toxicidad ASP en los ratones inyectados para el control de PSP, tanto en concha fina como en vieiras. Se guarda muestra congelada hasta que en el último trimestre la técnica para el análisis de la toxina amnésica estuvo a punto. Analizadas las muestras, se obtienen valores de hasta 113 y 85 μg de ácido domoico/g de tejido en las conchas finas (*Callista chione*) de las zonas más orientales de la provincia de Málaga.

Posteriormente y coincidiendo con una espectacular floración de *Pseudo-nitzschia spp.*, es cuando en el mes de junio de 1.998 se observa un segundo episodio que afecta a toda la provincia de Málaga. Aparecen niveles significativos de ácido domoico en especies "testigo" como la *Callista chione*, de 13 y 22 μg de ácido domoico/g de tejido el día 16 de junio, esta última a los cuatro días vuelve a analizarse habiendo bajado su concentración a 11 μg de ácido domoico/g de tejido, presentando así una rápida desintoxicación en esta especie.

Con relación a la segunda especie muestreada, la vieira (*Pecten* spp.), los valores obtenidos en los análisis hasta el mes de junio son de entre 3 y 35 μg de ácido domoico/g de tejido, sobrepasándose los límites establecidos para su comercialización en ocasiones puntuales. Pero, es a partir de la floración de *Pseudo-nitzschia* spp. cuando la vieira comienza a dar cifras astronómicas, llegando a concentraciones dieciséis veces superiores al límite legal establecido, esto es, de 322 μg de ácido domoico/g de tejido en la zona de Los Boliches, el día 14 de julio. A partir de aquí los valores han fluctuado durante el resto de los muestreos realizados, pero siempre manteniéndose por encima del límite legalmente establecido (20 μg de ácido domoico/g de tejido). Podemos observar como esta especie presenta un comportamiento peculiar respecto a la acumulación de toxina amnésica, que se corresponde con una asimilación inmediata de la toxina y una desintoxicación en condiciones naturales muy lenta. (Figuras 1 a 3).

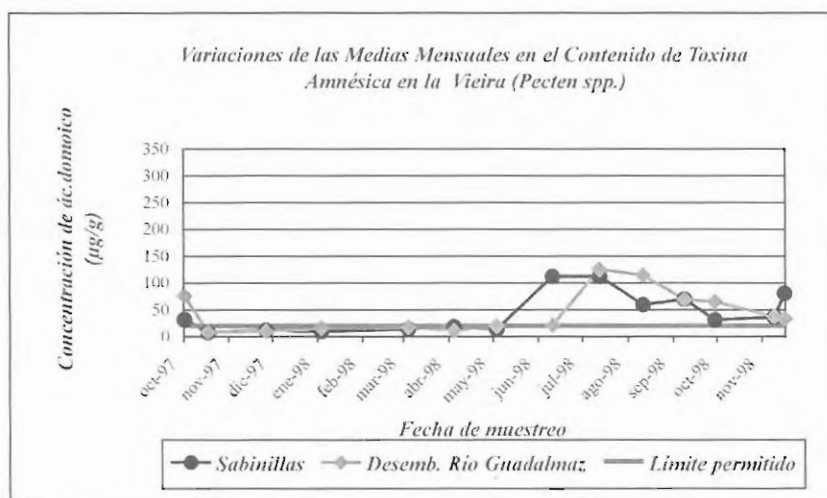


Figura 1.

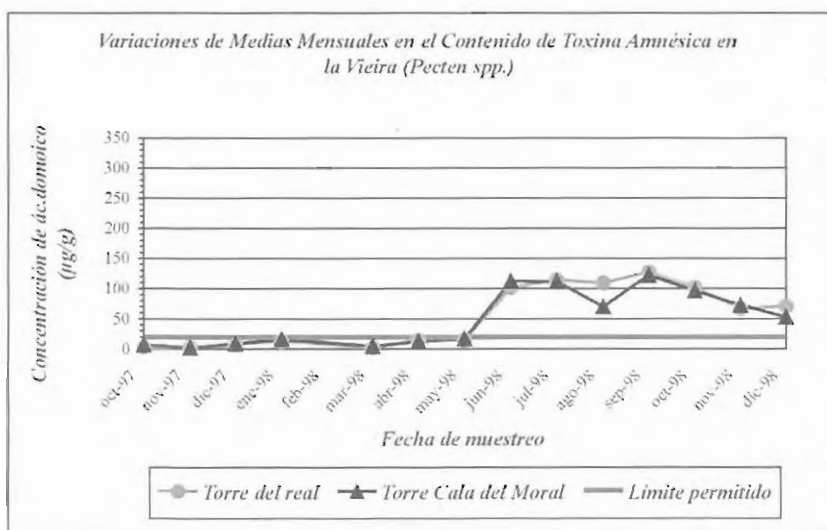


Figura 2.

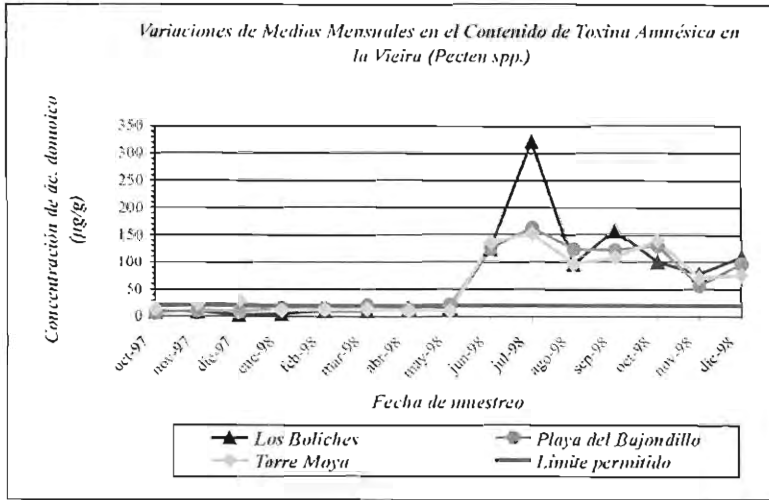


Figura3.

En el mes de diciembre de ese mismo año, comienzan a detectarse pequeñas concentraciones de ácido domoico en la Playa del Bajondillo, con 9 µg de ácido domoico/g de tejido en muestra de concha fina del día 15 de diciembre. En Almería es en los muestreos del día catorce de diciembre en Torre Perdigal y Cabo de Gata cuando se detectan niveles, aunque reducidos, de ácido domoico coincidiendo con un incremento de *Pseudo-nitzschia spp.* en dichas zonas. Por otro lado, las concentraciones de domoico en vieiras comienzan de nuevo a subir.

Estos resultados nos confirman que la vieira es una especie muy sensible a las variaciones en las concentraciones de fitoplancton potencialmente tóxico, asimilando rápidamente la toxina con una tasa natural de desintoxicación muy lenta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Principio

La preparación de las muestras para la detección del ácido domoico se realizó según el método descrito por Lawrence *et al.* (1.991) y Quilliam *et al.* (1.995).

Según Lawrence la extracción se realiza a partir de un homogeneizado de 100 g. de vianda al que se le añaden 100 ml. 0,1 N de HCl y se agita vigorosamente. Rápidamente la muestra es calentada y llevada a ebullición durante 10 minutos, una vez enfriada y centrifugada (5 minutos a 3.000 r.p.m.), la alícuota sobrenadante es filtrada (prefiltros y filtros de jeringa de microfibras de vidrio de 2,5 cm. de diámetro y 0,45 µm de diámetro de poro), y analizada mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Para la extracción de Quilliam se utilizan 20 g de un homogeneizado de tejido de molusco en 80 ml de metanol/agua (1:1 v/v), una vez bien agitado y centrifugado (3 minutos a 3.000 r. p. m.), la alícuota sobrenadante sigue los mismos pasos que la técnica de Lawrence.

La detección se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en las siguientes condiciones cromatográficas: Cartucho Nova-Pak C18 (3.9 x 150 mm), tamaño poro 60Å, tamaño partícula 4 µm; módulo integrado Sentry para cartuchos de acero y Nova-Pak C18 (Waters). La columna está termostata a 40 °C evitando así los cambios bruscos de temperatura, con lo cual los tiempos de retención saldrán más homogéneos; fase móvil: acetonitrilo:agua (1:9 v/v) con 0,1 % de trifluoroacético (TFA), a un flujo de 1 ml/min., pudiendo ser eluido el ácido domoico entre 5 y 10 minutos, con un volumen de inyección de 10 µl.; detector fotodiodo array. La calibración se realizó con material certificado de ácido domoico DACS-1B disuelto en acetonitrilo: agua (1:9 v/v) a una concentración de 99,5 µg de ácido domoico/ml., verificándose la existencia de triptófano con patrón suministrado por Sigma.

Tanto el método descrito para Lawrence, como para el descrito en Quilliam permiten la determinación del ácido domoico con fines del control sanitario. Desde el punto de vista cromatográfico no presentan diferencias relevantes. El método de Lawrence presenta la ventaja de una extracción común con la de las toxinas PSP, hecho que favorece y facilita su aplicación en rutina, siempre que en la cuantificación final se tenga en cuenta la recuperabilidad del método. El método de Quilliam, presenta una recuperabilidad mas alta a expensas de un procedimiento de extracción específico para el ácido domoico, pero nada complicado.

Los métodos utilizados en las condiciones descritas, proporcionaron unas condiciones óptimas de separación del ácido domoico.

Condiciones de aclimatación y Secuencia de muestreo

DESINTOXICACIÓN 1.-

Fecha inicio: 27/08/98

Fecha finalización: 01/10/98

Condiciones de estabulación:

Temperatura: 20.46 (± 1.24)

Salinidad: 37.66 (± 0.91)

Alimentación: Mezcla de *Skeletonema costatum*, con aportes adicionales de *Isochrysis galbana T-Iso*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*. La densidad media fue de 106 células/ml.

Sistema de mantenimiento: Cestillos en tanques de 5.000 l.

Flujo: 5 l/min.

Limpieza: Diaria.

Nº de muestras analizadas: 15

Secuencia de muestreo: 1^{er} análisis 5 réplicas y semanalmente 2 réplicas

Nº de días de la experiencia: 34 días

DESINTOXICACIÓN 2.-

Fecha inicio: 28/10/98

Fecha finalización: 17/12/98

Condiciones de aclimatación:

Temperatura: 20.46 °C (\pm 1.24)

Salinidad: 37.66 °C (\pm 0.91)

Alimentación: Mezcla de *Skeletonema costatum*, con aportes adicionales de *Isochrysis galbana T-Iso*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*. La densidad media fue de 106 células/ml.

Sistema de mantenimiento: Dos tanque de 5.000 l. con cestillos y uno con substrato arenoso, finalmente se optó por este último. Operaciones de limpieza diaria, con 2 renovaciones diarias de agua.

Nº de muestras analizadas: 31

Secuencia de muestreo: 1^{er} análisis 5 réplicas, 2º análisis 5 réplicas y semanalmente 3 réplicas

Nº de días de la experiencia: 51 días

RESULTADOS

DESINTOXICACIÓN 1.-

En un primer momento se analizan cinco réplicas de un mismo lote, el día posterior a su llegada al Centro, mantenidas en refrigeración durante la noche. El resto del lote se instala en los tanques del Centro preparados para la experiencia, siendo ubicadas en cestillos. Posteriormente, y de manera semanal se analizan dos réplicas de ese mismo lote hasta el final de la experiencia, que vendrá determinada por la mortalidad de los ejemplares del lote mantenido bajo condiciones controladas de salinidad, temperatura y alimento exento de fitoplancton potencialmente tóxico.

Las concentraciones de ácido domoico, detectadas en las vieiras analizadas oscilaron entre 67 y 146 μ g de carne/g de tejido Lawrence y entre 80 y 167 μ g de carne/g de tejido según Quilliam, siempre por encima del límite legal permitido, observándose una variabilidad significativa entre los dos métodos, siendo la técnica de Quilliam la que presenta valores más altos.

La variabilidad temporal sigue las mismas pautas en ambos métodos, siendo paralelos los resultados obtenidos para un mismo lote según las dos técnicas de análisis. El ensayo no pudo prolongarse por más tiempo al agotarse el lote inicial. (Figura 4)

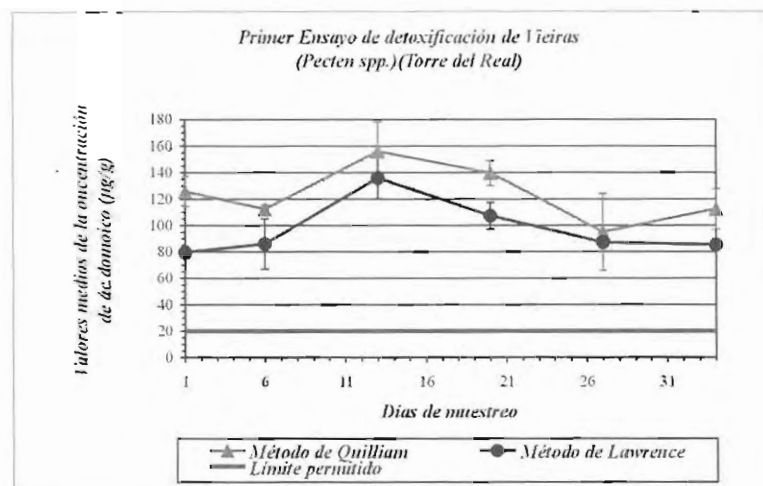


Figura 4.

En los resultados no se aprecia un notable descenso de los valores obtenidos después de 34 días de control en condiciones controladas. La pequeña tendencia a la baja que puede presentar la experiencia da pie a un segundo ensayo.

DESINTOXICACIÓN 2.-

Este hecho detectado en la primera experiencia, plantea un nuevo ensayo de desintoxicación, en el cual y debido a los múltiples problemas técnicos planteados por la cromatografía, obliga a tomar en cuenta únicamente los resultados obtenidos según Quilliam.

En un primer momento se analizan cinco réplicas el día posterior a su llegada al Centro, mantenidas en refrigeración desde su llegada el día anterior. Transcurrido un período de aclimatación de dos días se analizan otras cinco réplicas y semanalmente se realizan tres réplicas hasta el final de la experiencia que, vendrá determinado por la mortalidad de los ejemplares del lote.

Las concentraciones de ácido domoico detectadas en las vieiras analizadas oscilaron entre 52 y 101 μg de carne/g de tejido según Quilliam. Pudiendo observar una tendencia a la baja, aunque siempre valores mantenidos por encima del límite permitido.

No se observa diferencia significativa entre las distintas réplicas analizadas en cuanto a talla.

Los resultados podrían ajustarse a una recta de regresión de tipo lineal, en la que para alcanzar los niveles de comercialización, se deberían mantener los ejemplares bajo condiciones controladas durante un intervalo de tiempo aproximado de 4 meses. Se puede así concluir que no es económicamente viable la desintoxicación de los ejemplares sometiéndolos a un período de depuración en un medio exento de biotoxinas. (Figura 5).

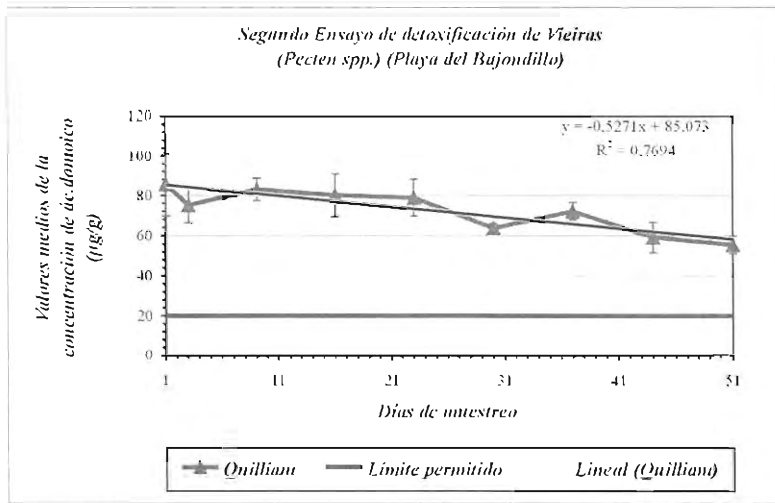


Figura 5.

BIBLIOGRAFÍA

- Quilliam, M.A., M. Xie, W. R. Hardstaff, 1995. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. In: "Journal of AOAC International", 78 (2): 543-554.
- AOAC, 1995. AOAC Official Method 959.08 paralytic shellfish poison. In: "Fish and other marine products". Cap. 35.1.37 : 21.
- AOAC, 1995. AOAC Official Method 991.26 domoic acid in mussels. In: "Fish and other marine products". Cap. 35.1.22 : 9.
- Wright, J. L. C. Y M. A. Quilliam, 1995. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. In: " Manual on harmful marine microalgae, UNESCO 1995": 113-133.

AGRADECIMIENTOS

A todos los que me han sabido soportar durante todo este tiempo y en particular a Aurea Míguez de Francisco que con mucha paciencia me introdujo en el estudio de esta toxina.

ESTUDIO COMPARATIVO DE PROTOCOLOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO

Marco, J. 1; Fernández, L 1; Márquez, I. 2; Aguilar, M. 1

1 Laboratorio de El Rompido, D.a.p. (Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía). Crta. Punta Umbría - Cartaya s/n, 21.459 Cartaya (Huelva). E-mail: rompido@dap.es

2 Dirección General de Pesca y Agricultura. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. C/ Juan de Lara Nieto s/n, 41.071 Sevilla. E-mail: sorpes@capa.junta-andalucia.es

INTRODUCCIÓN

El ácido domoico es la toxina responsable de intoxicaciones de tipo amnésico. Fue la causa de intoxicaciones neurológicas por ingestión de mejillón en Canadá (1987). Los síntomas que se presentan tras las intoxicaciones son: calambres abdominales, vómitos en las primeras horas, y respuestas neurológicas con pérdida de memoria y desorientación, pudiendo llegar a ser irreversibles.

El método oficial de la AOAC (1995) para análisis de ácido domoico es específico para mejillón. Éste sigue el protocolo de Lawrence et al. (1989, 1991), basado en una extracción ácida de la toxina.

En la bibliografía disponible este método conlleva ciertos problemas (Manual on harmful marine microalgae UNESCO 1995):

- Parcial descomposición del ácido domoico durante la extracción.
- Dificultad en el homogeneizado.
- Mucho tiempo en la preparación de la muestra.
- Imposibilidad de almacenar el extracto debido a la rápida descomposición del ácido domoico en medio ácido.
- Imposibilidad de realizar "cleanup" para evitar interferencias con otras sustancias.

La ventaja del método es que la misma extracción sirve para cuantificar P.S.P. y A.S.P. Existe otro protocolo desarrollado por Quilliam (1995), donde se realiza una extracción en frío (con metanol al 50%) y posterior "cleanup", elimina los principales problemas del anterior método.

Dada la gran heterogeneidad de nuestros primeros resultados en la medición del ácido domoico, nace un estudio comparativo de estos dos métodos: oficial AOAC con alguna modificación y Quilliam (1995).

El objetivo principal es conocer el patrón de degradación del ácido domoico en extracto ácido para las diferentes especies del litoral andaluz, así como su recuperabilidad.

METODOLOGÍA

Los protocolos utilizados son los siguientes:

- Oficial AOAC 1991 o Lawrence et al. 1989, 1991. Realizando pequeñas modificaciones al no diluir las muestras tal y como indica el protocolo, sino que realizamos la extracción clorhídrica de la AOAC para la P.S.P. y la detección se realiza según la AOAC para la A.S.P.
- Quilliam 1995, modificando los siguientes pasos:
 - Extracción de la toxina con 20 gramos de tejido (para minimizar los posibles problemas de homogeneización) y con 80 ml metanol/agua (1:1).
 - Análisis directo de extracción con metanol sin "cleanup", quedando comprobada la separación del ácido domoico del posible enmascaramiento de otras sustancias.

Verificando en ambos protocolos la pureza del pico de ácido domoico con la librería creada para el fotodiodeo y con muestras certificadas de MUS-1B.

RESULTADOS

Se realizaron numerosas pruebas para la puesta a punto de la técnica, encontrando los siguientes problemas:

- Pérdida hasta 80% de la toxina tras el congelado del extracto ácido (Lawrence) durante 4 días.
- Variabilidad alta en los resultados analíticos de los dos métodos (Lawrence y Quilliam), debido a la dificultad de conseguir un buen homogeneizado y/o recuperabilidad del método oficial, desconocido para las especies del litoral andaluz.
- Diversidad enorme en las especies de bivalvos analizadas, casi todas diferentes al mejillón.

Para minimizar los problemas de homogeneizado se realizó la primera modificación al protocolo de Quilliam 1995: extracción con 20 g de tejido, en vez de 4 g que aconseja el método.

Se han procesado todos los resultados donde se ha detectado alguna cantidad de ácido domoico. Estos corresponden a muestras de concha fina (*Callista chione*) y vieira (*Pecten sp.*). Esto a supuesto un total de 256 análisis de ácido domoico por cada método, con un 98,5% de *Pecten sp.* y el 1,5% restante de *Callista chione*.

Se diseñaron dos tipos de experiencias:

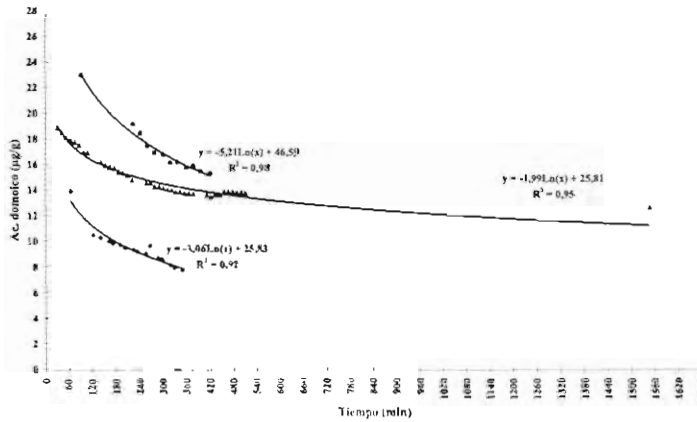
- 1.- Prueba de degradación del extracto oficial.
- 2.- Variación de la recuperabilidad a medida que aumenta el tiempo de espera entre extracción y análisis.

1.- DEGRADACIÓN TEMPORAL DEL ÁCIDO DOMOICO (LAWRENCE, 1989, 1991)

Se han realizado 5 curvas de degradación del ácido domoico a lo largo del tiempo, tres con niveles bajos, de alrededor de 20 µg/g y dos con niveles de 300 µg/g, pertenecientes a 5 muestras de vieira de diferentes zonas del litoral mediterráneo andaluz.

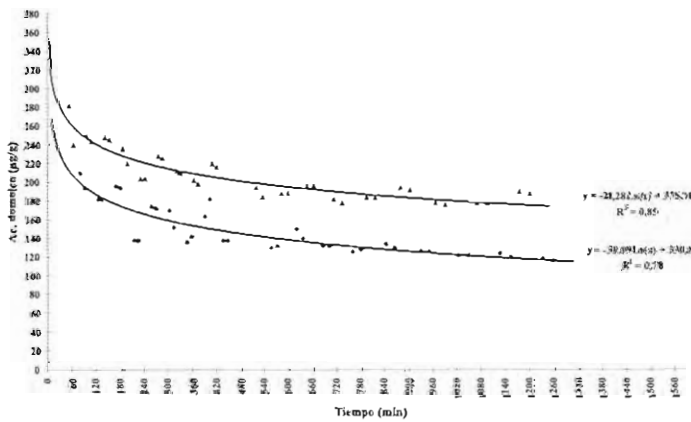
En todos los casos se ha cuantificado el ácido domoico del mismo homogeneizado que el utilizado para las gráficas, mediante el protocolo de Quilliam en el instante del inicio de la prueba y tras 24 h de reposo, sin encontrar decrementos de más del 3%.

DEGRADACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO
CONCENTRACIONES BAJAS (EXTRACTO HCl)



Resultados de la degradación de ácido domoico extraído por el procedimiento basado en el método extractivo para la P.S.P., para tres muestras diferentes de vieira (*Pecten sp.*) que contenían concentraciones cercanas al límite permitido. Una curva logarítmica es la que más se ajusta a cada caso con un coeficiente alto. Las concentraciones de toxina para cada muestra por el método de Quilliam (1995) son respectivamente: 28,4 / 26,7 / 19,9 µg/g.

DEGRADACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO
CONCENTRACIONES ALTAS (EXTRACTO HCl)



Resultados de la degradación de ácido domoico extraído por el procedimiento basado en el método extractivo para la P.S.P., para dos muestras diferentes de vieira (*Pecten sp.*) que contenían concentraciones altas. Una curva logarítmica es la que más se ajusta a cada caso con un coeficiente alto. Las concentraciones de toxina para cada muestra por el método de Quilliam (1995) son respectivamente: 362,5 / 275,0 µg/g.

La curva que mejor se aproxima a las 5 degradaciones es una logarítmica negativa, con unos coeficientes R² altos entre 0,78 y 0,98. Los valores críticos para esos coeficientes de correlación siempre son muy inferiores a 0,01; por tanto el nivel de significación de las curvas es superior al 99,9%.

La degradación del ácido domoico aumenta rápidamente a medida que transcurre el tiempo entre el inicio de la extracción y su análisis. El incremento mayor se produce en las 3 horas primeras, esta pérdida no es lineal, sino que tiende a cierta estabilidad en el tiempo.

2.- RECUPERABILIDAD DEL PROTOCOLO OFICIAL RESPECTO A QUILLIAM 1995 MODIFICADO

Hay estudios que cuantifican la recuperabilidad del método oficial respecto al de Quilliam:

- En mejillón del 75%
- En almeja del 45% (documentos internos de laboratorios canadienses).
- Para el resto de especies se desconocen estos valores de referencia.

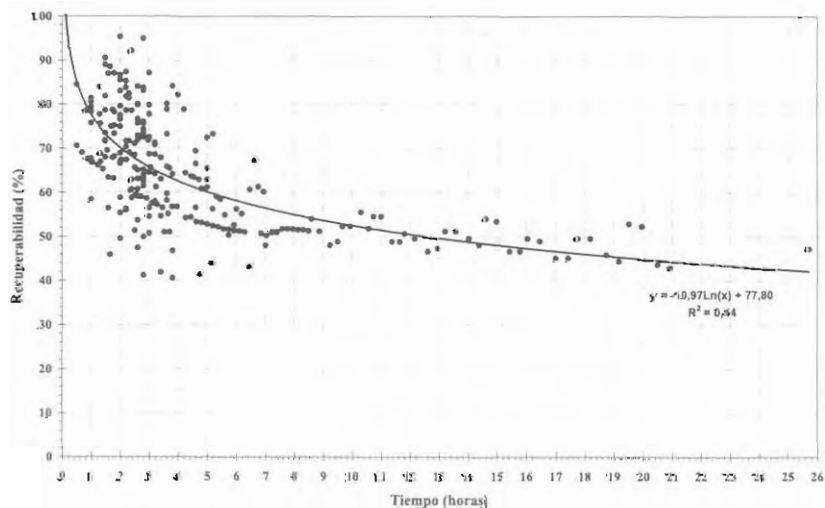
Se han tratado tan solo los resultados obtenidos en las muestras de Vieira (252 recuperabilidades).

Los referentes a concha fina se han obviado por no tener un "n" significativo.

En la primera gráfica se presentan en bruto todas las recuperabilidades.

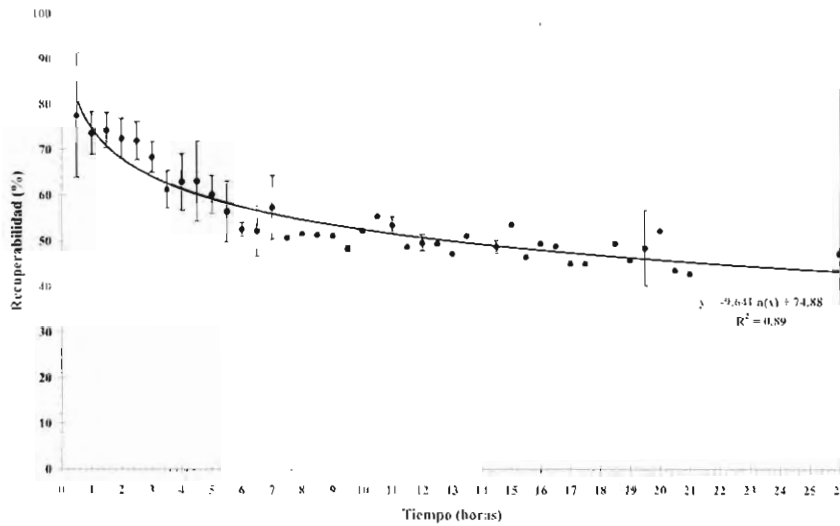
En la segunda, se han clasificado en intervalos de media hora y se ha calculado la media y su intervalo de confianza (95%).

RECUPERABILIDAD DEL EXTRACTO HCL
VIEIRA (n = 252 muestras)



Datos pertenecientes a 252 análisis de vieira pertenecientes a diferentes zonas, realizando los dos procedimientos extractivos (clorhídrico y metanol/agua). El tiempo 0 se ha tomado en el momento de la puesta en contacto del homogeneizado de la vianda con la sustancia de extracción. La mejor curva que se ajusta es una logarítmica.

RECUPERABILIDAD DEL EXTRACTO HCL
VIEIRA (media de n = 252 muestras)



Datos pertenecientes a 252 análisis de vieira pertenecientes a diferentes zonas del litoral andaluz, por los dos procedimientos extractivos (clorhídrico y metanol/agua). El tiempo 0 se ha tomado en el momento de la puesta en contacto del homogeneizado de la vianda con la sustancia de extracción. Se han tratado. Se ha calculado la media de las recuperabilidades y su intervalo de confianza (al 95%) agrupándolas por clases de ½ hora. La curva que mejor se ajusta es una logarítmica.

En la primera gráfica se presentan todos los valores obtenidos en los más de 500 análisis, intuyendo la aproximación a la curva logarítmica que se vio anteriormente en los patrones de degradación, con un decremento claro de la recuperabilidad a medida que transcurre el tiempo de espera y una tendencia a "estabilizarse".

Se observa una gran variabilidad de los datos obtenidos para un mismo tiempo, posiblemente debido a diferentes tallas de los individuos, diferentes zonas de muestreo y grado de homogeneización de la muestra.

A pesar de todo ello, los valores se ajustan a una curva logarítmica con un R2 de 0,44 y un valor crítico inferior al 0,01.

Para minimizar toda esta variabilidad muestral se han calculado los promedios de las recuperabilidades por clases de tiempo de media hora, representando su intervalo de confianza (95%). Estos datos se reflejan en la segunda gráfica.

La mejor recuperabilidad obtenida es del 74 al 78% entre ½ hora y 1 hora de la puesta en contacto del homogeneizado de la vianda y la sustancia de extracción. Al cabo de unas 12 horas alcanza una recuperabilidad del 50%.

Con un coeficiente de correlación alto y un nivel de significación del 99.9%, la recuperabilidad disminuye a medida que aumenta el tiempo de espera para el análisis, siguiendo una función logarítmica con una tendencia a la estabilización relativa.

CONCLUSIONES

Aunque en la rutina de un "monitoring" es muy ventajoso el poder utilizar el extracto de P.S.P. para valorar el ácido domoico, no lo sería para su cuantificación precisa. Dada la rápida degradación, para conseguir una recuperabilidad mayor del 75%, habría que analizar las muestras entre ½ hora y 1 hora después del inicio de la extracción, un tanto difícil teniendo en cuenta la duración del proceso y el realizar más de un análisis en el mismo día, no siendo lo normal en un "monitoring".

Con el uso del protocolo de Quilliam 1995, este problema se resuelve, ya que la toxina no se degrada de forma significativa (<3% en 24 horas).

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer el apoyo y la ayuda que nos prestó el Laboratorio de Referencia Comunitario de Sanidad Exterior de Vigo, durante nuestros primeros pasos en este mar de picos amnésicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Quilliam, M.A., M. Xie, W. R. Hardstaff, 1995. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. In: "Journal of AOAC International", 78 (2): 543-554.
- AOAC, 1995. AOAC Official Method 959.08 paralytic shellfish poison. In: "Fish and other marine products". Cap. 35.1.37 : 21.
- AOAC, 1995. AOAC Official Method 991.26 domoic acid in mussels. In: "Fish and other marine products". Cap. 35.1.22 : 9.
- Wright, J. L. C. Y M. A. Quilliam, 1995. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. In: " Manual on harmful marine microalgae, UNESCO 1995": 113-133.

AVANCES EN LA DETERMINACIÓN DE BIOTOXINAS MARINAS POR MÉTODOS QUÍMICOS

A. Gago-Martínez, J. M. Leão, N. Piñeiro, E. Carballal y J. A. Rodríguez Vázquez

Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, Campus Universitario, 36200- VIGO

INTRODUCCIÓN

La aparición de compuestos tóxicos de origen natural en el medio acuático, tanto marino como en aguas dulces, se ha visto notablemente incrementada a lo largo de los últimos años. Dicho incremento se ha asociado a la presencia de dos tipos de influencias antropogénicas, por un lado el efecto de los nutrientes procedentes ya sea de la contaminación industrial, urbana así como de contaminantes procedentes de las explotaciones agrícolas o incluso de aguas residuales de origen doméstico, y por otro la superexplotación de recursos pesqueros que provoca un decrecimiento de las especies comerciales, un incremento de pequeños peces, y consecuentemente un decrecimiento de herbívoros que favorece, a su vez, las afloraciones masivas de algas productoras de toxicidad. Entre las diversas especies responsables de este tipo de contaminaciones se encuentran especies de dinoflagelados productores de toxicidad diarreica (DSP) paralizante (PSP) así como diatomeas, causantes de toxicidad amnésica (ASP) y por otro lado especies de cianobacterias tóxicas responsables de distintos tipos de toxicidad en aguas dulces. La importante toxicología de estos compuestos a niveles muy bajos, justifica la necesidad de metodologías analíticas suficientemente sensibles, para la detección de las mismas a niveles tan bajos. Para llevar a cabo la citada determinación se han planteado diversos tipos de metodologías, fundamentalmente por vía biológica, bioquímica o química.

Los métodos químicos han proporcionado un importante avance en este campo, no sólo en lo que se refiere a la búsqueda de una óptima resolución en cuanto a separación de diversos componentes, si no también en lo que se refiere a información estructural, confirmación y caracterización de nuevos compuestos tóxicos, tanto mediante la utilización de técnicas de separación alternativas, como por medio de la utilización de distintos modos de detección, entre los que se incluye la Espectrometría de masas. Así pues, el objetivo de este estudio se ha centrado en la optimización de metodologías alternativas a las cromatográficas, como es el caso de la Electroforesis Capilar, para ser aplicadas al análisis de los citados compuestos tóxicos. La optimización de etapas previas al análisis cromatográfico o electroforético ha resultado ser imprescindible, con el fin de obtener la mayor eficacia en la resolución. En este estudio se da cuenta de los resultados obtenidos tras la aplicación de estos planteamientos al análisis de biotoxinas presentes en el medio acuático, como es el caso de las toxinas paralizantes (PSP), diarreicas (DSP), amnésicas (ASP), así como toxinas de cianobacterias.

TOXINAS PSP

A pesar de ser el Bioensayo con ratones, la metodología rutinaria y oficial, para el análisis de los citados compuestos, la búsqueda de condiciones óptimas en términos de sensibilidad, selectividad, etc. ha llevado a la búsqueda de diversas alternativas, entre las que se encuentran las cromatográficas. Desde los planteamientos iniciales de Sullivan y Oshima (Sullivan 1983, Oshima 1984), mediante la utilización de técnicas de Cromatografía de líquido de alta eficacia, con detección por fluorescencia, la cual a su vez llevaba implícita la correspondiente derivatización, en este caso postcolumna, surgieron alternativas entre las que cabe destacar la desarrollada por Lawrence, utilizando una derivatización precromatográfica (Lawrence *et al.*, 1991).

Las citadas alternativas al método biológico constituyeron un importante avance de cara a una determinación sensible de los citados componentes tóxicos paralizantes. En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos en la optimización de los planteamientos anteriores, con el fin de incrementar la sensibilidad, selectividad etc. jugando no sólo con los propios parámetros cromatográficos, sino también con la introducción de etapas exhaustivas de purificación de muestra, previas al análisis cromatográfico, como es el caso de las llevadas a cabo por Lawrence (Lawrence *et al.*, 1996) utilizando diversos procedimientos de extracción en fase sólida, así como con la optimización de la reacción de derivatización (Gago-Martínez *et al.*, Journal of Chromatography, in press). Los resultados de aplicación de esta técnica optimizada a la determinación de componentes tóxicos paralizantes en muestras de moluscos y dinoflagelados, permitieron obtener un perfil suficientemente claro de toxicidad paralizante en las muestras estudiadas que a su vez permitiría una cuantificación suficientemente adecuada como para un exhaustivo control, de la toxicidad paralizante en especies contaminadas, pudiéndose considerar que el citado método precromatográfico, reúne las características idóneas de selectividad, sensibilidad, etc., para poder ser planteado como alternativa al mencionado Bioensayo con ratones.

Una alternativa a los métodos cromatográficos para la separación y determinación de los componentes tóxicos paralizantes se encuentra en la Electroforesis capilar de alta resolución (Thibault *et al.*, 1991). Esta técnica en su modo convencional permite la separación de analitos cargados, bajo la acción de un campo eléctrico.

Estudios de aplicación de esta técnica ya sea mediante la utilización de detección ultravioleta por haz de diodos (Piñeiro *et al.*, 1999), como mediante espectrometría de masas (Gago-Martínez *et al.*, 1996) a muestras de mejillones gallegos ofrecieron resultados que además de corroborar la información obtenida mediante el análisis cromatográfico en pre y postcolumna, con detección por fluorescencia (resultados no mostrados), en cuanto al perfil tóxico paralizante de las muestras citadas, permitía la confirmación de la presencia de compuestos de dudosa identidad, así como también la identificación de nuevos componentes tóxicos de este grupo gracias a la utilización de la Espectrometría de masas como sistema de detección. La principal desventaja de la técnica electroforética se centra en los bajos valores de límite de detección, sin embargo la resolución de la técnica electroforética es más elevada. El problema de los bajos límites de detección fue abordado por Locke y Thibault, (Locke y Thibault, 1994), los cuales aplicaron un modo de Electroforesis, la Isotacoforesis, basada en una etapa previa de concentración de la muestra a la entrada del capilar y posterior separación electroforética por el modo convencional. De este modo se incrementaron considerablemente los límites de detección. Dicho modo de Electroforesis fue el utilizado para el análisis de las muestras de mejillones gallegos, cuyas condiciones se recogen en la Tabla 1 y un ejemplo de los electroferogramas obtenidos es mostrado en la Fig. 1 (a, b).

Sistema CE-UVD	HP 3DCE (Hewlett-Packard)
Capilar	Capilar de polyvinylalcohol (PVA) (75 μ m d. i. y 104 cm de longitud)
Tampón Background	Morfolina 50 mM ajustado a un pH 5 con ácido fórmico
Inyección	Inyección de muestra en un 20% de la capacidad en volumen del capilar de sílice Presión: 50 mbar Tiempo: 120 s
CTP	Potencial: 20 kV Tampón Leading: Ácido fórmico 10mM Tampón Terminating: Morfolina 50 mM morpholine ajustado a un pH 5 con ácido fórmico Tiempo: 90 s
Detector UVD	Longitud de onda: 200 nm

Tabla 1.- Condiciones para el análisis de toxinas PSP mediante EC-UV.

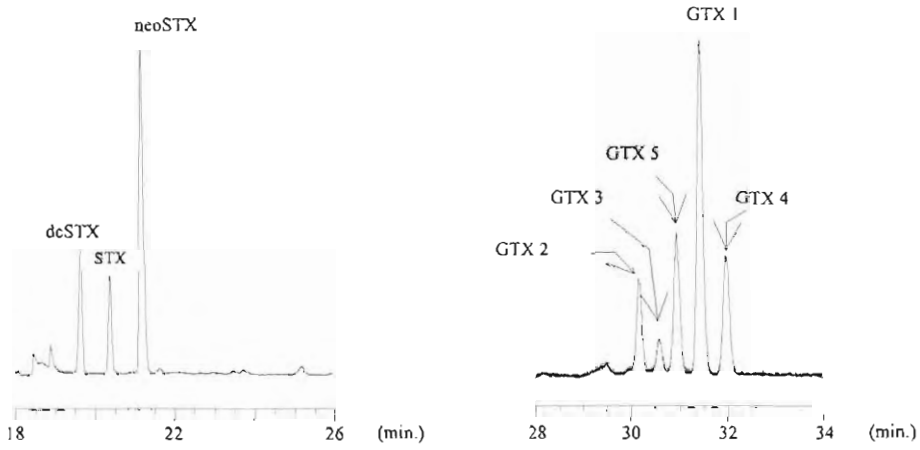


Figura 1a.- Análisis de una disolución estándar de toxinas paralizantes (PSP) mediante EC-UV.

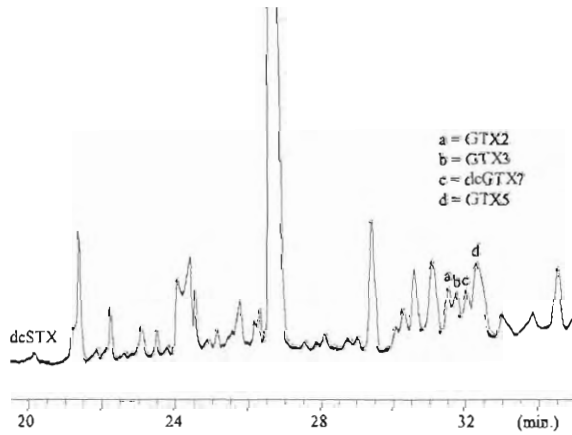


Figura 1b.- Análisis de un extracto de dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* mediante EC-UV.

Un inconveniente de la utilización de este modo de Electroforesis para la determinación del perfil tóxico paralizante se basa en la incapacidad de resolver los componentes tóxicos del grupo C1-C4 por poseer una carga neutra global. Para la resolución de los mismos se requerirían otros modos de Electroforesis, como la Cromatografía electrocinética micelar mediante la adición de tensioactivos capaces de formar micelas cargadas. Para la aplicación de ambas técnicas cromatográficas y electroforéticas se requiere la utilización de exhaustivas etapas de purificación previa mediante la utilización de procedimientos de extracción en fase sólida que permiten la eliminación de compuestos interferentes presentes en las complejas matrices estudiadas.

TOXINAS DSP

Las toxinas diarreicas son otros de los compuestos tóxicos producidos por dinoflagelados, de notable repercusión toxicológica, especialmente debido a su actividad como inhibidoras de las proteínas fosfatasa y la promoción de tumores a niveles muy bajos; razón por la cual, para su control, se requieren alternativas analíticas de suficiente sensibilidad, con el fin de asegurar la salud del consumidor.

La metodología del Bioensayo con ratones, es también, en este caso, la aceptada en la mayoría de los países para el control de estos compuestos tóxicos, a pesar de que la complejidad de los mismos, debido fundamentalmente a su fuerte carácter lipofílico, plantea numerosos problemas fundamentalmente en lo que se refiere a las etapas de preparación de muestra y concretamente en la obtención de una extracción eficaz.

Se han planteado diversas metodologías alternativas al bioensayo, especialmente por vía enzimática o química. La Cromatografía de líquido de alta eficacia ha ofrecido unas buenas condiciones para el análisis de estos compuestos, utilizando la fluorescencia como sistema de detección que ofrece unas excelentes características de sensibilidad. En la literatura se plantean diversos reactivos para la formación de los correspondientes derivados fluorescentes, siendo el 9-Antracildiazometano (ADAM) un reactivo que ofrece una elevada selectividad y sensibilidad para la derivatización de los componentes en cuestión, a pesar de plantear el inconveniente de su elevada inestabilidad. Con el fin de eliminar los problemas derivados de la misma, se ha propuesto la utilización de un reactivo ADAM sintetizado "in situ" cuyo poder de derivatización es exactamente coincidente con el del reactivo comercial, y que, por otra parte, elimina los problemas derivados de la citada inestabilidad, por el hecho de ser sintetizado en el momento de llevar a cabo la citada derivatización (Quilliam *et al.* 1998). El análisis cromatográfico de este grupo de compuestos tóxicos requiere de una intensa etapa de preparación de muestra, precisamente motivada por el fuerte carácter lipofílico de los citados componentes, así como una intensiva etapa de clean-up posterior a la derivatización con el fin de eliminar interferencias y productos secundarios derivados de la citada derivatización los cuales pudieran afectar a una idónea resolución cromatográfica. El perfil tóxico paralizante de los moluscos gallegos está compuesto por Ácido okadaico (AO), Dinofisistoxina-2 (DTX2) y acilderivados de los mismos (DTX3), para el análisis de estos últimos es necesario recurrir a una etapa de hidrólisis adicional con el fin de romper la cadena del acil derivado y proceder a la derivatización de sus precursores, AO y DTX2. Para llevar a cabo una hidrólisis efectiva en un corto espacio de tiempo se utilizó un horno de microondas convencional. Un ejemplo de los resultados obtenidos en el análisis de muestras de mejillones gallegos mediante Cromatografía de líquido con detección por fluorescencia, utilizando reactivo ADAM para la derivatización, se muestra en la Fig. 2 y las condiciones optimizadas para dicho análisis se reflejan en la Tabla 2. Los resultados obtenidos fueron también confirmados haciendo uso de la detección por Espectrometría de masas (Gago-Martínez *et al.*, 1996).

Sistema CLAE	Liquid Chromatograph, HP-1050
Columna	Columna de fase inversa, HP-Hypersil ODS (4 mm d.i. x 25 cm, 5 μ m)
Fase móvil	AcCN:H ₂ O (85:15)
Velocidad de flujo	1,0 mL/min.
Detector	Detector de Fluorescencia, HP-1046A exc = 254 nm; emis = 412 nm.

Tabla 2.- Condiciones del sistema CLAE-DF para el análisis de toxinas DSP.

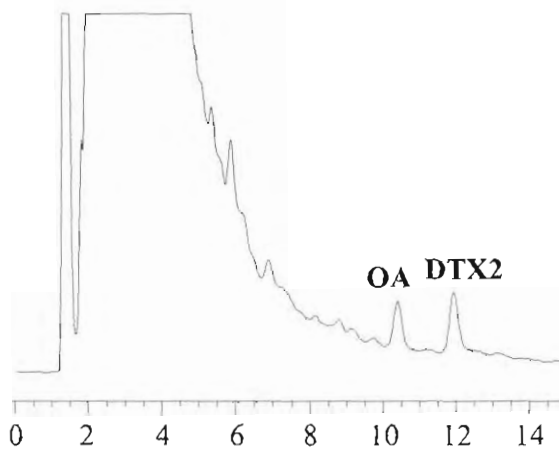


Figura 2a.- Análisis de muestra gallega de mejillón, mediante CLAE-DF.

TOXINA ASP

Desde su descubrimiento en Canadá en 1987, la incidencia de este tipo de contaminación se ha incrementado considerablemente a lo largo del mundo; concretamente en Galicia, los episodios tóxicos más relevantes en los últimos años se han asociado a este tipo de toxicidad.

La toxicología de estos compuestos es de tipo amnésico; la escasa sensibilidad del método del bioensayo como metodología para el control de los mismos, ha hecho que se plantee el método cromatográfico como alternativa. Se han propuesto dos métodos mediante Cromatografía de líquido de alta eficacia, los cuales difieren básicamente en el modo de extracción. El primero de ellos, que es el método oficial de la AOAC (Lawrence *et al.*, 1989), utiliza un medio ácido que permite realizar la extracción de los compuestos paralizantes al mismo tiempo, en el caso de que éstos estuvieran presentes. La extracción en medio orgánico resultó ser muy eficaz y fue planteada por Quilliam (Quilliam *et al.*, 1995).

Estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio, han permitido optimizar la etapa de extracción, así como tener una idea clara acerca de la eficacia de diversos procedimientos de purificación o clean-up empleados (C18, o intercambio aniónico y catiónico). La etapa de purificación es decisiva de cara a eliminar interferencias, como es el caso del triptófano, el cual aparece en matrices de este tipo, presentando el inconveniente de coeluir con el ácido domoico o con alguno de sus isómeros. Estos procedimientos de purificación fueron estudiados y comparados entre ellos con el fin de obtener la máxima eficacia en la purificación y recuperación de dichos compuestos.

En estudios previos llevados a cabo en este laboratorio se ha dedicado una especial atención a la optimización de las condiciones previas (extracción y purificación) para el análisis de ácido domoico utilizando CLAE-UV, con el fin de obtener la máxima resolución en la separación del ácido domoico de sus isómeros, estudiando las variables de la composición de la fase móvil y de las fases estacionarias los cuales permitieron una elevada eficacia en el análisis de los componentes tóxicos de este grupo. La presencia del ácido domoico en muestras gallegas contaminadas fue claramente identificada.

Como se describió anteriormente, el ácido domoico es un aminoácido que en su estructura química posee dos grupos carboxílicos, los cuales pueden adquirir carga dependiendo del valor del pH del medio. Debido a dicha propiedad fue posible la aplicación de la técnica de Electroforesis capilar al análisis de estos compuestos. Esta técnica ha sido introducida como alternativa al método cromatográfico, partiendo de las condiciones iniciales propuesta por Zhao (Zhao *et al.*, 1997); las cuales fueron sometidas a optimizaciones, variando valores de potencial, composición de tampones y pH (Piñeiro *et al.*, 1999). En las condiciones optimizadas de EC-UV (Tabla 3). Las condiciones previas optimizadas de preparación de muestra para el análisis cromatográfico resultaron ser de gran interés para su aplicación al análisis electroforético, y en dichas condiciones de llevaron a cabo los análisis de muestras reales de extractos de mariscos procedentes de las Rías Gallegas. En la Figura 3(a,b,c) se presentan ejemplos de electroferogramas obtenidos como resultado de la optimización del método electroforético descrito.

Sistema EC-UV	HP ^{3D} CE, Hewlett-Packard
Potencial	25 kV
Capilar de sílice	Longitud total 60 cm; Longitud efectiva 51 cm; 50 μ m. d. i.
Tampón Background	Borato 120 mM, 20 mM SDS, pH = 9,5
Inyección	Presión 50 mbar, 5 segundos
Temperatura del Capilar	25 °C
Detección UV/DAD	Longitud de onda 200 nm

Tabla 3.- Condiciones para el análisis de toxinas ASP mediante EC-UV.

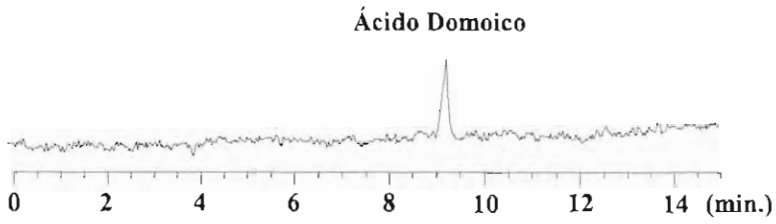


Figura 3a.- Análisis de estándar de Ácido Domoico mediante EC-UV.

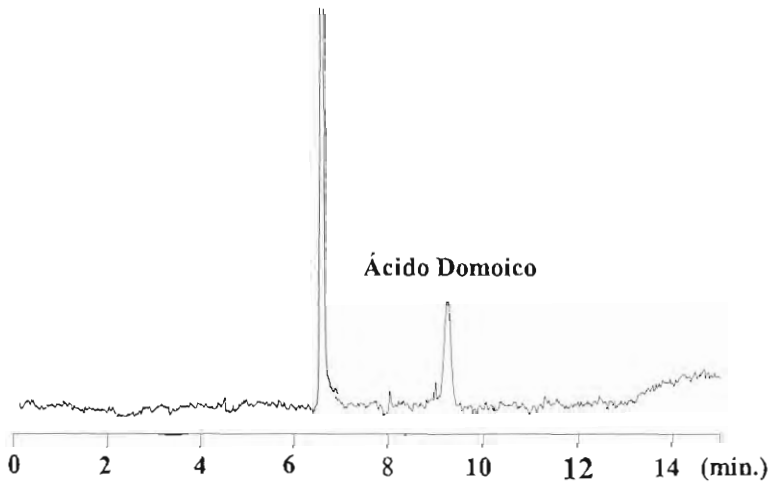


Figura 3b.- Análisis de material de referencia MUS-1 después de "cleanup" SAX-SCX, mediante EC-UV.

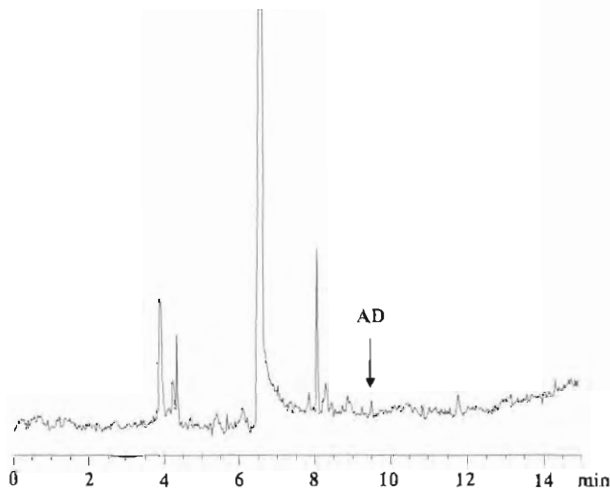


Figura 3c.- Análisis de muestra de longueirón naturalmente contaminado con ácido domoico, después de cleanup SAX-SCX, mediante EC-UV

TOXINAS DE CIANOBACTERIAS

Las toxinas de cianobacterias son producidas por especies de algas verde-azuladas, las cuales aparecen con mayor frecuencia en aguas dulces, aunque en la bibliografía más reciente se da cuenta de la presencia de las mismas también en aguas saladas, es por ello que en ocasiones dichas toxinas se incluyen también entre las biotoxinas marinas. Más de 50% de los afloramientos de este tipo de algas tóxicas son responsables de la producción de hepatotoxinas y neurotoxinas (Rapala *et al.*, 1994). Los estudios sobre cianobacterias a nivel toxicológico se llevaron a cabo por medio del método del Bioensayo con ratones. Sin embargo, hasta la fecha han sido propuestos una serie de métodos cromatográficos, entre ellos HPLC-UV (Wong *et al.*, 1982). Otra alternativa a los métodos cromatográficos es la Electroforesis capilar, la cual fue aplicada a las muestras gallegas contaminadas, observándose, que dicha alternativa ofrecía unos excelentes valores de eficacia en la resolución, mientras que los niveles de sensibilidad eran muy inferiores a los obtenidos mediante Cromatografía de líquido de alta eficacia. En la bibliografía se encontraron dos planteamientos básicos para llevar a cabo estos análisis electroforéticos, los cuales demuestran su gran utilidad en este campo, presentando como siempre, la ventaja de la elevada eficacia y la deficiente sensibilidad, requiriéndose del uso de técnicas de preconcentración en el campo de análisis de este tipo de compuestos tóxicos. (Krull *et al.*, 1992). Debido a la similitud de las estructuras a estudiar, y con el fin de mejorar la selectividad, se ha empleado un modo de Electroforesis. El modo de Cromatografía Electrocinética Micelar (MECK) presenta un elevado grado de resolución en términos de separación para este tipo de toxinas (Onyewuenyi *et al.*, 1996). Previamente al análisis cromatográfico y electroforético se desarrollaron estudios sobre la etapa de extracción y purificación utilizando diferentes disolventes de extracción, así como, distintas fases estacionarias en la etapa de purificación por extracción en fase sólida. A continuación se optimizaron aquellos parámetros que pudieran mejorar la eficacia de la separación de estos compuestos, ya sea mediante CLAE-UV así como por EC-UV en modo MECK.

En la Fig. 4 se muestran ejemplos de electroferogramas obtenidos del análisis de estándares de microcistinas LR y RR, así como de muestras de extractos de cianobacterias procedentes de un afloramiento natural que tuvo lugar en Montargil (Portugal), mediante EC-UV. La técnica electroforética resultó ser de gran utilidad en lo que se refiere a la obtención de una gran eficacia en la resolución, mientras que los niveles de sensibilidad fueron claramente inferiores a los obtenidos mediante la técnica cromatográfica.

Sistema EC-UV	HP ³⁰ CE, Hewlett-Packard
Potencial	25 kV
Capilar de sílice	Longitud total 60 cm; Longitud efectiva 51 cm; 50 μ m. d. i.
Tampón Background	Borato 120 mM, 20 mM SDS, pH = 9,5
Inyección	Presión 50 mbar, 5 segundos
Temperatura del Capilar	25 °C
Detección UV/DAD	Longitud de onda 200 nm

Tabla 4.- Condiciones para el análisis de Microcistinas mediante EC-UV.

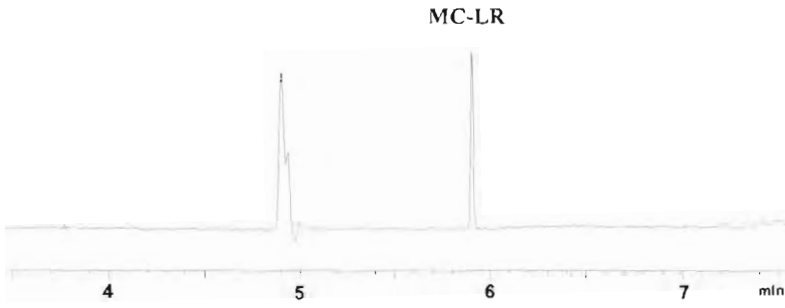


Figura 4a.- Análisis de estándar MC-LR mediante EC-UV.

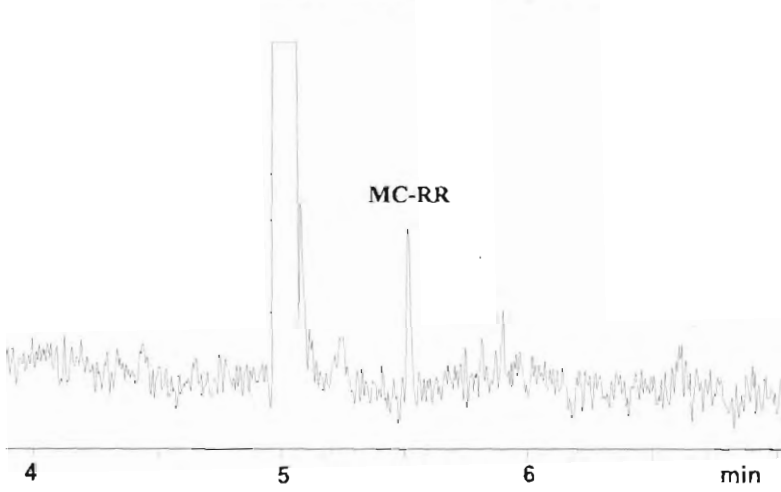


Figura 4b.- Análisis de estándar de MC-RR mediante EC-UV.

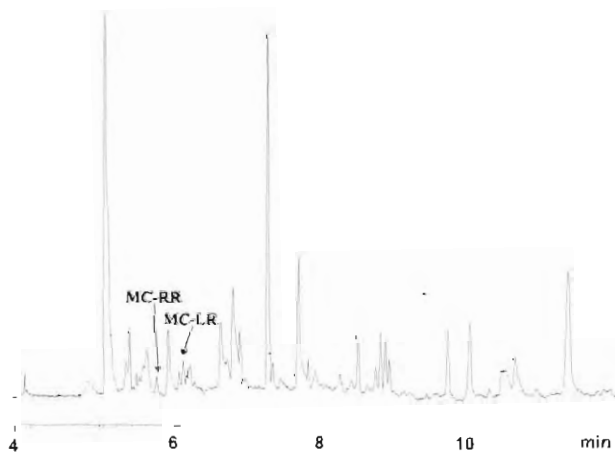


Figura 4c.- Análisis de una muestra naturalmente contaminada con Microcistinas mediante EC-UV.

BIBLIOGRAFÍA

- Gago A., Rodríguez Vazquez J. A., Quilliam M. A. y Thibault P., *Natural Toxins*, 1996, 4, 72-79.
- Krull I. S. y Mazzeo J. R., *Nature*, 1992, 357, 92.
- Lawrence J. F., Charbonneau C. F., Ménard C., Quilliam M. A. y Sim P. G., *J. Chromatogr.*, 462, 349-356
- Lawrence J. F., Ménard C. y Charbonneau C. F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1991, 74 (2), 404-409
- Lawrence J. F., Roussel S. y Menard C., *J. Chromatography A*, 1996, 721, 359-364.
- Locke S. J. y Thibault P., *Anal. Chem.*, 1994, 66, 3436-3446.
- Onyewuenyi N., Hawkins P., *J. of Chromatogr. A*, 1996, 749, 171-277
- Oshima Y., Machida M., Sasaki K., Tamaoki Y. y Yasumoto T., *Agric. Biol. Chem.*, 1984, 48 (7), 1707-1711.
- Piñeiro N., Leão J. M., Gago Martínez A. y Rodríguez Vázquez J. A., *J. of Chromatog. A*, 1999, 847, 223-232.
- Quilliam M. A., Gago-Martínez A., Rodríguez-Vázquez J. A., *J. of Chromatography*, 1998, 807, 229-239.
- Quilliam M. A., Xie M. y Hardstaff W. R., *J. AOAC Int.*, 1995, 78, 543-554.
- Rapala J., Lahti K., Sivonen K. y Niemela, *Lett. Appl. Microbiology*, 1994, 19, 432.
- Sullivan J. J. y Iwaoka W. T., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1983, 66, 297-303.
- Thibault P., Pleasance S. y Laycock M., *J. of Chromatog.*, 1991, 542, 483-504.
- Wong S. H. y Hindin E., *J. Am. Water Works Assoc.*, 1982, 74, 528.
- Zhao J. Y., Thibault P. y Quilliam M. A., *Electrophoresis*, 1997, 18, 268-276.

CONTROL SANITARIO DE TOXINAS MARINAS: ACUERDOS Y ACTIVIDADES DE LA RED DE LABORATORIOS EUROPEOS NACIONALES DE REFERENCIA.

A. Míguez, M.L. Fernández, E. Cacho, A. Martínez
Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas.
Ministerio de Administraciones Públicas

INTRODUCCIÓN

El control sanitario de las toxinas marinas, implica la investigación de la presencia de estos compuestos en los alimentos a través de ensayos y métodos analíticos instrumentales y la comparación de los resultados obtenidos con los límites establecidos. Tanto los métodos de determinación como los límites han sido plasmados en regulaciones en aquellos países que realizan control de estas sustancias bioactivas.

La revisión de las regulaciones internacionales pone de manifiesto discrepancias que pudieran dar lugar a situaciones de riesgo para la salud pública y/o de agravio comparativo para las industrias y sectores productores implicados. Ésto es especialmente grave en aquellas áreas geográficas en las que existe libre circulación de mercancías, como es el caso de la Unión Europea (UE). El control sanitario de las toxinas marinas en la UE está establecido en las Directivas 91/492 (1), aplicable a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos y en la 91/493 (2) aplicable a la producción y puesta en el mercado de los productos de la pesca. La Directiva 91/492 es vaga en lo que se refiere al control de toxinas PSP y DSP. No se establecen los métodos biológicos a aplicar y en el caso de las toxinas DSP el criterio de positividad de los resultados depende del límite de detección del método biológico elegido.

A la vista de esta situación, la Comisión Europea nominó un Laboratorio Nacional de Referencia (NRLs) de biotoxinas marinas en cada país de la UE y un Laboratorio Comunitario de Referencia (CRL), con el fin de organizar una red de intercambio de experiencia e información y un foro para la consecución de acuerdos sobre métodos y criterios de toxicidad. A lo largo de los últimos años, se han realizado diferentes actividades dentro de este marco de trabajo. El objetivo de este informe es presentar los actividades de la red de Laboratorios de Referencia de Toxinas Marinas de la UE y los acuerdos más recientes, haciendo especial hincapié en las dificultades asociadas al establecimiento de regulaciones en esta área.

REGULACIONES RELATIVAS A TOXINAS MARINAS

Las regulaciones relativas a métodos y límites deben ser establecidas sobre la base de estudios epidemiológicos y toxicológicos y teniendo en cuenta las herramientas analíticas

disponibles: métodos analíticos, patrones y material de referencia. En el caso de algunas toxinas marinas, no hay disponibilidad de datos toxicológicos y los límites han sido establecidos en base a los escasos datos epidemiológicos o en base a los límites de detección de los métodos disponibles. El establecimiento de límites requiere estudios toxicológicos robustos que son largos y costosos, e implican el uso de elevadas cantidades de toxinas puras que no están disponibles en muchos casos. Sin datos toxicológicos, se dificulta la realización de una evaluación del riesgo. La escasez de toxinas puras y material certificado de referencia ha dificultado igualmente el desarrollo y validación de métodos adecuados de determinación. Por otra parte, el continuo hallazgo de nuevas toxinas o de toxicidades de origen desconocido, así como el gran número de alimentos de origen marino que pueden actuar como vectores de las toxinas, hace todavía más difícil el establecimiento de estrategias de control y de regulaciones. Adicionalmente, las crecientes dificultades en algunos países europeos para el uso de ensayos con animales dificultan el alcance de acuerdos y por tanto la armonización de las regulaciones, puesto que hoy por hoy, y desde el punto de vista del control sanitario de algunos grupos de toxinas, no existen alternativas a los bioensayos con animales.

A pesar de las carencias y de las dificultades, a lo largo de los últimos años se han alcanzado acuerdos relativos al control sanitario de toxinas marinas, en el marco de la red de Laboratorios Europeos de Referencia. Algunos de estos acuerdos han dado lugar a cambios en la legislación europea, y otros pudieran ser la base de futuras regulaciones.

En concreto, de la primera reunión se derivaron acuerdos que dieron lugar a la inclusión del control de las toxinas ASP en la Directiva 97/61/CE (3). Este se estableció de la siguiente forma:

"El contenido de Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) en las partes comestibles de los moluscos (el cuerpo entero o cualquier parte consumible por separado) no deberá sobrepasar los 20 microgramos de Ácido Domoico por gramo, según el procedimiento de análisis HPLC". Los acuerdos en relación a las toxinas PSP y DSP se pueden resumir como sigue:

- El método de elección para la determinación de toxinas PSP es el método biológico descrito en los métodos oficiales de análisis de la AOAC, método 959.08 (4). Se reconoce como válido el límite establecido en la Directiva y se acuerda que la toxicidad se exprese en microgramos de equivalentes de saxitoxina por 100g de vianda.
- Con respecto a las toxinas DSP, y a la vista de la complejidad de este grupo de sustancias, se acuerda que deberían estar sometidas a control todas las toxinas incluidas en la fracción soluble en acetona (ácido okadaico y análogos, pectenotoxinas y yessotoxinas) y no solo aquellas genuinamente diarreas. En consecuencia, el método de elección es aquel que detecte el espectro más amplio de toxinas, recomendándose el método de Yasumoto (1978)(5), y como criterio de positividad, la muerte de dos de tres ratones en 24 horas.

La descripción pormenorizada de las discusiones y los acuerdos alcanzados en la primera reunión de la red de EU-NRLs se encuentra en las Actas de la V Reunión Ibérica (6).

En la II reunión de los laboratorios de la red, que tuvo lugar en Vigo en Septiembre de 1998, se sometieron de nuevo a discusión las metodologías y criterios de toxicidad utilizados en el control de toxinas marinas. Sin embargo, los escasos avances realizados en el área de toxicología, desarrollo de patrones y desarrollo de métodos alternativos, no permitieron establecer modificaciones a los acuerdos alcanzados anteriormente, de tal forma que se

refrendaron dichos acuerdos con el propósito de asegurar el mayor nivel de protección sanitaria, y de utilizar los mismos como guías sanitarias para los intercambios comerciales con países terceros.

Con el objetivo de mejorar la interacción entre los laboratorios de la red y avanzar en las áreas en las que se identificaron especiales carencias, se crearon varios grupos de trabajo integrados por expertos y miembros de dichos laboratorios.

A continuación se exponen las conclusiones y actividades de dichos grupos de trabajo :

Grupo de trabajo I (Amnesic Shellfish Poisoning)

Los objetivos iniciales de este grupo eran la consideración de la extensión del método de Lawrence (7), validado para el mejillón (8) a otras matrices, y la validación del método de Quilliam (9). Se reconoció que la principal ventaja del método de Lawrence era la posibilidad de la utilización de una extracción común para las toxinas PSP y ASP. Sin embargo se cuestionó si este beneficio compensaba los inconvenientes del método en términos de inestabilidad de los extracto ácidos y recuperabilidad dependiente de las diferentes matrices. Por todo ello no se consideró prioritario acometer un proceso de validación del método de Lawrence para otras matrices, y se acordó enfocar los estudios de validación en el método de Quilliam, del que se reconoció una mayor robustez, mayor recuperabilidad con las diferentes matrices, y mayor potencial para la determinación de isómeros del ácido domoico. Se concedió especial atención a la necesidad de investigar la presencia de dichos isómeros en los moluscos, para realizar una estimación de su importancia y relevancia desde el punto de vista sanitario.

Si bien se reconoció que existía uniformidad en cuanto al uso de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la determinación de ASP, se pusieron de manifiesto ciertas diferencias en las metodologías empleadas por los diferentes laboratorios que hacen aconsejable la realización de estudios intercomparativos para verificar la equivalencia de dichas metodologías.

Grupo de trabajo II (Paralytic Shellfish Poisoning)

Los objetivos de este grupo de trabajo eran realizar una revisión del bioensayo en ratón de la AOAC para la determinación de PSP (4) e identificar y resolver aquellos aspectos vagos o críticos del procedimiento, sin introducir modificaciones profundas que pudieran requerir una nueva validación del procedimiento.

El grupo reconoció las dificultades que entrañaban ciertas matrices (vieiras, corruco, moluscos procesados, etc) a efectos de la preparación de la muestra y/o de su extracción de acuerdo con el procedimiento (formación de geles, líquido de cobertura en el caso de conservas, etc) y acordó la realización de estudios encaminados a la resolución de dichas dificultades. Asimismo se reconoció que el número de individuos que debían integrar la muestra analítica merecía consideración y estudio. Existen grandes diferencias de tamaño dependiendo de la especie de molusco y para determinadas especies podría alcanzarse el peso de muestra requerido en el procedimiento a partir de muy pocos individuos, lo que podría comprometer la representatividad de la muestra.

Se acordaron las siguientes recomendaciones: reducir el rango de pH de trabajo a 2.5-3 (rango que se aplicará a todos los procesos que requieran ajuste de pH), utilizar siempre ratones del mismo sexo, de peso comprendido entre 17 - 23 g, preferiblemente entre 19 - 21 g, y en todos los casos en que el peso se desvíe de 20 g efectuar la corrección de las unidades

ratón utilizando las tablas de corrección de peso incluidas en el procedimiento.

Se reconoció la necesidad de realizar la estandarización del bioensayo, la comprobación periódica del factor de conversión, y la inyección de al menos tres ratones para determinar la toxicidad o no toxicidad de cada muestra objeto de análisis.

Grupo de trabajo III (Diarrhetic Shellfish Poisoning)

Los objetivos principales de este grupo eran clarificar que toxinas debían ser consideradas dentro del grupo DSP y, en el caso de que alguna familia de toxinas fuera excluida del grupo, determinar si debían seguir siendo monitorizadas aunque bajo una clasificación diferente. El grupo reconoció la necesidad de que un panel de toxicólogos efectuara la revisión y valoración de los datos toxicológicos y epidemiológicos disponibles en relación al ácido okadaico y derivados, pectenotoxinas y yessotoxinas. Dicha tarea fué coordinada y organizada por el Laboratorio Comunitario de referencia en colaboración con la DG VI de la Comisión Europea. Las principales conclusiones del panel fueron las siguientes:

Con respecto al ácido okadaico (AO), el panel reconoció que si bien los experimentos realizados con animales (10) a los que se le administraba esta sustancia a altas dosis durante un largo periodo de tiempo, ponían de manifiesto la actividad de promotor de crecimiento tumoral, las cantidades de AO presentes en bivalvos estaban muy por debajo del nivel que producía crecimiento tumoral en roedores y que por tanto no existía ninguna evidencia de que esta actividad se fuera a manifestar en humanos por el consumo de bivalvos, sobre todo teniendo en cuenta el nivel de protección ya garantizado por las regulaciones actuales. Se concluyó que de los estudios disponibles sobre la actividad de promoción de crecimiento tumoral no se derivaba que existiera un riesgo a largo plazo para los consumidores. Se estableció que no existía evidencia contundente de la genotoxicidad de estas sustancias y que por tanto solo la actividad diarreica debía ser tenida en cuenta para el establecimiento de los límites de tolerancia. El nivel de 16 microgramos de equivalentes de AO / 100 g de vianda acordado por la red de laboratorios de la UE se consideró adecuado desde el punto de vista de protección de los consumidores.

En relación a las pectenotoxinas, se reconoció que los estudios de sus efectos tras inyección intraperitoneal en roedores mostraban una potente actividad hepatotóxica, y que la administración oral de estas sustancias producía en roedores un efecto diarreico (11,12). Se reconoció que no existían datos que permitieran establecer de forma precisa el mecanismo de acción y los posibles efectos para el hombre derivados de su ingestión. Por otra parte se constató que la valoración del riesgo para la salud pública de estas sustancias sería tremendamente difícil teniendo en cuenta su co-ocurrencia en fitoplancton y bivalvos con otras toxinas diarreicas como son el AO y análogos y la limitada disponibilidad de estas sustancias (las pectenotoxinas son producidas por especies del género *Dinophysis*, organismos para los que no se ha conseguido establecer cultivos en laboratorio). Se concluyó que eran necesarios estudios sobre su toxicidad oral para comprender y valorar su importancia desde el punto de vista de la salud pública y que hasta que dichos estudios estuvieran disponibles, deberían mantenerse monitorizadas dentro del grupo DSP y al mismo nivel que el ácido okadaico y análogos.

Con respecto a las yessotoxinas, se reconoció que si bien los estudios experimentales realizados sobre roedores demostraban que estas sustancias no producían diarrea, su administración por inyección intraperitoneal producía efectos patológicos en corazón e hígado (13). Se consideró que la información disponible, aunque escasa, no parecía indicar que estas sustancias produjeran diarrea en humanos.

Se estableció la necesidad de realizar estudios de toxicidad oral y estudios farmacocinéticos dirigidos a conocer su mecanismo de acción para de esta forma establecer el riesgo de intoxicación humana. A diferencia de las pectenotoxinas, en el caso de las yessotoxinas, estos estudios son abordables, teniendo en cuenta que existe disponibilidad comercial de estas sustancias y que es posible el cultivo en laboratorio de los organismos productores de las mismas. Hasta que nuevos datos permitan establecer la toxicidad, y teniendo en cuenta las metodologías actuales para su determinación se consideró que las yessotoxinas deberían mantenerse monitorizadas dentro del grupo de las toxinas DSP.

Grupo de trabajo IV: Ensayos de inhibición de fosfatasas

El objetivo de este grupo era la valoración de la aplicabilidad de los ensayos de inhibición enzimática para el control sanitario del ácido okadaico y algunos de sus derivados .

El grupo de trabajo identificó como prometedores dos versiones de este tipo de ensayos enzimáticos, uno basado en la medición de la inhibición de la actividad de las protein-fosfatasas utilizando la detección colorimétrica (Tubaro *et al.*) (14) y otro de mayor sensibilidad basado en la detección fluorimétrica (Vieytes *et al.*) (15) y estableció un plan de trabajo con diferentes materiales (estándares de toxinas, material naturalmente contaminado) para investigar las características de dichos ensayos y realizar futuros estudios inter-laboratorios. El grupo reconoció el ámbito de aplicación de dichos ensayos a la detección de aquellas sustancias que producen inhibición de las protein-fosfatasas y que por tanto estos ensayos no cubren todo el espectro de las toxinas liposolubles actualmente incluidas en el grupo de las toxinas DSP (pectenotoxinas y yessotoxinas no son inhibidores de las fosfatasas) . Se reconoció que además del ácido okadaico y algunos de sus derivados, otras sustancias tóxicas para el hombre como son las microcistinas y la nodularina, han sido detectadas en bivalvos en virtud de estas técnicas, lo que revela su gran potencial como herramientas analíticas para la protección de la salud pública.

WG V: Ensayos con neuroblastoma

El objetivo de este grupo era la valoración de la aplicabilidad de estos ensayos al control sanitario de las toxinas PSP.

Reconociéndose las crecientes dificultades existentes en los países europeos para el uso de ensayos con animales, se valoraron diferentes metodologías que pudieran en un futuro más o menos próximo reducir o eliminar el uso de ratones para la determinación de toxinas PSP. Se valoró que entre los ensayos biológicos y bioquímicos existentes en la actualidad, aquellos basados en el mecanismo de acción de las toxinas, esto es los ensayos funcionales, eran los más adecuados desde el punto de vista de control sanitario, en contraposición a los ensayos estructurales (ej. inmunoensayos). Estos últimos, si bien presentaban otras interesantes aplicaciones, tienen el inconveniente desde el punto de vista de la protección de la salud pública de que la correlación entre los resultados del ensayo y la toxicidad real de las muestras analizadas depende del perfil de toxinas, produciéndose no solo falsos positivos sino también falsos negativos.

Dentro de los ensayos funcionales, se identificaron los ensayos con neuroblastoma y los ensayos de receptor como los más prometedores. Sin embargo se constató que estos últimos estaban sujetos a mayores restricciones para su consideración como herramientas de control sanitario puesto que hasta la fecha implican el uso de marcadores radiactivos (concretamente saxitoxina tritiada) y requieren el uso de tejidos obtenidos a partir de cerebro de ratas. Por ello

se acordó concentrar los estudios en los ensayos con neuroblastoma de los que actualmente existe una versión en forma de kit comercial (MIST-KIT, Jellet Biotek, Canada) (16) y la versión que requiere el uso de cultivos celulares mantenidos en laboratorio (17). El kit canadiense se encuentra actualmente en proceso de validación siguiendo el protocolo de la AOAC. Dicho proceso está siendo realizado utilizando muestras de mejillón y por tanto para su futuro uso en rutina con otras especies de moluscos requeriría una posterior validación con otras matrices. Se discutieron por otra parte las dificultades logísticas que implicaría el uso del kit, puesto que su validez no se extiende mas allá de tres semanas. Actualmente se distribuye desde Canadá, lo que a veces se traduce en demoras considerables en su recepción en los laboratorios. Este hecho, unido a la corta vida del kit, hace difícil su uso en rutina, a menos que se estableciera un proveedor en Europa. El grupo reconoció que estas dificultades logísticas hacían conveniente iniciar estudios de validación de la versión que utiliza cultivos de neuroblastoma mantenidos en los propios laboratorios y estableció un plan de trabajo dirigido a la formación de los laboratorios nacionales de referencia en cuanto al mantenimiento y uso de cultivos celulares.

Acido Azaspiro y análogos

Con el objetivo de obtener toda la información disponible en la actualidad sobre este nuevo grupo de toxinas, y establecer las medidas oportunas para su control y protección de la salud pública, el Laboratorio Comunitario de Referencia junto con la DG VI de la Comisión Europea, coordinó la organización de una reunión con expertos de dos laboratorios de Irlanda, país en cuyos moluscos se detectó por primera vez este grupo de toxinas y en el que se encuentra el grupo más activo de investigación en esta área (Cork Institute of Technology, Cork). La información que se resume seguidamente fué proporcionada por el Profesor Kevin James del Cork Institute of Technology (Irlanda) y Dr Terry McMahon del Fisheries Research Centre (Dublin) Laboratorio Nacional de Referencia de Irlanda.

Los primeros datos epidemiológicos se remontan a Noviembre de 1995, fecha en la que se produjo una intoxicación en Holanda debida a la ingestión de mejillones procedentes de la costa Oeste de Irlanda. Los síntomas de la intoxicación fueron diarrea, nauseas, vómitos dolores de cabeza y estómago y calambres y se prolongaron durante 3-5 días.

Cuando las muestras de mejillón fueron analizadas por el bioensayo de la rata y bioensayo en ratón se obtuvieron resultados positivos. Este hecho junto con la sintomatología diarreica de la intoxicación provocó que en un primer momento se atribuyera la misma a la presencia de toxinas DSP en los mejillones. Estudios posteriores revelaron la presencia de una toxina liposoluble desconocida hasta la fecha a la que finalmente se denominó ácido azaspiro (18). Dicha toxina es un ácido polietéreo policarboxílico, de fórmula $C_{47}H_{71}NO_{12}$. Con posterioridad han sido aislados e identificados diferentes análogos de dicho compuesto. El origen de estas sustancias es desconocido hasta la fecha, si bien la aparición estacional de las mismas en los bivalvos, así como el patrón de metilación de la molécula hacen sospechar que el agente productor de las mismas es un dinoflagelado.

Al igual que los toxinas DSP, el ácido azaspiro se acumula preferentemente en las glándulas digestivas de los bivalvos. No solo los mejillones, sino también las ostras han sido afectadas por esta contaminación. La depuración natural de estas sustancias es muy lenta, de tal forma que las toxinas pueden persistir durante muchos meses después de la intoxicación inicial. Por otra parte, se han observado variaciones individuales de la toxicidad de hasta el 400%.

Los síntomas que presenta el ratón tras inyección intraperitoneal de esta sustancia difieren de los producidos por las toxinas DSP y se asemejan a aquellos característicos de las neurotoxinas: desorientación, parálisis de las patas traseras, dificultades respiratorias y saltos y convulsiones similares a los producidos por las toxinas PSP inmediatamente antes de la muerte. A bajas dosis, estas sustancias pueden producir la muerte del ratón en dos o tres días. Estudios experimentales han demostrado que los principales órganos afectados por estas sustancias son hígado, páncreas, timo, bazo y tracto digestivo (19).

Con posterioridad a la intoxicación en Holanda se produjeron intoxicaciones en Italia, Irlanda y Francia, todas ellas debidas al consumo de mejillones procedentes de aguas irlandesas. Análisis realizados sobre bivalvos de Noruega y Reino Unido han revelado la presencia de estas sustancias en los mismos, de donde se deduce que la ocurrencia de este grupo de toxinas no está confinada a bivalvos de aguas irlandesas y que por tanto deben ser consideradas un riesgo potencial en otras aguas de producción europeas.

Actualmente, el método analítico más adecuado para la detección de ácido azaspiro y análogos en muestras de bivalvos es la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a Espectrometría de Masas. Para los laboratorios que no dispongan de esta metodología, se recomienda el uso del bioensayo en ratón de Yasumoto (1978) (5) aún a sabiendas de que el protocolo de extracción no ha sido todavía optimizado para este grupo de toxinas, y de que incluso un criterio de positividad de "dos de tres ratones muertos en 24 horas" pudiera no ser suficientemente precautorio en el caso de la presencia de este grupo de toxinas en los bivalvos. Se necesita con urgencia el desarrollo de una metodología de extracción, purificación y detección adecuada para la determinación de estas sustancias en bivalvos, así como estudios encaminados a la comprensión de los orígenes de esta toxicidad y de la evaluación del riesgo, con el objetivo de desarrollar regulaciones adecuadas para la protección de la salud pública.

REFERENCIAS

- 1 - Official Journal of the European Communities 91/492/EEC
- 2 - Journal of the European Communities 91/493/EEC
- 3 - Official Journal of the European Communities 97/61/CE
- 4 - AOAC Official Methods of Analysis (1998). Method 959.08 Paralytic Shellfish poison.
- 5 - Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M. (1978). Bull.Jap.Soc.Scienc.Fish.44,1249-1255
- 6 - Martínez A., Fernández M.L., Míguez A. y Cacho E. (1997) V Reunión Ibérica Sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Actas de la Reunión.139-147
- 7 - Lawrence J.F., Charbonneau C.F. and Menard C.(1991). J.Assoc.Off.Anal.Chem.,74, 68-72.
- 8 - AOAC Official Methods of Analysis (1998). Method 991.26 Domoic acid in mussels.
- 9 - Quilliam M.A., Xie M. And Hardstaff W.R. (1995). J. AOAC: Int.,78,2,543-554.
- 10 - Fujiki H., Sukanuma M., Suguri H., Yoshizawa S.Takagi K., Uda N.Wakamatsu K., Yamada K., Murata M., Yasumoto T and Sugimura T.1988- Diarrhetic Shellfish Toxin,

- Dinophysistoxin-1 is a potent tumor promotor on mouse skin. Jpn.J. Cancer Research.79,1089-1093.
- 11 - Terao K., Ito E., Oarada M., Murata M. and Yasumoto T. 1990- Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Pactinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28 ,1095-1104.
 - 12 - Terao K., Ito E., Ohkusu M. and Yasumoto T. 1993- a comparative study of the effects of DSP toxins on mice and rats. In : "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea". T.J. Smayda and Y. Shimizu. (eds). Elsevier. Amsterdam. 581-586.
 - 13 - Ogino H., Kumagai M. and Yasumoto T. 1997- Toxicologic Evaluation of Yessotoxin. *Natural Toxins* .5. 255-259.
 - 14 - Tubaro A., Florio C., Luxich E., Sosa S., Della Loggia R. And Yasumoto T. (1996). *Toxicon* 34,743-752.
 - 15 - Vieytes M.R., Fontal O., Leira F., Baptista de Sousa J.M. and Botana L. (1997). *Analytical Biochemistry* 248, 258-264.
 - 16 - Jellet J.F., Wood R., Belland E.R. and Doucette L.I (1997) .VIII International Conference On Harmful Algae .558
 - 17 - Gallacher S. And Birkbeck T.H.(1992) *FEMS Microbiolog.Lett.*92,101-108
 - 18 - Satake M., Ofuji K., Naoki H., James K., Furey A., Ma Mahon T. Silke J. and Yasumoto T. 1998- Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society*. 120. 9967-9968.
 - 19 - Satake M., Ofuji K., James K., Furey A. and Yasumoto T. 1998- New toxic event caused by Irish mussels. In: "Harmful Algae". Reguera B., Blanco J., Fernández M.L., Wyatt T. (Eds). Xunta de Galicia and IOC of UNESCO. 468-469.

PROLIFERACIÓN DE *Alexandrium minutum* EN EL PORT D'ANDRATX (MALLORCA, ISLAS BALEARES) RELACIÓN CON LAS VARIABLES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.

G. Moyà, M. Puigserver, E. Sintès, G. Ramon y A. Martínez-Taberner

Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears, Carretera de Valldemossa km 7.5, 07071 Palma de Mallorca.

E-mail: dbagmn0@ps.uib.es

Resumen

Se presentan los resultados de un estudio relativo a la fase final de una proliferación de *Alexandrium minutum*, detectada en una zona portuaria de la Isla de Mallorca. La proliferación, localizada en la parte más interna del puerto, tenía, en el momento de realizar el muestreo, una densidad máxima de $6.7 \cdot 10^3$ cél · ml⁻¹, una concentración de clorofila a de 3.39 mg Chl a · m⁻³ y una producción primaria de 36.22 mg C · m⁻³ · h⁻¹. La temperatura del agua era de 16.4 °C, y las concentraciones de nitrógeno y fósforo muy bajas. Como consecuencia de la elevada densidad del fitoplancton otras variables alcanzaban también valores altos, es el caso del coeficiente de extinción vertical 1.13 m⁻¹, la turbidez 7.00 NTU y los sólidos totales 16.25 mg · l⁻¹. Se ha observado un dominio del microplancton en la zona afectada por la proliferación, y del picoplancton en el resto del área estudiada.

Palabras clave: proliferación, *Alexandrium minutum*, zona portuaria, Islas Baleares, Mediterráneo Occidental.

Abstract

Alexandrium minutum bloom in Port d'Andratx (Balearic Islands, Western Mediterranean) its relation to physical, chemical and biological variables. A study on the final phase of a proliferation of *Alexandrium minutum*, detected in a harbour of the island of Majorca is discussed. The proliferation, which was in the inner part, had a maximum density at sampling time of $6.7 \cdot 10^3$ cell · l⁻¹, chlorophyll a concentration of 3.39 mg Chl a · m⁻³ and primary productivity of 36.22 mg C · m⁻³ · h⁻¹. The water temperature was 16.4°C and nitrogen and phosphorus concentrations were very low. Due to the high density in phytoplankton other variables also had high values. This is the case of the vertical extinction coefficient 1.13 m⁻¹, turbidity 7.00 NTU and suspended matter 16.25 mg · l⁻¹. We have observed the dominance of microplankton at the proliferation site, and of picoplankton in the remaining area studied.

Keywords: Bloom, *Alexandrium minutum*, harbour, Balearic Islands, Western Mediterranean.

INTRODUCCIÓN

A principios del mes de marzo de 1997, coincidiendo con uno de los muestreos

correspondientes al seguimiento de la calidad del agua y de los sedimentos del Port d'Andratx (Mallorca), se detectó la presencia de una marea, de color rojizo marrón, producida por el dinoflagelado *Alexandrium minutum*; la proliferación estaba localizada en la parte más interna del puerto y se había originado durante la semana anterior al muestreo. La entrada de una fuerte depresión provocó la rápida dispersión de la marea, por lo que la información recogida se limita a un único día de muestreo.

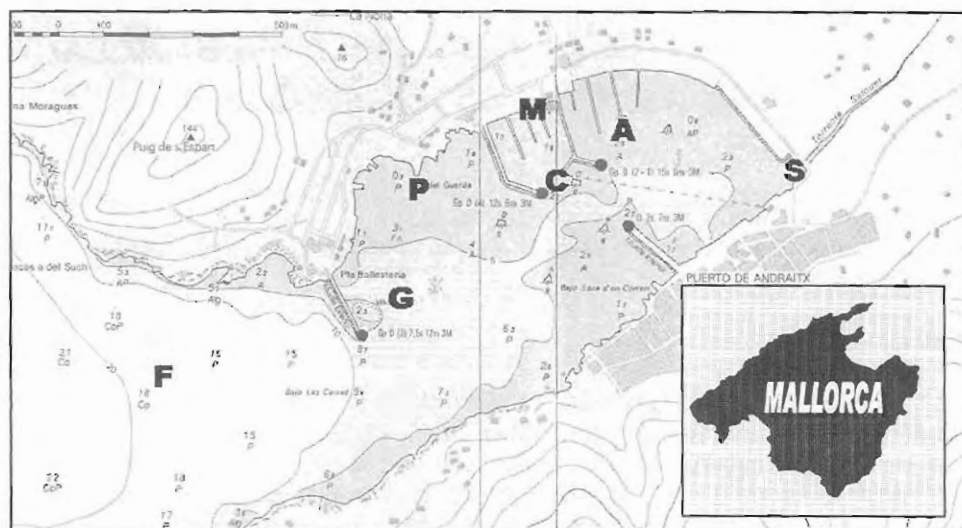


Figura 1.- El Port d'Andratx (Mallorca), donde tuvo lugar durante la proliferación de *Alexandrium minutum* objeto de esta comunicación. Se indican las estaciones de muestreo utilizadas en el seguimiento de la zona.

La presencia del dinoflagelado tóxico *Alexandrium minutum* en aguas de Baleares no es un fenómeno nuevo, ya que ha sido encontrado de forma recurrente desde que se detectó por primera vez, meses de abril y mayo de 1995, en el Puerto de Palma (Forteza *et al.*, 1998). Como referencia más próxima se debe citar la proliferación ocurrida, también en el Puerto de Palma, durante el mes de marzo de 1999, cuyo seguimiento llevó a cabo el mismo equipo que ha realizado este estudio.

El objetivo de esta comunicación es presentar la información relativa a las condiciones físicas, químicas y fitoplancton, correspondiente a los diferentes puntos de muestreo del área estudiada y definir las características diferenciales de la zona donde se localizó la proliferación de *Alexandrium minutum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo se llevó a cabo el día 6 de marzo de 1997, en un transecto con seis puntos de muestreo; tres de ellos (S, A y C) ubicados en la zona interior del Port, la parte que corresponde estrictamente a la zona portuaria, otros dos (P y G) situados próximos a la bocana, y el último (F) localizado en el exterior (figura 1). Un séptimo punto de muestreo (M), ubicado en el interior de las instalaciones del Club de Vela, habitualmente utilizado durante el seguimiento, no se ha considerado en esta comunicación. En cada uno de los puntos se obtuvieron perfiles verticales de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto, con sensores específicos de la casa WTW, y de la radiación, mediante un sensor Li-193 SA conectado a un DattaLogger Li-1000 de la casa Li-Cor. Asimismo se determinó la turbidez del agua, con un aparato Hach 2100P Turbidímetro.

Las muestras para los análisis de nutrientes (nitrato, nitrito, fósforo reactivo soluble y silicato reactivo soluble), para la determinación de la alcalinidad y para los estudios relativos al fitoplancton (determinaciones cualitativas y cuantitativas, clorofila a, producción primaria y actividad respiratoria), se tomaron con una bomba peristáltica; en superficie y cerca del fondo, para las cuatro estaciones más interiores y menos profundas (S, 1.9 m; A, 3.5 m; C, 3.0 m; P, 2.5 m), y de tres (0, 5 y 8 metros) y cuatro niveles (0, 5, 10 y 17 metros), respectivamente, para las dos estaciones más exteriores y más profundas (G, 8 m y F, 17 m).

El estudio y recuento del fitoplancton se realizó con un microscopio invertido siguiendo la técnica de Utermöhl (1931). Se calculó la concentración de clorofila a, correspondiente a tres fracciones del fitoplancton (< 5 m m, 5-20 m m, > 20 m m), con las ecuaciones propuestas por Jeffrey & Humphrey (1975). También la producción primaria se determinó sobre tres fracciones del fitoplancton (< 2m m, 2-20 m m, > 20 m m), de acuerdo con el método de Steemann-Nielsen (1952), descrito en Parsons et al. (1984). La actividad respiratoria (ETS), se midió con la técnica descrita por Packard (1971) y modificada por Packard & Williams (1981).

Para el análisis de la alcalinidad se utilizó la titulación de Gran (Talling, 1973), los nutrientes fueron analizados con un Technicon Autoanalyzer II.

RESULTADOS

Un primer conjunto de variables: temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación, mostró pequeñas diferencias entre las estaciones situadas en los dos extremos del transecto (tabla 1). Los valores máximos de todos estos parámetros se determinaron en la estación S, ubicada en la parte más interior del Port, y los mínimos en la estación F, ubicada en el exterior. Para la temperatura, el oxígeno y el porcentaje de saturación se puede hablar incluso de un suave gradiente a lo largo del transecto.

El análisis de la concentración de clorofila a y de la producción primaria del fitoplancton por fracciones (tabla 2), muestra de forma evidente la segregación entre las estaciones S, A y C, y el resto de puntos de muestreo. En las tres estaciones más internas, la comunidad fitoplanctónica se hallaba dominada por el microplancton, mientras que en las otras cuatro estaciones la fracción dominante correspondía al picoplancton.

Estación	Nivel m	T °C	Salinidad g kg	O ₂ mg/l	O ₂ %	Sol T mg/l	Sol V %	Na µM	PRS µM	SiRS µM	Turbidez NTU	n m
S	0,0	16,4	37,7	7,5	93	16,25	70,71%	0,03	0,07	1,54	7,00	1,13
	1,9	16,2	37,8	7,9	95	11,02	46,32%	0,00	0,09	1,76	6,81	
A	0,0	16,2	37,8	6,9	88	7,46	30,05%	0,02	0,06	1,54	1,40	0,43
	3,5	15,8	37,8	7,1	87	6,76	27,54%	0,00	0,06	1,22	2,64	
C	0,0	15,9	37,9	6,8	83	5,64	23,16%	0,22	0,07	1,69	1,50	0,34
	3,0	15,7	37,8	7,1	86	5,35	19,08%	0,05	0,07	1,20	1,02	
P	0,0	16,2	37,8	7,4	92	4,99	16,33%	0,06	0,06	0,88	0,89	0,34
	2,5	15,9	37,9	7,3	90	5,17	17,99%	0,02	0,05	0,85	0,72	
G	0,0	15,6	37,8	6,9	84	5,15	23,69%	0,04	0,04	0,92	0,70	0,16
	5,0	14,9	37,9	6,7	81	5,51	15,68%	0,03	0,04	0,76	0,57	
	9,0	14,9	37,8	6,8	81	4,41	12,37%	0,03	0,04	0,83	0,70	
F	0,0	15,5	37,4	7,0	85	2,12	19,25%	0,04	0,04	0,92	0,51	0,08
	5,0	15,2	37,4	6,8	81	2,11	11,99%	0,02	0,03	0,92	0,63	
	10,0	14,9	37,6	6,9	83	1,78	19,33%	0,02	0,04	0,88	0,37	
	17,5	14,8	37,6	6,7	80	2,17	30,65%	0,03	0,02	0,87	0,72	

Tabla 1.- Valores de las variables físico-químicas determinadas en las diferentes estaciones de muestreo ubicadas a lo largo de la radial interior-exterior del Port d'Andratx.

Nitrato y fósforo reactivo soluble presentaron valores muy bajos, prácticamente en el límite de detección del método, y uniformes para toda el área estudiada. Mientras que las concentraciones de silicato reactivo soluble separaban claramente una zona interior, estaciones S, A y C, con valores de silicato muy superiores, prácticamente el doble, de los determinados en el resto de puntos de muestreo.

Sólidos en suspensión, turbidez y coeficiente vertical de extinción de la luz, mostraron un marcado gradiente a lo largo del transecto; los máximos de todos estos parámetros se registraron en la estación más interior y presentaron una progresiva disminución en las sucesivas estaciones, hasta alcanzar los valores mínimos en el punto de muestreo ubicado en el exterior. En este contexto hay que destacar también las elevadas concentraciones de sólidos volátiles determinados en la estación S, superiores al 70% de los sólidos totales en el nivel superficial, y al 45% en el fondo; para el resto de estaciones, los porcentajes de sólidos volátiles fueron sensiblemente inferiores.

La mayoría de las variables biológicas analizadas (tabla 2 y figura 2) inciden en la existencia de un fuerte gradiente a lo largo del transecto, tanto en la biomasa del fitoplancton, estimada como concentración de clorofila a y número total de células, como en su actividad, estimada a partir de la producción primaria y del ETS. Los valores máximos se determinaron en los puntos de muestreo más interiores del puerto, principalmente en la estación S, y fueron disminuyendo de forma progresiva hacia el exterior.

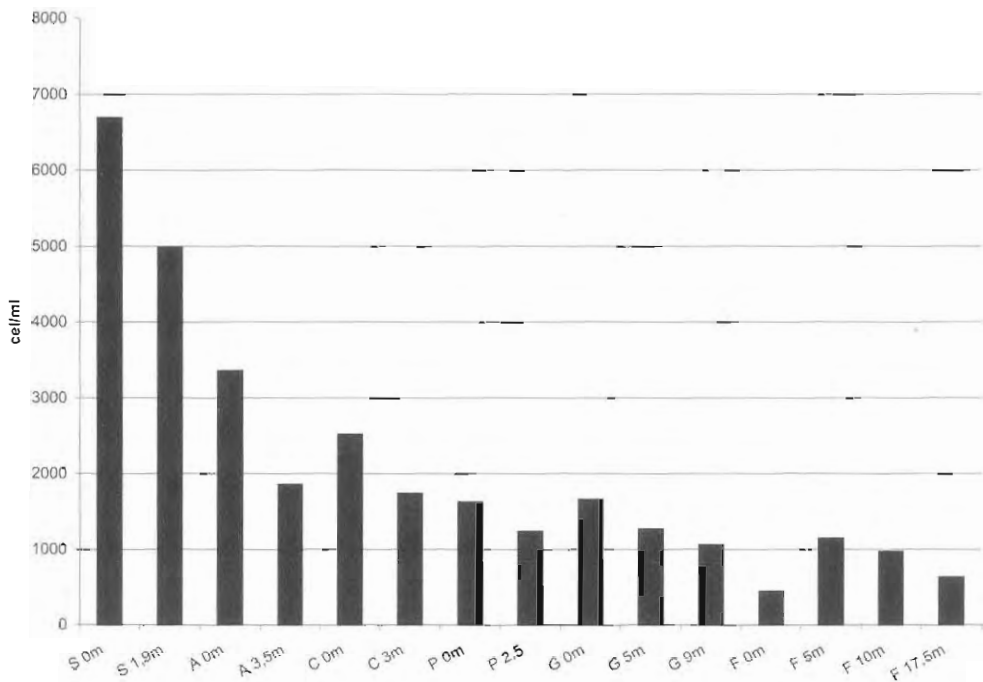


Figura 2.- Densidad del fitopláncton en el Port d'Andratx durante la proliferación de *Alexandrium minutum*, en el mes de marzo de 1997

Estación	Nivel m	Chla mg m ⁻³	<5µm	Chla% 5-20µm	>20µm	Prod. Prim. mgC m ⁻³ h ⁻¹	<2µm	Prod. Prim.% 2-20µm	>20µm	ETS 20 ^o µO ₂ d ⁻¹ r ⁻¹	Fitopl. cél ml ⁻¹
S	0,0	3,39	1,69	0,84	97,35	36,22	4,30	5,95	89,75	1713,83	6692
	1,9	0,67	1,73	0,58	97,98	17,94	6,71	9,44	83,85	634,47	4938
A	0,0	1,08	2,99	1,71	95,30	10,91	9,68	17,24	73,08	453,73	3357
	3,5	0,50	-	-	-	6,54	-	-	38,49	191,59	1855
C	0,0	0,31	4,32	2,16	95,53	2,79	39,18	19,95	48,86	133,13	2519
	3,0	0,22	-	-	-	1,76	66,82	12,14	21,04	70,99	1740
P	0,0	0,28	80,46	9,77	9,77	-	-	-	-	-	1625
	2,5	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	1239
G	0,0	-	100,00	0,00	0,00	1,12	86,82	13,18	0,00	13,81	1659
	5,0	0,08	-	-	-	1,10	73,59	19,03	7,38	6,99	1268
	9,0	0,03	77,78	11,11	11,11	0,83	82,82	11,23	5,94	12,83	1059
F	0,0	0,17	100,00	0,00	0,00	0,91	85,78	11,71	2,51	13,08	445
	5,0	0,11	-	-	-	0,97	81,37	14,56	4,07	15,09	1146
	10,0	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	970
	17,5	0,08	75,00	25,00	0,00	0,90	75,73	15,34	8,93	3,48	630

Tabla 2.- Valores de las variables biológicas determinadas en las diferentes estaciones de muestreo ubicadas a lo largo de la radial interior-externa del Port d'Andratx.

El análisis de la concentración de clorofila a y de la producción primaria del fitoplancton por fracciones (tabla 2), muestra de forma evidente la segregación entre las estaciones S, A y C, y el resto de puntos de muestreo. En las tres estaciones más internas, la comunidad fitoplanctónica se hallaba dominada por el microplancton, mientras que en las otras cuatro estaciones la fracción dominante correspondía al picoplancton.

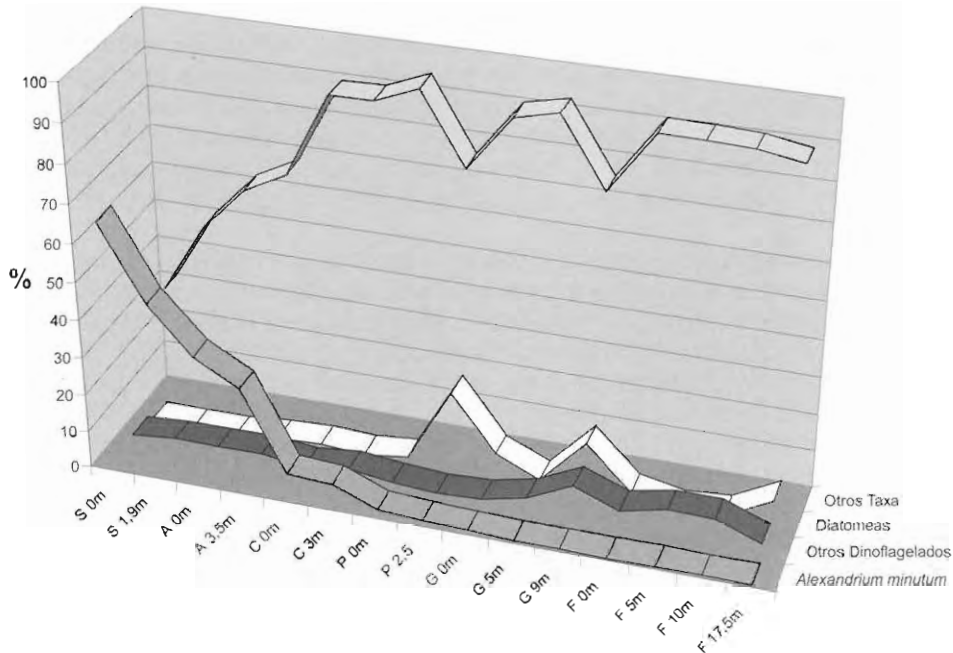


Figura 3.- Abundancia relativa de *Alexandrium minutum* y de los otros grupos de algas presentes en el fitoplancton del Port d'Andratx en el mes de marzo de 1997.

La composición cualitativa del fitoplancton varió a lo largo del transecto estudiado (figura 3). *Alexandrium minutum* fue la especie dominante en superficie de la estación S, con *Prorocentrum gibbosum*, *Protoperdinium* sp., *Scropsiella* sp. y *Gonyaulax spinifera* como principales especies acompañantes. *Alexandrium minutum* también alcanzó porcentajes elevados, pero progresivamente decrecientes, en el nivel profundo de la estación S y en los dos niveles de la estación A. Otros dinoflagelados presentaron un pequeño desarrollo en el fondo de la estación G, mayormente organismos inferiores a 20 μm y pertenecientes a los géneros *Scropsiella*, *Gyrodinium* y *Gymnodinium*. Los máximos de diatomeas se dieron en los niveles más profundos de la estación G, en general organismos de pequeño tamaño (nanodiatomeas) y estación P; *Diatoma elongatum*, *Licmophora* sp. y *Cylindrotheca closterium*. Taxones pertenecientes a otros grupos de algas, en general nanoflagelados como *Crysochromulina* spp. y *Rhodomonas lacustris*, dominaron la comunidad fitoplanctónica de la mayor parte del área estudiada.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos se deduce que la marea de *Alexandrium minutum* fue un episodio muy localizado en el espacio y puesto que su duración no superó los ocho días, podemos hablar también de una clara localización en el tiempo.

La hidrodinámica del área estudiada puede utilizarse para justificar, al menos en parte, la localización precisa de la marea en la parte más interna del puerto, se trata de una zona parcialmente cerrada y por tanto con una baja tasa de renovación del agua y una cierta estabilidad, principalmente durante los meses de primavera y verano cuando la frecuencia de temporales es menor. Las diferencias de temperatura observadas muestran el efecto de estancamiento, que propicia un más rápido calentamiento del agua de la zona donde se localiza la proliferación de *Alexandrium minutum*.

La ubicación de la proliferación de *Alexandrium minutum* quedaba definida visualmente por la presencia de la mancha en la parte más interna del puerto, pero el análisis de diferentes variables físicas, químicas y biológicas nos permitió delimitar de forma mucho más precisa la zona de máxima actividad de *Alexandrium minutum*. Los parámetros sólidos en suspensión, turbidez del agua y coeficiente de extinción de la luz, son los mejores indicadores de las variaciones de la biomasa y de la actividad del fitoplancton a lo largo del transecto estudiado.

Aunque carecemos de información sobre las condiciones específicas que originaron el crecimiento masivo del dinoflagelado, a partir de datos recogidos a lo largo de diferentes ciclos anuales en el área estudiada del Port d'Andratx, sabemos que en el punto de muestreo donde se encontró el máximo desarrollo de *Alexandrium minutum* se producen, de forma puntual pero con una cierta recurrencia, aportes de nutrientes a través de un pequeño curso de agua que drena directamente en dicho punto (figura 1). Como ya se ha comentado, en el momento en el que se realizó el muestreo, las concentraciones de nitrato y de fósforo estaban en el límite de detección del método utilizado. Una posible explicación a estos bajos valores estaría en el elevado consumo por el fitoplancton en las primeras fases de su desarrollo, y en su almacenamiento como biomasa fitoplanctónica a lo largo de los días que duró la proliferación.

El estudio de la clorofila a y de la producción primaria por fracciones ha aportado una valiosa información sobre los cambios en la composición por tamaños de las comunidades fitoplanctónicas a lo largo del transecto interior-externo del puerto. Estos cambios indican la existencia de dos tipos de estrategias; en la zona de la proliferación dominan las formas de

mayor tamaño, dinoflagelados, los cuales se ven favorecidos por las condiciones de elevada estabilidad del agua. En el resto de la zona estudiada el dominio corresponde a pequeños flagelados, organismos con una elevada tasa de multiplicación y que caracterizan la comunidad fitoplanctónica de esta zona durante la mayor parte del ciclo anual.

Como apuntan otros autores, Camp et al. en este mismo volumen, estos episodios, cada vez más frecuentes en las costas del Mediterráneo Occidental, van ligados a la creciente antropización del litoral. La compartimentación de estas áreas, retardando los flujos y posibilitando el acúmulo de nutrientes y materia orgánica favorecen el crecimiento de dinoflagelados, cuya evolución les ha llevado a ser oportunistas cuando se dan estas condiciones Margalef (1998).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Maxi Delgado por su ayuda en la identificación de *Alexandrium minutum* y al Dr. Enrique Descals por la revisión de la parte del texto en inglés. Este trabajo ha sido posible gracias a un convenio de colaboración del Departamento de Biología (Área de Ecología) de la Universitat de les Illes Balears con el Club de Vela del Port d'Andratx para realizar un seguimiento de la calidad de las aguas y de los sedimentos en esta zona portuaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Forteza, V., Quetglas, G., Delgado, M., Reyero, M.I., Fraga, C., Franco, J.M. and Cacho, E. 1998. Toxic *Alexandrium minutum* bloom in Palma de Mallorca harbour (Balearic Islands, Western Mediterranean). In: Reguera, B., Blanco, J. Fernández, M.L. and Wyatt, T. (eds.) Harmful Algae Xunta de Galicia, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Jeffrey, S.W. and Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, E2 and E1 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167: 191-194.
- Margalef, R. 1998. Red tides and Ciguatera as successful ways in the evolution and survival of an admirable old phylum. In: Reguera, B., Blanco, J. Fernández, M.L. and Wyatt, T. (eds.) Harmful Algae Xunta de Galicia, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Packard, T.T. 1971. The measurement of respiratory electron transport activity in marine plankton. *J. Marine Res.* 29: 235-244.
- Packard, T.T. and Williams, P.J. le B. 1981. Rates of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface seawater from the Northwest Atlantic. *Oceanologica Acta* 4: 351-358.
- Parsons, T.R., Mayta, Y. and Lalli, C.M. 1984. A manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Great Britain. 173 pp.
- Steemann-Nielsen, E. 1952. The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Int. Exp. Mer.* 18: 117-140.
- Talling, J.F. 1973. The application of some electrochemical methods to the measurement of photosynthesis and respiration in fresh waters. *Freshwater Biology* 3. 335-363.

ACTUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PROLIFERACIONES DEL DINOFLAGELADO *Alexandrium taylori* (BALECH).

Esther Garcés, Mercedes Masó, Maximino Delgado, Magda Vila and Jordi Camp
Institut de Ciències del Mar. P/Joan de Borbo, s/n, 08039 Barcelona, SPAIN

INTRODUCCIÓN

En la IV Reunión Ibérica se presentó la información de las proliferaciones densas de un dinoflagelado del género *Alexandrium* subgénero *Gessnerium* y se comentó el interés de profundizar en su ecología. Lo poco que se conocía de este dinoflagelado era que provocaba proliferaciones masivas en La Fosca (Costa Brava) durante los meses de verano, pensando que era un fenómeno bastante local pues no había conocimiento de presencia en otros lugares de la Costa Catalana ni del Mar Mediterráneo. Estudios más profundos del dinoflagelado se emprendieron por varias razones, por una parte por el interés de un organismo perteneciente al género *Alexandrium*. Otra razón, fue que el fenómeno causaba relativos problemas a la Administración, pues la población asociaba la discoloración con descargas de agua residual y el área es un punto importante de turismo. El problema indujo a un control intensivo de la calidad del agua. Así, el muestreo para el estudio de las distribuciones de *A. taylori* se adecuó para obtener información a pequeña, mediana y gran escala tanto temporal como espacial. Parte de las medidas obtenidas pertenecen al programa de control y seguimiento de la calidad de las aguas de baño llevado a cabo por la Junta de Sanejament del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya. Nuestros estudios comprenden ahora cinco años de monitoreo.

QUÉ CONOCEMOS AHORA DE *Alexandrium taylori*.

En cuanto a taxonomía, se expuso las diferencias entre las poblaciones de *A. taylori* de la costa Catalana con la descripción original del organismo (Balech, 1994). Las diferencias principales en las placas 1',6' y Sa, así como la localización del poro ventral y las líneas de conexión con las placas adyacentes se consideraron en el rango de la variabilidad morfológica de la especie (Delgado *et al.*, 1997).

En cuanto a toxicidad, se conoce que no hay toxicidad por PSP (por HPLC) y no hay resultados positivos en el bioensayo de ratón aunque se han encontrado respuestas positivas en el test de *Artemia salina* (Yan, *commun. pers.*) y en el ensayo de bioluminiscencia Microtox (Giacobbe, *commun. pers.*).

Los primeros estudios en el campo contribuyeron al conocimiento del ciclo de vida de *A. taylori* (Garcés *et al.*, 1998) y de las estrategias de vida de *A. taylori* (Garcés, 1998) como un

punto importante para entender la dinámica de la población. Además de una célula vegetativa planctónica *A. taylori* presenta dos formas bentónicas, los quistes temporales y los quistes de resistencia. Los quistes temporales son un estado de restricción temporal producidos por ecdisi de las células vegetativas que se forman tanto en muestras naturales como en cultivos de laboratorio y pueden dividirse para dar células móviles. Los quistes de resistencia tienen una pared más gruesa que los que los quistes temporales y tienen un cuerpo de acumulación rojo. Se han observado gametos y planozigotos en cultivos de laboratorio. Información más detallada sobre morfología de las fases sexuales de *A. taylori* se encuentra en el trabajo de Giacobbe *et. al* (1998).

En ciclos de 24 horas se ha observado que *A. taylori* presenta una migración vertical diaria. Las concentraciones de células vegetativas durante ciclos diarios presentan máximos de 10^6 células l^{-1} en superficie de la columna de agua durante el mediodía-tarde y disminuyen durante el anochecer, para encontrar toda la población cerca del fondo durante la noche en forma de agregados. A la vez se ha observado un ciclo en la formación de quistes temporales. La mayoría de las células vegetativas pierden su movilidad al desprenderse de la teca y el flagelo para formar quistes temporales que sedimentan durante la tarde. El número de quistes temporales en la columna de agua aumenta durante la tarde y noche. Los quistes temporales producen células vegetativas móviles a al mañana siguiente. Las células vegetativas presentan

	Presencia	10^3-10^4	$>10^5$
COSTA BRAVA			
Empuriabrava			
Can Comes			
de la Gola			
St Pere Pescador			
Moll Grec			
Riells			
Montgo			
Estartit			
de la Gola			
Gran de Pals			
del Grau			
Sa Riera			
Fonda			
Aigua Brava			
Llafranc			
Estreta			
Castell			
La Fosca			
Margarida			
Gran			
St. Antoni			
Torre Valentina			
St Pol			
St Feliu			

	Presencia	10^3-10^4	$>10^5$
EIVISSA			
Cala Vedella			
Bassa			
Tarida			
Portinax			
MALLORCA			
St Elm			
Camp de Mar			
Peguera			
Santa Ponça			
Ses Pedretes			
MENORCA			
Galdana			
Porter			

Tabla 1. Concentraciones celulares de *Alexandrium taylori* en las diferentes localidades muestreadas desde el año 1995.

un período de síntesis de DNA (ciclo celular) por la noche y un período preferente de división al amanecer. Gracias al conocimiento del ciclo celular se puede estimar la tasa de división in situ de las células vegetativas que es 0.4-0.5 día⁻¹. La tasa de división in situ mínima estimada mediante la división celular de los quistes temporales es de 0.14 día⁻¹. El crecimiento de la población es el resultado de la división de las células vegetativas y de la germinación y división de los quistes temporales. Hay quistes temporales que tardan más de un día en germinar. Así, los quistes temporales en el sedimento pueden actuar como una reserva de la población a corto término. Frente a perturbaciones pequeñas o poco frecuentes (viento, mal tiempo) con movimiento del agua que puede dispersar la población de células vegetativas, el restablecimiento de tiempo calmado permite la rápida recuperación de la población vía división y germinación de los quistes temporales, y crecimiento de las células vegetativas.

En cuanto a la distribución espacial de *A. taylori*, desde que se realiza el muestreo en la Costa Catalana se han encontrado presencias del organismo en otras localidades a parte de La Fosca. *A. taylori* muestra una amplia presencia en toda la Costa Brava durante los meses de verano (fig. 1). A lo largo de los años de muestreo (desde 1995 a 1998) se han observado densidades de 10⁵ células l⁻¹ en varias localidades, como Gran de Pals y se llegan a concentraciones máximas celulares de 10⁶ células l⁻¹ en localidades como St. Pol. El mantenimiento de elevadas concentraciones (10⁶ células l⁻¹) durante el mes de agosto (temperaturas > 24 °C) es una característica de la Fosca. Las presencias de *A. taylori* en la mayoría de localidades se dan de una manera recurrente cada año en los meses de verano.

Las distribuciones espaciales de *A. taylori* en las islas Baleares en el verano de 1997 respondían a la necesidad de conocer las localidades de proliferación del organismo en las islas y caracterizar estas áreas. La preocupación por parte del ayuntamiento y entidades sanitarias del gobierno balear pensando que el fenómeno fuera debido a vertidos incontrolados se ha dado tanto en Mallorca y Ibiza, de la misma manera que se dio en La Fosca. En Cala Tarida (Ibiza) y Cala en Porter (Menorca) el registro de coloraciones de las aguas según memoria popular indicaban una antigüedad de 10 años, pero no fue hasta el año 1997 que se describió como una proliferación de *A. taylori*. Sin embargo, en Mallorca ya se habían presentado al ayuntamiento de Calvià varios informes sobre las proliferaciones de *A. taylori* por parte de Forteza y Quetglas: "Discoloració de les aigües a les platges de Peguera, Calvià, a l'estiu de 1995: identificació de l'organisme responsable i proposta d'actuació" y "Discoloració de les aigües a les platges de Peguera, Calvià, a l'estiu de 1996".

En el Mediterráneo, se han detectado proliferaciones masivas de *A. taylori* en una área poco profunda de la costa de Sicilia (bahía de Santa Panagia) (Giacobbe, 1999). En la costa mediterránea francesa (Laussus, P. comm. per.) y en Grecia (National Centre of Marine Research y Ignatiades, L. comm. per.) no se han registrado presencias. En el Atlántico francés se han detectado proliferaciones en la bahía de Arcachon en agosto de 1985 de donde se describió la especie y al sur del estuario del Loire en 1995 y 1997 (Laussus, P. comm. per.).

Las playas donde se dan las proliferaciones masivas de *A. taylori* son de características similares y nos dan idea de las condiciones ambientales adecuadas para el organismo. Por esa razón se estudió con cierto detalle la playa de La Fosca como un lugar tipo. El parámetro que mejor distinguiría La Fosca de las demás playas de la Costa Brava sería la temperatura. El diferencial positivo significativo en los valores de temperatura al principio de verano respecto a las playas de su entorno indican un mayor confinamiento del agua (baja renovación) en La Fosca. En cuanto a otros parámetros como la salinidad y los nutrientes, son los característicos para la Costa Brava y La Fosca se caracteriza por valores bajos (Garcés, 1998) ya que no hay grandes descargas de agua dulce.

Con el patrón de distribución de *A. taylori* en diferentes escalas espacio-temporales y al mismo tiempos el conocimiento del ciclo de vida y las estrategias biológicas del organismo se utilizaron para proponer la hipótesis de la dinámica de la proliferación (inicio, mantenimiento y final) (Garcés, 1998). A la vez podemos explicar la recurrencia de las proliferaciones con los quistes de resistencia, pues una vez ha habido presencia del organismo en alguna zona es fácil que el fenómeno vuelva a repetirse. La discusión está en el hecho de encontrar nuevas zonas en que aparece *A. taylori*. Puede que estemos observando cada vez más el fenómeno de proliferaciones de *A. taylori* o puede que este expandiéndose la distribución del organismo.

Agradecimientos: Los autores quieren agradecer al personal de muestreo de la Junta de Sanejament, Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya por su cooperación, especialmente a M. de Torres, C. Sanvicente y J.Vilanova por facilitar el programa de campo. Agradecemos a S. Fraga (Centro Oceanográfico de Vigo) por los cultivos de *A. taylori* y a L. Cros por el mantenimiento de la colección de cultivos. Este estudio se ha llevado a cabo con una beca predoctoral CIRIT FI/948003 y el convenio con el Department de Medi Ambient, Junta de Sanejament de la Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFÍA

- Balech, E. (1994) Three new species of the genus *Alexandrium* (*Dinoflagellata*). *Trans Am Microsc Soc* 113, 216-220.
- Delgado, M.,Garcés, E.,Vila, M. and Camp, J. (1997) Morphological variability in three populations of the dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *J. Plankton Res.* 19, 749-757.
- Garcés, E. (1998) Proliferacions de dinoflagel·lades a la Costa Catalana: estudi del creixement in situ i adaptacions per al manteniment. PhD Thesis. Universitat de Barcelona.
- Garcés, E.,Delgado, M.,Maso, M. and Camp, J. (1998) Life history and in situ growth rates of *Alexandrium taylori* (*Dinophyceae*, *Pyrrophyta*). *J. Phycol.* 34, 880-887.
- Giacobbe, M. (1999) The life history of *Alexandrium taylori* (*Dinophyceae*). *J. Phycol.*, (in press)

DESCUBRIMIENTO DE UN NUEVO PARÁSITO DE LA DINOFLAGELADA TÓXICA *Alexandrium catenella*: APLICACIÓN EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LAS PROLIFERACIONES NOCIVAS DE FITOPLANCTON

M. Delgado. Instituto de Ciencias del Mar. P. Joan de Borbó s/n. 08039 Barcelona.

En el seguimiento del fitoplancton tóxico de Cataluña se detectó el verano pasado (Junio 1998) una marea roja de la dinoflagelada *Alexandrium catenella* en el puerto de Tarragona (ver Vila *et al.*, en esta Reunión). En el muestreo realizado 10 días después las aguas no presentaron coloración y la concentración de células de *A. catenella* muy baja, aunque fueron abundantes las tecas vacías de la dinoflagelada y se observaron numerosos cuerpos esféricos de 30-40 μm de diámetro (diferentes de los quistes de resistencia de *A. catenella*, que son alargados, de los cuales también se observaron escasos ejemplares). Después de la incubación de agua sin fijar se vió que de los cuerpos esféricos (de color oscuro cuando están maduros, llamados en adelante quistes parásitos) salían numerosos pequeños flagelados (entre 100 y 400 flagelados por cuerpo) los cuales a su vez infectaban otras células de *A. catenella* (formando dentro de la teca de la dinoflagelada un cuerpo esférico) cíclicamente. Desde entonces se mantiene en cultivo el parásito en el ICM de Barcelona, mediante la adición de cultivo nuevo de *A. catenella* a corto intervalo (semanal). En esta comunicación se presenta la información preliminar del parásito, la cual se elaborará posteriormente para su publicación en detalle.

Descripción del parásito.- La fase móvil (pequeños flagelados) no está pigmentada, tan solo posee una porción oscura de su cuerpo. El cuerpo de los flagelados parásitos es ovoide, de unos 3 μm de longitud, y tiene 2 flagelos bien distintos: uno corto (de 2 μm de longitud aproximada) y el otro largo (de 8 μm de longitud aproximada). El flagelo largo presenta pelos a lo largo de toda su extensión mientras que el corto es desnudo y tiene un extremo agudo. Los quistes del parásito son esféricos, 30-40 μm de diámetro, de color oscuro-negro cuando están repletos de flagelados, con protuberancias muy pequeñas en la superficie externa y presentan un nº variable de poros (entre 2 y 7) de 2 μm de diámetro. Algunas tecas del dinoflagelado, o partes de ellas, permanecen unidas a los quistes del parásito recientemente formados.

Ciclo de infección.- El flagelado parásito se fija a la cubierta de las dinoflageladas a nivel del cingulum (y se suponen que penetran dentro, al menos una parte). Las células infectadas paran su movimiento y en unas cuantas horas se comienzan a apreciar áreas más claras en su citoplasma (generalmente una pero en ocasiones varias, las cuales se interpretan como infecciones múltiples) que incrementan su extensión hasta ocupar todo el citoplasma de la dinoflagelada 24 horas después de la infección, con la pared del quiste ya formada. A las 48 horas de la infección el quiste del parásito es de color muy oscuro y contiene en su interior numerosos flagelados (entre 100 y 400). El color oscuro del quiste es debido a los flagelados

de su interior, ya que la cubierta es transparente. En este momento (48 horas después de la infección) los parásitos ya se consideran maduros y puede germinar. Pocos minutos antes de la germinación (provocada por la adicción de una pequeña cantidad de agua dulce) los flagelados comienzan a moverse dentro del quiste y más tarde comienzan a salir por los poros de la cubierta (ocuidos inicialmente por una membrana). Una vez los pequeños flagelados han salido al exterior del quiste se mueven con el flagelo más largo dirigido hacia adelante y pocos segundos después su movimiento lineal se combina con giros rápidos sobre sí mismos. Una vez todos (o casi todos) los flagelados han salido al exterior queda el quiste vacío y con una gota (similar a lipídica) en su interior. Si no logran infectar una célula de dinoflagelada los flagelados parásitos mueren en pocos minutos.

Las células de dinoflageladas inmóviles (como quistes temporales o quistes de resistencia) son resistentes a la infección por el parásito.

Efectividad de las infecciones.- En el medio natural se ha visto que el parásito no siempre es capaz de terminar una proliferación. Así, mientras que en el primer desarrollo de *A. catenella* en el puerto de Tarragona podría considerarse al parásito como responsable de la caída de la proliferación, en un rebrote que hubo de la misma especie unas semanas más tarde no hubo constancia de la acción del parásito. Además en el puerto de Barcelona, durante el mismo verano, y también con *A. catenella* como agente causante de la proliferación, se vieron algunos quistes del parásito (prueba de que el parásito también estuvo presente), pero no se detectó la presencia del parásito ni en la fase de caída de las concentraciones celulares de la dinoflagelada ni en un rebrote secundario que hubo. El parásito es capaz de infectar multitud de especies de dinoflageladas experimentalmente (aunque con eficiencia variable, que se acercó al 100 % en algunos cultivos de *A. catenella* y *A. minutum*), pero no otros grupos fitoplanctónicos.

Especies infectadas experimentalmente:

A. catenella, población natural y cultivos de 12 clones.
A. minutum, cultivos.
A. affine, cultivos.
S. trochoidea, cultivo y población natural (baja eficiencia).
G. sanguineum, cultivo (baja eficiencia).
Protoperdinium bipes, población natural.

Especies resistentes a la infección:

A. taylori, cultivo aislado de La Fosca.
G. corsicum, cultivo aislado de Alfacs.
Coscinodiscus cf. *radiatus*, cultivo.
Thalassiosira weissflogii, cultivo.
Ch. pseudocurvisetus, cultivo.
Ch. lorenzianus, cultivo.
Cryptomonas sp., cultivo.
Halosphaera viridis, cultivo.
Isochrysis galbana, cultivo.
Heterosigma akashiwo, cultivo.
Chlorella sp., cultivo.
Proocentrum micans, población natural (baja eficiencia).
Dinophysis sacculus, población natural (baja eficiencia).

Trabajo en curso.-1) Descripción taxonómica del parásito con microscopía electrónica de barrido y transmisión (involucrados Prof. Malte Elbrächter y Dr. Michael Schweikert, de Alemania). 2) Dinámica de las infecciones en cultivos de dinoflagelados y poblaciones naturales encerradas en recipientes y mantenidas en laboratorio. 3) Posibilidad de que este parásito (u otra especie similar) haya sido erróneamente confundido con etapas sexuales en el género *Dinophysis*.

FORMACIÓN DE UNA CORRIENTE S-N CERCA DE LA COSTA W DE LA PENINSULA IBERICA AL FIN DEL VERANO. RELACIÓN CON LOS “BLOOMS” DE *G. catenatum* DE LAS RÍAS GALLEGAS.

I. Sordo, J. A. Triñanes, J. Varela, J. Arias

Lab. Sistemas. Dept. Electrónica e Computación. Facultade de Física.

Universidade de Santiago de Compostela. Campus Sur. 15706. Santiago de Compostela

RESUMEN

La aparición de “blooms” de *Gymnodinium catenatum* en las rías gallegas ha sido una constante desde mediados de la década de los 80, coincidiendo habitualmente con la época del relajamiento de upwelling. Las posibles causas de los mismos citadas en la literatura son las germinación de quistes de resistencia de esta especie y la advección de poblaciones desde aguas oceánicas, apiladas contra la costa con el cambio de vientos norte a vientos sur.

Presentamos el estudio del relajamiento del afloramiento del año 1995 a partir de imágenes de la temperatura superficial del mar (SST), coincidente con un “bloom” de *G. catenatum* en las rías. Tras 10 días de fuerte afloramiento, existe un cambio a vientos de componente sur, lo que da lugar al apilamiento de las aguas de la plataforma menos profunda, y al establecimiento en los 15-25 km cerca de costa de una corriente sur-norte. Sin embargo, sobre el resto de la plataforma, y sobre el borde de la misma, la estructura del afloramiento aún se hace patente, existiendo todavía una corriente norte-sur. De este modo, si nuestra hipótesis es correcta, el agua que se apila contra las rías a principios de septiembre del 95 serían aguas costeras proveniente de latitudes inferiores, la cual podría traer consigo poblaciones de *Gymnodinium catenatum*, si éstas existiesen en dichas latitudes.

INTRODUCCION

Desde el año 1976, “blooms” de *G. catenatum* han producido toxinas PSP en los mejillones cultivados en las rías gallegas. A partir de esta fecha, “blooms” de este dinoflagelado han obligado al cierre de las bateas de cultivo de mejillón durante varios meses al año, lo que produce importantes pérdidas económicas para el sector acuicultor, de gran importancia para la economía gallega. La aparición de dichos “blooms” parece estar relacionada con condiciones ambientales de apilamiento, si bien la causa de los mismos no está totalmente clara. La aparición de esta especie durante sólo unos meses al año, estando ausente los meses restantes, puede ser debida fundamentalmente a dos motivos: la resuspensión de quistes de resistencia en el área de aparición o la advección de poblaciones inóculo desde áreas próximas.

La advección de poblaciones inóculo estará relacionada con las estructuras oceanográficas de la zona en el periodo de aparición de los "blooms", habitualmente en el relajamiento del afloramiento estival. Datos procedentes de los sensores AVHRR de los satélite NOAA para el cálculo de la temperatura superficial de mar han sido puestos en común con datos de viento, para el periodo de los primeros días de septiembre de 1995. A principios de este mes el inicio de un "bloom" de *G. catenatum* en las rías gallegas fue detectado por el "monitoring" realizado por el Centro para o Control da Calidade do Medio Mariño de Vilaxoán en nuestras costas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos considerados en el presente estudio son básicamente datos de viento, imágenes de temperatura superficial del mar (SST) procedentes de datos de la serie de satélites NOAA, procesados en nuestro laboratorio, así como datos procedentes del Centro para o Control da Calidade do Medio Mariño de Vilaxoán, concretamente concentración de células de *Gymnodinium catenatum*.

Los datos de viento empleados son los recogidos por el Instituto Nacional de Meteorología en la estación de Cabo Fisterra, que serán estimados como los existentes a lo largo de la costa oeste gallega. A partir de los mismos calculamos el índice de afloramiento o agua aflorada Ekman, estimando el caudal aflorado de agua por km de costa. Valores positivos del índice de Ekman indican afloramiento positivo, mientras que valores negativos indican apilamiento del agua contra la costa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los primeros 11 días de agosto el viento fue variable (fig. 1), seguido de cuatro días de vientos fuertes norte, favorables al "upwelling", del día 12 al 15, con índices mayores de $1000 \text{ m}^3 \cdot \text{seg}^{-1} \cdot \text{km}^{-1}$. Después de cuatro días de vientos débiles y variables (16-19), desde el día 20 hasta el 28 hay vientos norte fuertes, que producirán fuerte afloramiento, tanto debido a su intensidad como a su duración temporal. Posteriormente, una semana de vientos variables, y a partir del día 5 de septiembre, hasta el día 10, existen vientos muy fuertes de Sur, con índices de afloramiento fuertemente negativos.

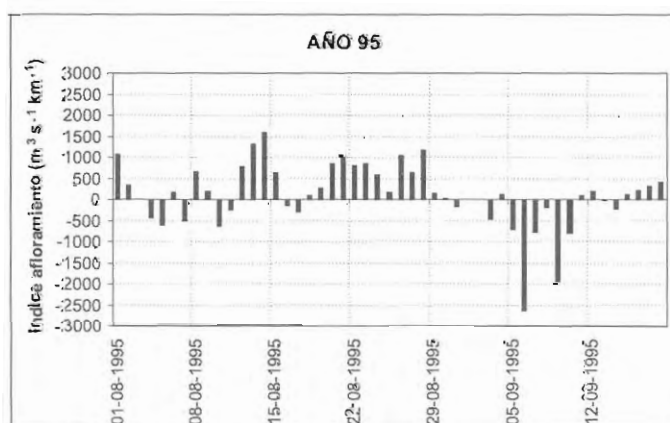


Figura 1.- Índice de afloramiento del 1/8/95 al 18/9/95

En la figura 2 se muestran las imágenes SST correspondientes al periodo de estudio, siguiendo la convención de mostrar con grises más claros temperaturas bajas, y con tonalidades más oscuras temperaturas altas. Como se aprecia en la fig. 2, el afloramiento todavía es fuerte los días 26 y 28 de agosto, después de 10 días de fuerte vientos norte. Debido a la duración de estos vientos, y a lo observado en las imágenes SST, debe estar establecida una corriente norte-sur, que se extienda hasta el frente de upwelling, que según las imágenes se situará entre 100-150 km de la costa.

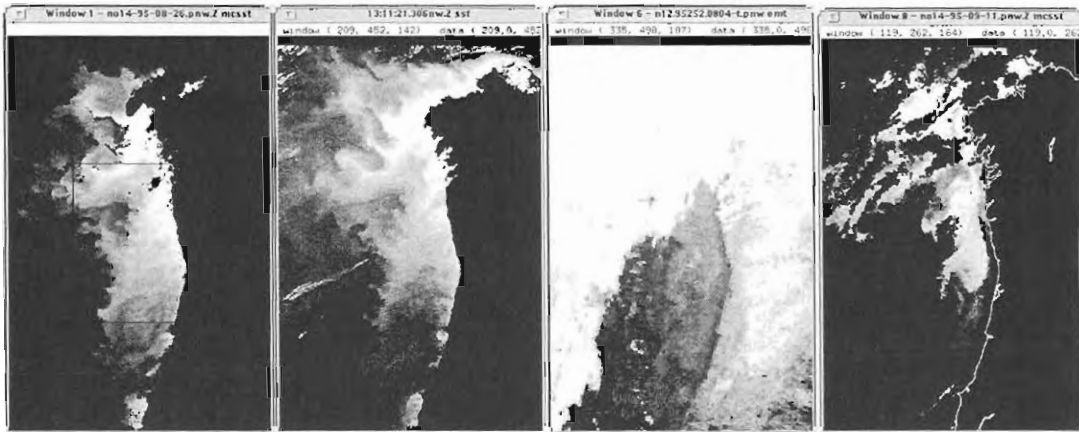


Fig 2. Imágenes SST de los días 26, 28 de agosto, y 9, 11 de septiembre.

Después del periodo del 5 al 10 de septiembre, las imágenes de los días 9 y 11 de septiembre muestran una temperatura superior en la plataforma más cercana a costa (15-25 km de costa), apreciándose además una lengua de temperatura 1-1.5°C más baja (entre 15-25 km y 50-75km de costa) más alejada de la costa. Esta estructura se aprecia con mucha claridad en la imagen del día 11 de septiembre, aunque ya se adivina el día 9. La situación a nivel de corrientes se corresponde con lo citado por Da Silva para el año 87, para un cambio brusco de vientos norte a vientos sur: una corriente sur-norte siguiendo la costa, con un ancho de 15-25 km, que lleva agua a temperatura alta, y una corriente norte-sur, perdiendo velocidad a lo largo del periodo de vientos sur, con agua más fría, previamente aflorada.

Esta situación coincide con la aparición de un "bloom" de *Gymnodinium catenatum* en las rías gallegas, habiéndose encontrado una concentración de células superior a 1000 células por litro en las estaciones más externas de las mismas, con más de 29000 cél/l en las 2 externas de Vigo, después de 2 semanas en las que las rías estaban limpias. Esto hace pensar en una posible relación entre las estructuras oceanográficas encontradas y la aparición de *G. catenatum* en las rías. La corriente norte-sur traería aguas costeras del norte de Portugal. Si en zonas de esta costa hubiese concentraciones elevadas de este dinoflagelado, como han sido detectadas en agosto a finales de la década de los 80 (Moita, 93), estas poblaciones serían transportadas por la corriente sur-norte hasta la boca de las rías.

CONCLUSIONES

El estudio de la dinámica costera en el relajamiento del afloramiento estival ha sido estudiado para el año 1995, haciéndose patente la relación entre las estructuras oceánicas costeras y los vientos.

La aparición de un bloom de *G. catenatum* en septiembre de este año puede estar relacionada con las estructuras oceanográficas. Pensamos que una de las causas citadas en la literatura de los "blooms" de *G. catenatum*, la advección de poblaciones inóculo en las rías con aguas oceánicas, puede ser debido a la corriente aquí detectada. El agua que entra en las rías al final del afloramiento no sería entonces el agua oceánica externa al frente de upwelling durante el periodo de afloramiento, sino que sería agua oceánica situada en latitudes más bajas, que iría ascendiendo pegada a costa, pudiendo arrastrar poblaciones de *G. catenatum* si estas existen en la costa. El estudio de otros años permitirá ver si este fenómeno se repite anualmente, y si puede ser o no el causante del transporte de poblaciones de "blooms" tóxicos de este dinoflagelado.

REFERENCIAS

- Figueiras, F.G., Wyatt, T., Alvarez-Salgado, X.A, Jenkinson, I.R. 1995. Advección, Diffusion and Patch Development in the Rías Baixas. In Harmful Marine Algal Blooms- P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou-Lavoisier, Inetrcept Ltd, 1995. 579-584.
- Fraga, S., Anderson, D.M., Bravo, I., Reguera, B., Steindinger, K. A. and Yentsch, C. M., 1988. Influence of Upwelling Relaxation on Dinoflagellates and Shellfish Toxicity in Ria de Vigo, Spain. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 27: 349-361.
- Moita, M. T , 1993. Development of toxic dinoflagellates in relation to upwelling patterns off Portugal. En *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. T.J. Smayda and I. Shimizu, eds, pp. 299-304.
- Da Silva, A.J., 1992. Dependence of upwelling related circulation on wind forcing and stratification over the portuguese northern shelf. ICES C.M. 92/C:17
- Smith, R.L., 1981. A comparison of the structure and variability of the flow field in three coastal upwelling regions: Oregon, Northwest Africa, and Peru. *Coastal Upwelling*. F. A. Richards, ed., *Coastal and Estuarine Sciences* 1, American Geophysical union, Washington, 107-118.
- Tilstone, G.H., Figueiras, F.G, Fraga, F. 1994. Upwelling-downwelling sequences in the generation of red tides in a coastal upwelling system. *Marine Ecology Progress Series*, vol, 112: 241-253.
- Wooster, W. S., Bakun, A., McClain, D. R. , 1976, The seasonal upwelling cycle along the Eastern boundary of the North Atlantic. *Journal of Marine Research*, 34: pp.131-141.

PERFIL DE TOXINAS DE *Alexandrium catenella* EN EL MEDITERRÁNEO.

Elena Avila (1), Santiago Fraga (1) y J. Franco (2)

(1).- Centro Oceanográfico de Vigo (IEO). Apt.:1552, 36280 VIGO, (2).- Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC). c/ Eduardo Cabello, nº 6. 36208 VIGO.

Palabras clave: Bloom y Cultivos de *A. catenella*, Perfiles de toxinas PSP, HPLC.

RESUMEN

La presencia de *A. catenella* en el Mediterráneo en los últimos años en pequeñas cantidades, no permitía comprobar la toxicidad del mismo; fue después del "bloom" del puerto de Tarragona en 1997 cuando se ha podido comparar la composición del perfil de toxinas de tres cepas de *A. catenella*, dos del mediterráneo, una de Chile y muestras de dicho puerto, por HPLC; así como la morfología, en cultivo, de las mismas en medio K a 18°C.

INTRODUCCIÓN

Desde 1994 se ha venido observando la presencia de *A. catenella* en el Mediterráneo, en bajas concentraciones sin que se pudiera saber si era tóxico o no. Posteriormente, en 1997, se produjo una marea roja de esta especie en el puerto de Tarragona, de donde fue aislada para su cultivo lo cual permitió que se pudiese estudiar su toxicidad en condiciones controladas de laboratorio.

El objeto de estos ensayos se centra en comparar diferentes características de dos cepas de *A. catenella* aisladas en el Mediterráneo con otra procedente de Chile estudiando los perfiles de las curvas de crecimiento, tamaños y formas de las células y toxinas cualitativa y cuantitativamente. También se compara con los perfiles de toxinas de células obtenidas de la marea roja del puerto de Tarragona.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos:

Las cepas de *Alexandrium catenella* utilizadas en este trabajo son las C6 y C7 aisladas por M. Delgado del puerto de Tarragona y la ACC01 aislada en Chile. Se cultivaron, sin agitación ni aireación, en matraces erlenmeyer de 1500 mL en medio K con una salinidad de 34, a 18°C \pm 1°C bajo una iluminación de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 14h:10h (L:O). Los inóculos fueron siempre aclimatados previamente en el medio a ensayar durante tres transferencias. Para la determinación de densidad celular se tomaron muestras que se fijaron con lugol y se contaron al microscopio utilizando una cámara Sedgwick Rafter.

Análisis de toxinas:

Cada dos días se tomaron muestras para análisis de toxinas, que se filtraron sobre filtros de fibra de vidrio de 13 mm de diámetro (GA/E de Gelman, se conservaron a -30°C. Posteriormente se extrajeron dos veces con 0,75 mL de ácido acético 0,05 M cada vez.

Los análisis de toxinas se realizaron por CLAE y se cuantificaron mediante derivatización postcolumna y detección fluorimétrica, según el método previamente descrito (8). La identificación de las toxinas se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con patrones del RNC de Canadá y del BCR de la Unión Europea, tanto del extracto original como del mismo previa hidrólisis con HCl 0,4N a 100 °C durante 15 min (fig 1 y 2), para determinarlas indirectamente, ya que las transformaciones que se producen son las siguientes: Cx (C1 da GTX2, C2=GTX3, C3=GTX1, C4=GTX4), GTX6=neoSTX y GTX5=STX.

Morfología:

Para el análisis morfológico se utilizaron muestras tomadas durante la fase exponencial y se midieron los ejes de longitudinales y transversales de las células con un ocular micrométrico. Para el estudio de las placas de las tecas, se utilizó la técnica del calcofluor con microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la bibliografía existen varios intentos de utilizar los perfiles de toxinas algunos como marcador quimiotaxonómico, de hecho se han recogido en la tabla 1 y para la misma especie se observa una constancia bastante clara en la composición cualitativa, así la presencia de C1, C2, GTX5 y GTX6 salvo en dos ocasiones, cepa NEPCC355 (1) y la ACC01 (6), pudiendo ser achacada su ausencia a una hidrólisis más o menos accidental de la muestra, confirmada por los elevados valores de GTX2, GTX3 y STX, sobre todo esta última (7) que al ser analizada por nosotros daba un perfil con toxinas C1, C2 y GTX5, pequeñas cantidades de GTX2, GTX3 y ausencia de STX. Uno de los problemas que a efectos de comparación se pone de manifiesto es la diversidad de medios y temperaturas y habitualmente falta de información sobre el tamaño y edad de inóculo, con lo cual las comparaciones son de muy difícil adscripción. En la tabla 2 se relacionan las dimensiones de las tres cepas cultivadas siendo C7 algo menor y más aplanada anteroposteriormente. No se observaron diferencias morfológicas en la forma de las placas.

En la figura 3 se muestran las curvas de crecimiento de las tres cepas y la suma de toxinas por mL de cultivo y por célula, de las curvas de crecimiento se puede apuntar que en conjunto la biomasa que se genera debe ser la misma, ya que la cepa que más células tiene es también la de células de menor volumen y viceversa (tabla 2) y esto puede venir dado por las características de la cepa chilena, proveniente de aguas más frías.

En relación a la producción de toxinas en el cultivo se observa que en general es muy similar en las tres cepas, no siendo tan clara cuando se relaciona con células que viene más influenciado por el tamaño celular. Con respecto a la muestra del puerto de Tarragona (pnPT) se advierte una predominancia de las toxinas Cx, en particular de C2 que es la más abundante en general en los *A. catenella* presentados en la tabla 2 y en mucha menor proporción el resto de las toxinas aunque las básicas, tales como C1, GTX6, GTX4, GTX5 y trazas de neoSTX y STX también están presentes, en lo que se refiere a contenido por célula se encuentra dentro de los valores obtenidos en las cepas cuando se encontraban en la fase exponencial, fase también sintomática de un "bloom".

Como conclusión más importante cabe señalar que no es posible confundir los perfiles de toxinas de los *A. catenella* con los otros dinoflagelados productores de toxinas PSP en el Mediterráneo, como son *A. minutum* y *G. catenatum*, ya que el primero solamente presenta las cuatro GTXs (9) y del segundo aunque con un perfil más complejo con toxinas Cx, GTX6, GTX5, neoSTX, y sobre todo la presencia dcSTX y ausencia de STX que los distingue de otros dinoflagelados(10).

REFERENCIAS

- (1) Cembella, A., J.J. Sullivan, G.L. Boyer, F.J. R. Taylor & R. J. Andersen. (1987). Variation in PSP toxin composition within the *Protogonyaulax tamarensis* / *catenella* species complex; red tide dinoflagellates. *Biochem. Syst. & Ecol.* 15(2)171-186.
- (2) Cembella, A. & G. Lamoureaux (1993). A competitive inhibition enzyme-linked immunoassay for the detection of PSP toxins in marine phytoplankton. In "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea". T.J. Smayda & Y. Shimizu (eds) (Elsevier Sci. Pub.) pp 857-862.
- (3) Boczar, B. A., M. K. Beittler, J. Liston, J. J. Sullivan & R.S. Cattolico. (1988). PSP toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture. *Plant. Physiol.* 88:1285-1290.
- (4) Noguchi, T., J. Maruyama, Y. Onoue, K. Hashimoto & T. Ikeda. (1983). Toxins of mussels infested with *Protogonyaulax catenella* isolated from Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49(3)499.
- (5) Sako Y., C-H Kim & Y. Ishida. (1992). Mendelian inheritance of PSP toxin in the marine dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(4)692-694.
- (6) Lagos, N., D. Compagnon, M. Seguel & Y. Oshima. (1996). PSP toxin composition: A quantitative analysis in Chilean mussels and dinoflagellate. In "Harmful and Toxic Algal Blooms". T. Yasumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.) (IOC of UNESCO Pub.) pp 121-123
- (7) Este trabajo.
- (8) Franco, J. M. y P. Fernández (1993). Separation of PSP toxins by RP-HPLC, with postcolumn reaction and fluorometric detection. *Chromatographia*, 35:613-620.
- (9) Forteza V., Quetglas G., Delgado M., Reyero M. I., Fraga S., J., Franco J.M. y Cacho E.. (1998). Development of a toxic bloom of *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) in Palma de Mallorca harbour (Balearic Islands, Western Mediterranean). in *Harmful Algae*, B. Reguera, M. L. Fernández, J. Blanco, T. Wyatt, Eds. (Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO). pp. 58-60.
- (10) Donker S., Reyero M. I., Reguera B. y Franco J. M. (1997). Perfil de toxinas PSP de seis cepas de *Gymnodinium catenatum* de Galicia. In "V Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. J.M Vyeites and F Leira (Eds.) (ANFACO-CECOPESCA, Vigo.) pp 69-76.

Tabla 1.- Perfil de toxinas de diferentes cepas de *A. catenella* de distintas localizaciones geográficas

Localiz geográf./ medio de cultivo / temp. / Cepa	C1 + C2		C4	GTX6	GTX4 + GTX1		GTX5	GTX3 + GTX2		neoSTX
WA / HENW / 16°C										
NEPCC 355	---		---	---	55		---	36		2,5
356	81		---	---	9		4	6		---
435	60		---	6	30		1	1,5		---
543	54		---	7	8,5		14	6		8,5
WA / HENW / 16°C										
NEPCC 574	55		---	30	20	2	20	2	1	2
WA / f/2 / 15°C										
	25		---	2	20		4	20		24
Jap / ES / 15°C										
3151	50		---	---	10	10	---	5	1	20
Jap / SWIlm / 15°C										
TNY7	1	30	3	2	17	1	45	1	---	---
OFX072	1	38	---	---	---	---	2	Tr	---	48
Chile / f/2 / 15°C										
ACC01	---		---	---	12	2	2	46	3	10
Tarragona / K / 18°C										
C6	2,6	29,7	---	19,3	37,8	Tr	7,8	0,3	Tr	---
Tarragona / K / 18°C										
C7	2,0	27,3	---	14,4	47,0	Tr	2,1	0,7	Tr	---
Chile / K / 18°C										
ACC01	5,7	41,4	---	---	---	Tr	15,6	0,6	Tr	---
plancton natural										
Puerto de Tarragona (pnPT)	2,6	87,5	---	2,0	2,0	Tr	1,5	1,0	Tr	Tr

WA- Washington; Jap- Japón; Tr.- trazas

Tabla 2.- Dimensiones medias de las células de *A. catenella* de las cepas del Mediterráneo y de Chile

Cepas	n	Largo	Ancho	L/A	Vol. (μm^3)
C6	13	28,60	28,80	0,99	12378
C7	15	25,90	26,80	0,96	9569
ACC01	18	33,13	33,70	0,98	19510

POTENCIAL IMPLICACIÓN DE LAS AGUAS DE LASTRE EN LA INTRODUCCIÓN DE ESPECIES TÓXICAS EN AGUAS IBÉRICAS.

S. Fraga

Instituto Español de Oceanografía

Apdo. 1552, 36200 Vigo

Correo electrónico: santiago.fraga@vi.ieo.es

La introducción de especies fitoplanctónicas exóticas en zonas donde antes no se conocían es un hecho demostrado en numerosos lugares del mundo. El peligro de que las especies sean dañinas para las pesquerías y al acuicultura es un motivo de preocupación de muchos gobiernos, en especial del australiano y del canadiense que han puesto en marcha numerosos programas de prevención.

Dos son las vías principales de transporte accidental de especies dañinas: 1) a través de moluscos vivos que son reestabulados y 2) a través del agua de lastre de barcos mercantes. De estas dos vías de transmisión se considera que la segunda es la más probable para la introducción de especies fitoplanctónicas nocivas al ser el volumen de agua transportado inmensamente mayor. A través de la traslocación de moluscos es más fácil la introducción de enfermedades o parásitos.

En las aguas gallegas desde que, en 1977, se ha comenzado el seguimiento del plancton nocivo se han observado varias especies fitoplanctónicas tóxicas que no habían sido observadas anteriormente. De entre ellas destacan *Gymnodinium catenatum*, principal responsable de las intoxicaciones de tipo paralizante, *Pseudo-nitzschia australis* de toxicidad de tipo amnésico (afecta muy seriamente a la vieira) y *Heterosigma akashiwo*, especie ictiotóxica. Las primeras observaciones de cada una de estas especies en Galicia datan de 1976, 1980 y 1994 respectivamente, siendo de destacar que la de *G. catenatum* fue la primera observación en aguas del Océano Atlántico y la de *P. australis* la primera en el Atlántico Norte. En la VIII Conferencia Internacional sobre Algas Nocivas que se celebró en Vigo el año 1997, se reportó la presencia en fondos de la plataforma portuguesa de quistes del dinoflagelado *Pyrodinium bahamense*. Esta especie es la causante de numerosas intoxicaciones en algunas zonas tropicales, principalmente en el sureste asiático y Centroamérica. Tal vez por tratarse de una especie tropical no ha sido observada nunca en muestras de plancton del litoral europeo.

Recientemente, en junio de 1998, hubo una "marea roja" del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* en la costa tarraconense, siendo ésta la primera observada de esta especie en el Mediterráneo. Esta peligrosa especie ha sido la causante de muchas muertes por intoxicaciones de tipo paralizante en la costa oeste de Norteamérica, en el sur de Chile y la Argentina y en el Japón. Con anterioridad a la marea roja de Tarragona, ya había sido observada

desde hace pocos años en la costa valenciana y en el Adriático pero siempre en muy bajas concentraciones. También ese verano fue identificada en muestras de la costa tunecina. Hay que destacar, que *A. catenella* nunca ha sido observada todavía en el Atlántico Norte.

Ante estos hechos, se considera que sería conveniente tener en cuenta el riesgo de introducción de especies tóxicas en zonas donde se practique la acuicultura. Con el paso del tiempo, este tema está cobrando cada vez mayor importancia, como se refleja en actividades del ICES con el Grupo de Trabajo sobre introducciones y transferencias de organismos marinos, Grupo de Estudio sobre biocontrol marino de especies invasoras, Grupo de Estudio sobre aguas de lastre y sedimentos, Grupo de Trabajo sobre interacciones ambientales de la acuicultura y Grupo de Trabajo sobre dinámica de floraciones algas.

La introducción del *A. catenella* en aguas gallegas podría ser catastrófica para el sector marisquero gallego, pues se trata de un dinoflagelado que está bien adaptado a zonas de afloramiento (Sudáfrica, California/Oregón) que probablemente encuentre buenas condiciones de crecimiento en el sistema de afloramiento coterero del oeste de la Península Ibérica.

Sería conveniente entablar contactos con autoridades portuarias de todos los puertos para facilitar la toma de los primeros datos sobre la procedencia de los buques en lastre, y si se considerase necesario, elaborar proyectos en los que la colaboración de esas autoridades sería imprescindible para poder muestrear el agua de los buques que vengan en lastre.

NOTA

Con posterioridad a esta "VI Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas", e independientemente de ella, la Dirección General de la Marina Mercante ha creado un grupo de trabajo sobre gestión del agua de lastre para asesorar a la Delegación Española en las negociaciones que se llevan a cabo en el seno de la Organización Marítima Internacional (OMI). Se está elaborando un reglamento que será de obligado cumplimiento en todos los barcos y entre las opciones que se barajan están el cambio del agua de lastre en altamar durante la travesía, mediante bombeo y rebosamiento o la utilización de alguna técnica biocida como podría ser el calentamiento del agua. En el Grupo de Trabajo Nacional, aparte de personal de la Dirección General de la Marina Mercante, hay representantes de los navieros, Capitanías de puertos, Autoridades portuarias, Ministerio de Medio Ambiente, Universidades, Instituto de Ciencias del Mar, Instituto Español de Oceanografía, Construcción naval y Agentes Marpol. La Capitanía Marítima de Barcelona y la Autoritat Portuària de Barcelona están realizando un trabajo para evaluar la importancia de las descargas de agua de lastre en el puerto de Barcelona. El estudio consta de dos fases, una que se basa en la estimación del agua deslastrada y su origen, y la otra en el análisis de esas aguas.

EVALUACIÓN DE LA ESTIMACIÓN DE CONCENTRACIONES CELULARES DE *Dinophysis acuminata* EN MUESTRAS INTEGRADAS (1992-1998).

Yolanda Pazos, Juan Maneiro, Angeles Moroño y Joaquín Mariño

Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. Peirao de Vilaxoán, 36611. Vilagarcía de Arousa. Pontevedra.

INTRODUCCIÓN

El control de las zonas de producción, que realiza el Centro de Control da Calidade do Medio Mariño, tiene como principales objetivos garantizar sanitariamente en origen los productos destinados a consumo humano y posibilitar el desarrollo empresarial del sector. Además de los ensayos químicos y biológicos de biotoxinas, el recuento de células tóxicas en el agua es básico tanto, desde el punto de vista confirmativo como predictivo.

Debido a las propias características del medio marino, la distribución temporal espacial y vertical de la concentración de células de fitoplancton en el agua es heterogénea. El diseño del muestreo de condiciones oceanográficas y fitoplancton se realizó (Mariño *et al.*, 1998) de modo que fuese lo más representativo posible optimizando los recursos disponibles tanto materiales como humanos. Se fijó una frecuencia de muestreo semanal y se distribuyeron las estaciones oceanográficas de modo que cubriesen las principales zonas de producción y las áreas significativas para el estudio de fenómenos oceanográficos. El recuento de células de fitoplancton, una labor que requiere personal altamente cualificado y mucho tiempo de dedicación, se limitó, de modo general, a muestras integradas en el nivel de profundidad de 0-15 m de modo que cubriese la profundidad máxima permitida para el cultivo de bivalvos. Cuando el sistema de control lo requiriera y, sistemáticamente en una estación de la ría de Pontevedra, (Estación P2 en Bueu: 422140 N; 84642 W) se realizaron los recuentos, tanto de la muestra integrada, como en tres niveles de profundidad (0-5; 5-10 y 10-15 m). Se seleccionó esta estación puesto que esta área es la más afectada por episodios tóxicos.

En este estudio se realiza la evaluación de la representatividad de la muestra integrada (0-15 m) frente a los valores obtenidos en los diferentes niveles de profundidad (0-5; 5-10 y 10-15 m) analizados semanalmente desde 1992 a 1998 en una estación de la ría de Pontevedra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de agua de mar se recogen semanalmente a bordo del B/O J. M. Navaz del I.E.O mediante una manguera de 15 metros de longitud constituida por tres tramos de 5 metros cada uno (Lindahl, 1986). El agua de cada tramo se preserva mediante la adición de Lugol, en frascos de 50 ml. El día de muestreo, inmediatamente después de la recepción en el laboratorio, se realiza la homogeneización de las muestras de los tres niveles (0-5, 5-10 y 10-15 m) por

agitación suave (100 veces). Se pipetea 10 ml de cada una de estas muestras y se mezclan obteniendo una muestra integrada de 0-15 m. La muestra integrada y las procedentes de los tres niveles, se ponen a sedimentar en cámaras de Utermöhl utilizando, de modo general, columnas de 25 ml durante un tiempo mínimo de 12 horas. El recuento de células de *Dinophysis acuminata* se realiza en microscopios invertidos sobre todo el área del fondo de la cámara de sedimentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de la gran persistencia espacio-temporal de *Dinophysis acuminata* en las Rías Gallegas, existe una marcada variabilidad estacional en la evolución interanual (1992-1998) del número de células que decrece sistemáticamente en las estaciones invernales. Esta tendencia (Fig. 1) se presenta en los tres niveles de profundidad estudiados en la estación de Bueu (P2).

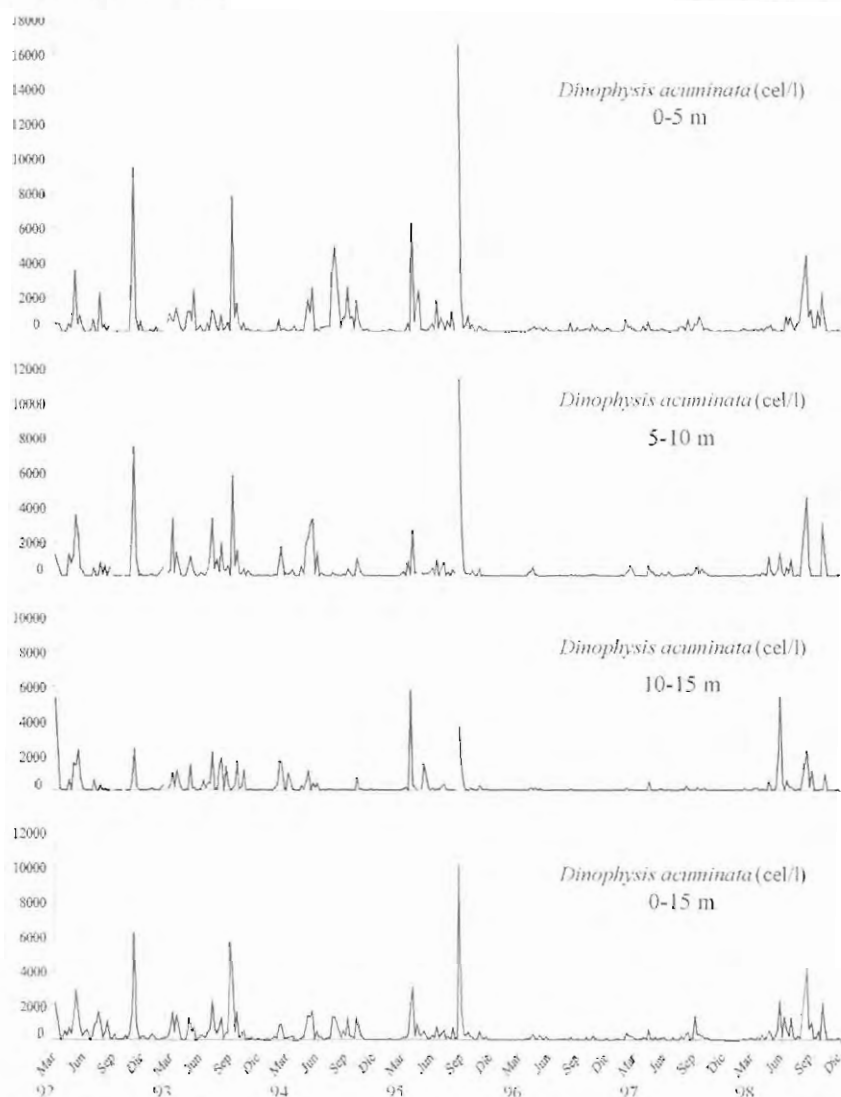


Figura 1.- Evolución interanual de *Dinophysis acuminata* (cel/l) en la estación P2 de Bueu- Pontevedra en las muestras analizadas semanalmente desde 1992 a 1998 por profundidades (0-5; 5-10 y 10-15 m) y de la muestra integrada (0-15 m).

La variabilidad interanual de la concentración de células de *Dinophysis acuminata*, con valores mínimos en los años 96 y 97, es un fenómeno que se ha detectado, tanto en las diferentes estaciones que se estudian semanalmente en el sistema de control, como en los tres niveles de distribución vertical analizados (Fig. 1).

Entre los principales factores relacionados con la variabilidad estacional e interanual de los episodios de *Dinophysis acuminata* en las Rías Gallegas destacan la estratificación termohalina, la producción fitoplanctónica y la disponibilidad de sales nutrientes, especialmente las fuentes de amonio (Blanco *et al.*, 1998). Estos factores tienen una distribución vertical heterogénea pues dependen de procesos como el régimen de vientos, la insolación y el afloramiento que los regulan.

Como era de esperar, a pesar de que en las tres profundidades se observan las mismas tendencias generales en la variabilidad estacional e interanual, existen diferencias entre las concentraciones celulares de *D. acuminata* en los niveles de profundidad. Las mayores concentraciones celulares se detectan, como norma general, en el nivel superficial (0-5 m) aunque, en momentos puntuales, existen máximos subsuperficiales (5-10 y 10-15 m). Con el fin de evaluar estadísticamente estas diferencias entre niveles de profundidad se realizó un análisis de varianza de un factor. El resultado obtenido (Tabla 1) del estadístico de contraste ($F_{0.05;2,909} = 3.28$) mayor que el valor crítico ($F = 3.00$) implica un rechazo de la hipótesis de igualdad de medias para los valores de las concentraciones celulares de *D. acuminata* en los tres niveles de profundidad analizados (0-5; 5-10 y 10-15 m).

Tabla 1.- Análisis de varianza de un factor para la comparación de los valores de *Dinophysis acuminata* (cel/l) en los tres niveles de profundidad (0-5; 5-10 y 10-15 m) analizados semanalmente desde 1992 a 1998.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
0-5 m	304	139800	459.86842	1807725.4
5-10 m	304	117556	386.69737	1092252.3
10-15 m	304	73780	242.69737	490695.01

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7422997.9	2	3711499	3.2838607	0.0379284	3.0056242
Dentro de los grupos	1.027E+09	909	1130224.2			
Total	1.035E+09	911				

Puesto que existen diferencias estadísticamente significativas entre niveles de profundidad, para evaluar hasta que punto el recuento integrado (0-15 m) es representativo, se realizaron análisis de regresión simple.

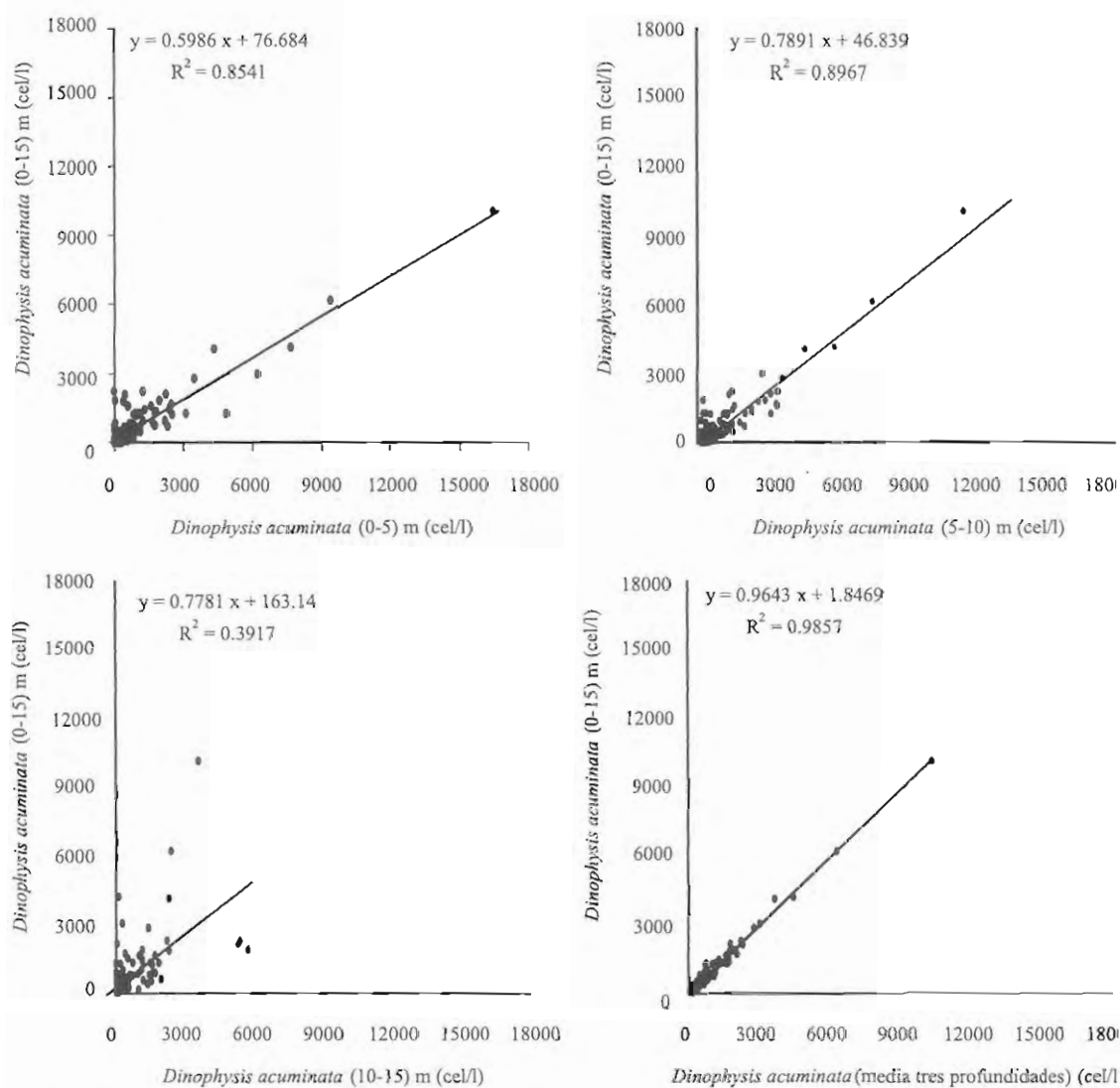


Figura 2.- Análisis de regresión simple entre las concentraciones de *Dinophysis acuminata* (cel/l) calculadas a partir de las muestras semanales desde 1992 a 1998 integradas de 0-15 m frente a los recuentos de las muestras de 0-5 m; 5-10 m; 10-15 m y el promedio de las tres profundidades anteriores.

Los análisis de regresión entre los resultados del recuento integrado de las muestras y los recuentos de cada una de las profundidades (Fig. 2), mostraron niveles de significación variables ($R_{12} = 0.854$ para 0-5 m; $R_{22} = 0.789$ para 5-10 m y $R_{32} = 0.392$ para 10-15 m; $n_1 = n_2 = n_3 = 304$).

La elevada significación del análisis de regresión ($R_{x2} = 0.986$; $n_x = 304$) entre los resultados de los recuentos de la muestra integrada (0-15 m) y el promedio de los recuentos de las tres profundidades (0-5; 5-10 y 10-15) permite concluir que el recuento de muestras integradas se ajusta mejor al promedio de los recuentos de los tres niveles de profundidad que a ningún nivel considerado por separado y que el recuento de la muestra integrada de 0-15 m tiene una representatividad satisfactoria (Tabla 2) con respecto al valor promedio de los tres niveles de profundidad.

EVALUACIÓN DE LA ESTIMACIÓN DE CONCENTRACIONES CELULARES DE DINOPHYSIS

Tabla 2.- Estadísticas de la regresión entre las concentraciones celulares de *Dinophysis acuminata* (cel/l) obtenidas a partir de la muestra integrada de 0-15 m y la calculada como promedio de las tres profundidades (0-5; 5-10 y 10-15 m) semanalmente (92-98).

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.993
Coefficiente de determinación R ²	0.986
R ² ajustado	0.986
Error típico	104.199
Observaciones	304.000

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	<i>G. libertad</i>	<i>S. cuadrados</i>	<i>Promedio cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>		
Regresión	1	226523065	226523065	20863	0.000		
Residuos	302	3278950	10857				
Total	303	229802015					

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error Típico</i>	<i>Estadísticos</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	1.847	6.449	0.286	0.775	-10.844	14.538	-10.844	14.538
Variable X 1	0.964	0.007	144.442	0.000	0.951	0.977	0.951	0.977

La representatividad de la muestra integrada es independiente de la magnitud de la concentración de células como se deduce del análisis de los residuos de la regresión: *D. acuminata* (cel/l) en la muestra integrada menos el valor estimado por la regresión $y = a + bx$, donde x es el valor promedio de la concentración de *D. acuminata* en los tres niveles de 0-5, 5-10 y 10-15 m. Esto implica que la muestra integrada representa satisfactoriamente el valor promedio de las diferentes profundidades independientemente de que la concentración de células de *Dinophysis acuminata* sea alta o baja.

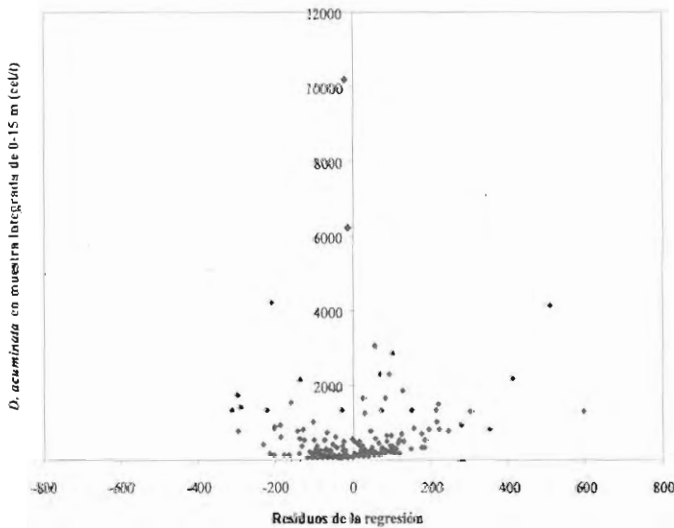


Figura 3.- Gráfico de dispersión de la concentración de *Dinophysis acuminata* (cel/l) en las muestras semanales de la estación P2 de los años 1992-1998 integradas de 0-15 m frente a los residuos de la regresión calculada entre esta variable y el promedio de las concentraciones calculadas por niveles (0-5 m; 5-10 m y 10-15 m).

La evolución temporal de los residuos no mostró una tendencia clara con ninguna de las variables oceanográficas analizadas (salinidad, temperatura, fluorescencia y estabilidad). Es decir que, independientemente de que exista estratificación, mezcla vertical, o proliferaciones de fitoplancton la muestra integrada es representativa del valor promedio de la concentración de células de *D. acuminata*.

El análisis de la evolución temporal (Fig. 4) entre el valor de la concentración de células de *D. acuminata* integrado de 0- 15 m y el obtenido de la regresión frente al promedio de los recuentos realizados separadamente en las tres profundidades (0-5; 5-10 y 10-15) muestra una gran concordancia.

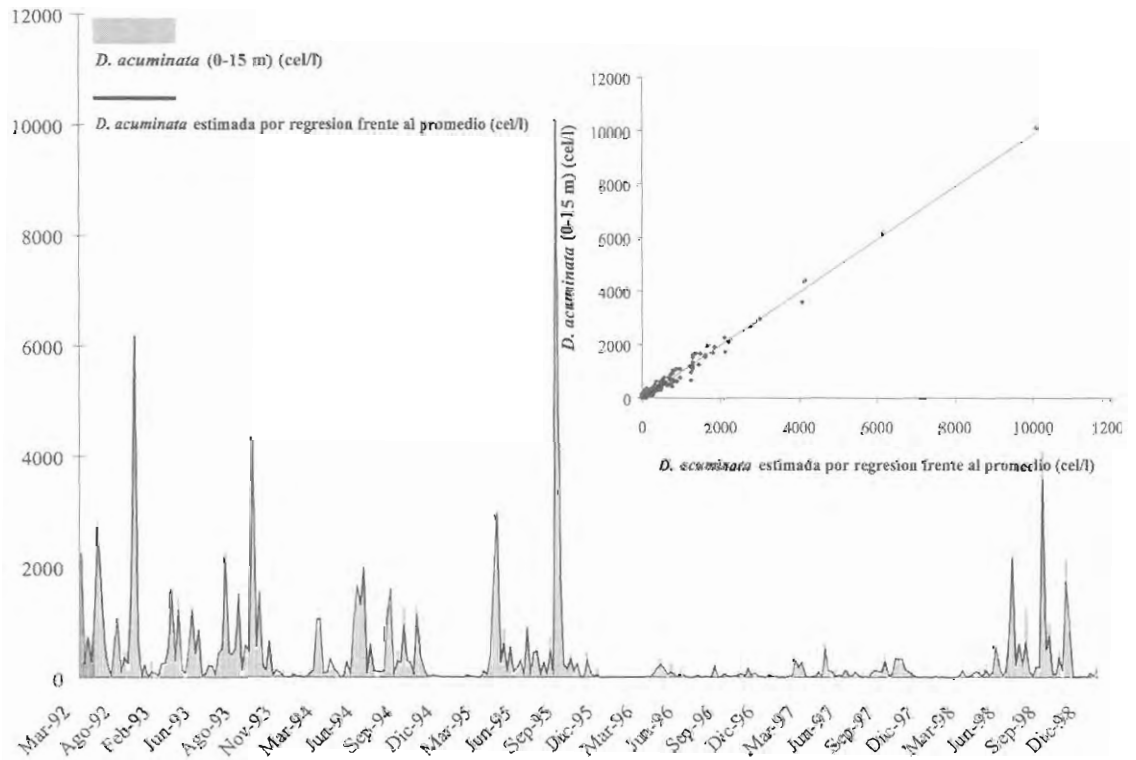


Figura 4.- Evolución temporal (1992-1998) y gráfico de dispersión de las concentraciones semanales de *Dinophysis acuminata* (cel/l) calculadas en la muestra integrada de 0-15 m y la estimada como regresión frente al promedio de los resultados de los recuentos de las tres profundidades (0-5 m; 5-10 m y 10-15 m).

Los residuos de la regresión muestran una distribución al azar (Fig. 5) entorno al valor cero y no presentan una tendencia temporal significativa, lo que indica una gran robustez en el tiempo del sistema de control y que el factor humano no afecta significativamente a estos resultados.

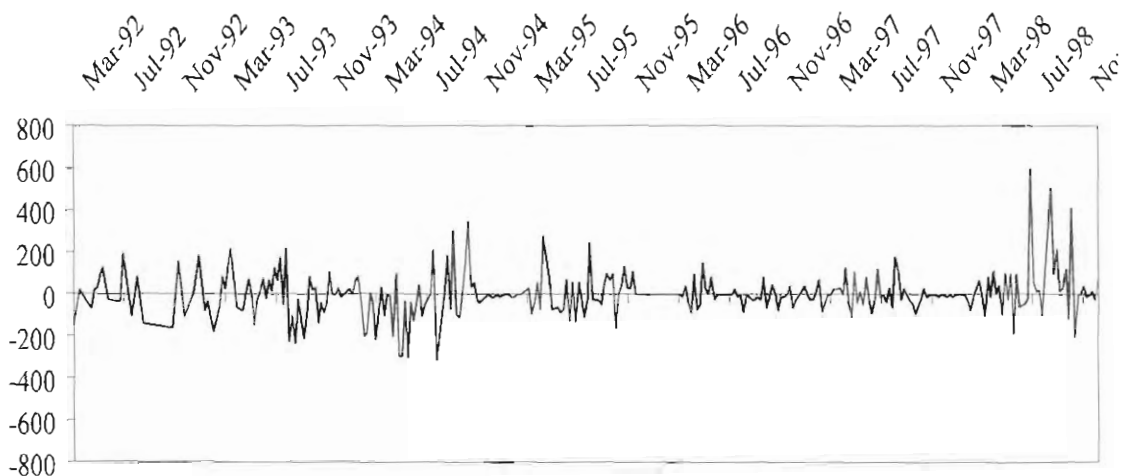


Figura 5.- Evolución temporal (1992-1998) de los residuos de la regresión calculada entre las concentraciones semanales de *Dinophysis acuminata* (cel/l) en la muestra integrada de 0-15 m frente a las calculadas como promedio de los recuentos de las tres profundidades (0-5; 5-10 y 10-15 m).

CONCLUSIONES

La estimación de la concentración de *Dinophysis acuminata* (cel/l) en muestras integradas de 0-15 m tiene una representatividad satisfactoria con respecto al valor promedio de los recuentos realizados sobre muestras de tres profundidades (0-5; 5-10 y 10-15m) como se deduce de este estudio realizado sobre datos semanales desde 1992 a 1998 en una estación de la Ría de Pontevedra.

Esta representatividad es independiente de la concentración de células, de las condiciones oceanográficas y de factores humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- LINDAHL, O., A dividable hose for phytoplankton sampling. ICES, C. M., L: 26. 1986.
- MARIÑO, J., MANEIRO, J., & BLANCO, J. The harmful algae monitoring programme of Galicia: good value for money. En: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt.[eds.]. Harmful microalgae. Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, Paris., 1998, 229-232.
- BLANCO, J., MOROÑO, A., PAZOS, Y., MANEIRO, J. MARIÑO, J. Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rías: Environmental and biological influences. En: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt.[eds.]. Harmful microalgae. Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, Paris., 1998, 204-210.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica de Florentina Amoedo, Celia Díaz, Pilar García, Isabel Lemos, Adela López, Jesús Mouriño, Silvia Roura y la tripulación del B/O J.M. Naváz.

VARIABILIDAD MORFOLÓGICA EN *Dinophysis caudata* Y SU DELIMITACIÓN CON *Dinophysis diegensis*.

M. Delgado, M. Vila, E. Garcés y J. Camp.

Instituto de Ciencias del Mar. P. Joan de Borbó s/n. 08039 Barcelona.

RESUMEN

En una muestra de la estación central del Fangar (delta del Ebro) se detectó la ocurrencia de numerosos dinoflagelados de morfología *D. caudata* Saville-Kent y otros de morfología diferente, algunos de los cuales eran de morfología coincidente con *D. diegensis* Kofoid. Ya que se observaron variaciones morfológicas muy grandes entre los ejemplares observados incluso más allá de las descritas para las dos especies anteriores, se decidió realizar un estudio detallado de aquella muestra, en cuanto que pudiera clarificar el conflicto existente entre las dos morfoespecies citadas. Se propone clasificar los morfotipos sin una discontinuidad clara entre el apéndice caudal y el cuerpo como *D. caudata f. diegensis* (Kofoid) comb. nov. La variación morfológica observada se discute en relación con su posible origen, sobre lo cual es de resaltar la necesidad de un mayor conocimiento de la biología del género.

INTRODUCCIÓN

El interés por el estudio de especies del género *Dinophysis* ha aumentado mucho por su implicación en intoxicaciones diarreicas. La asignación correcta de la identidad taxonómica precisa de un organismo es crucial cuando tratamos con fitoplancton tóxico (Hallegraeff, 1995). Las descripciones originales de muchas especies de este género son pobres y antiguas (ver Zingone *et al.*, 1998), lo cual ha dado lugar a problemas de delimitación entre ellas, creado en la práctica una severa dificultad en el trabajo cotidiano, como p. ej. en los programas de seguimiento rutinario del fitoplancton tóxico en relación con la explotación comercial de moluscos bivalvos. En la actualidad hay la necesidad de completar las descripciones originales de las especies en lo posible y delimitar su rango de variabilidad.

Incluso después de muchos años de experiencia en observación de muestras hay cierta incertidumbre en la identificación taxonómica de algunos ejemplares, obviamente en relación con la variabilidad morfológica que hay en dinoflagelados. Ello repercute en una gran dificultad en la separación de especies cuando se trata de realizar un trabajo de precisión, y hay buena documentación del problema en el género *Dinophysis* (Bravo *et al.*, 1995a, 1995b; Delgado *et al.*, 1996; Zingone *et al.*, 1998). Una complicación añadida en este género es la imposibilidad de cultivo en laboratorio, la cual influye sobremanera en la diferenciación de las especies de verdad (de hecho son únicamente morfoespecies).

Dinophysis caudata Saville-Kent es una especie considerada como de distribución muy amplia, nerítica y estuarina en aguas templadas y tropicales, aunque rara en aguas frías

(Steidinger and Tangen, 1996). En el Mar Mediterráneo ha sido registrada en la mayoría de los trabajos sobre fitoplancton y en las bahías del delta del Ebro ha estado presente todos los años desde el comienzo del seguimiento rutinario en 1989. Aunque se presenta en concentraciones muy bajas (generalmente inferiores a 100 células/L), hay citas de mareas rojas de esta especie en Tailandia y Japón (Taylor *et al.*, 1995). La toxicidad de esta especie está reconocida en las dos referencias anteriores.

Ha habido dudas sobre la identidad de *D. diegensis* Kofoid y su posible relación con *D. caudata* (Kofoid & Skogsberg, citado por Balech, 1988), en cierta manera pensando en la posibilidad de que ambas morfologías correspondan a una misma especie, aunque no han podido llegar a una conclusión debido a la falta de evidencias. Incluso está reconocida (Taylor *et al.*, 1995) una difícil diferenciación entre los ejemplares de *D. caudata* con una proyección larga y *D. tripos*, además de entre ejemplares de *D. caudata* con una proyección corta y *D. diegensis*.

En una muestra de la estación central del Fangar (delta del Ebro) se detectó la ocurrencia de numerosos dinoflagelados de morfología coincidente con la especie *D. caudata* y algunas morfologías diferentes. Algunas de estas coincidían con la especie *D. diegensis*. Ya que se observaron variaciones morfológicas muy grandes en los organismos incluso más allá de las descritas para las dos especies anteriores, se decidió realizar un estudio detallado de aquella muestra, en cuanto que pudiera clarificar el conflicto existente entre las dos morfoespecies citadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dentro del programa de seguimiento del fitoplancton tóxico en Cataluña se obtuvieron muestras de fitoplancton con periodicidad semanal en las bahías del delta del Ebro. En cada bahía se tomaron muestras rutinarias de fitoplancton (entre las 10 y las 12 h) en la superficie de 4 estaciones y otras 3 muestras en la estación central (superficie, fondo y muestra integrada de toda la columna de agua) las cuales fueron fijadas con formaldehído (1%). En todas las muestras se cuantificaron en cubetas de sedimentación (50 mL) empleando un microscopio invertido Leica-Leitz DM-IL los organismos susceptibles de producir toxicidad a través de moluscos bivalvos y en las muestras de la estación central se realizaron recuentos completos del fitoplancton con motivo de continuar las series temporales que se tienen desde 1990.

La muestra integrada de la estación central del Fangar tomada el 6 de Octubre de 1997 (temperatura del agua de 24 °C y salinidad de 35 psu), correspondiente a 333 mL del agua original filtrada por malla de 10 µm, se tiñó con calcoflúor (Fritz and Triemer, 1985). En esta muestra se realizaron 70 fotografías de ejemplares selectos de *Dinophysis* al mayor aumento del microscopio (1000x). El criterio de selección consistió en que la posición del ejemplar fuera adecuada, excluyendo los que estaban ladeados, y que reflejara la amplitud de las variaciones morfológicas. Hubo una sobrerrepresentación en las fotografías de los ejemplares muy pequeños así como también de los ejemplares intermedios entre *D. caudata* y *D. diegensis*. A partir de las fotografías se realizaron dibujos por ordenador, resiguiendo los contornos de los ejemplares, se midieron y se ordenaron según su longitud. Otra parte de la muestra se concentró a través de filtros Nucleopore de 2 µm de poro y se analizó en el microscopio electrónico de barrido. En esta muestra se seleccionaron 7 organismos, que abarcaban el rango principal de variaciones morfológicas, los cuales se fotografiaron a dos aumentos diferentes. El aumento mayor para visualizar los organismos completos (1000x, 1500x y 2000x) y el menor para visualizar el detalle de los poros de las valvas (10,000x). La terminología que se emplea está basada en Balech (1988).

RESULTADOS

En la bahía del Fangar estuvo presente *D. caudata* en muestreos semanales consecutivos desde la primera semana de Agosto hasta principios de Octubre de 1997, con una comunidad muy cambiante del plancton (alternancia entre dominio de diatomeas y dinoflagelados). Entre las dinoflageladas fueron especialmente abundantes *Prorocentrum triestinum*, *Scrippsiella* spp., *G. sanguineum*, *Oxyphysis oxytoxoides*, *P. micans* y *P. minimum*. Entre las diatomeas fueron especialmente abundantes *Chaetoceros* spp., *Leptocylindrus danicus*, *Cerataulina pelagica*, *Nitzschia closterium*, *N. longissima*, *Pseudo-nitzschia* spp., *Thalassionema nitzschioides*, *Thalassiosira* spp. *Pseudosolenia calcar-avis*, *Asterionellopsis glacialis*. En cuanto a otras especies del género *Dinophysis* diferentes a las dos tratadas en particular, únicamente

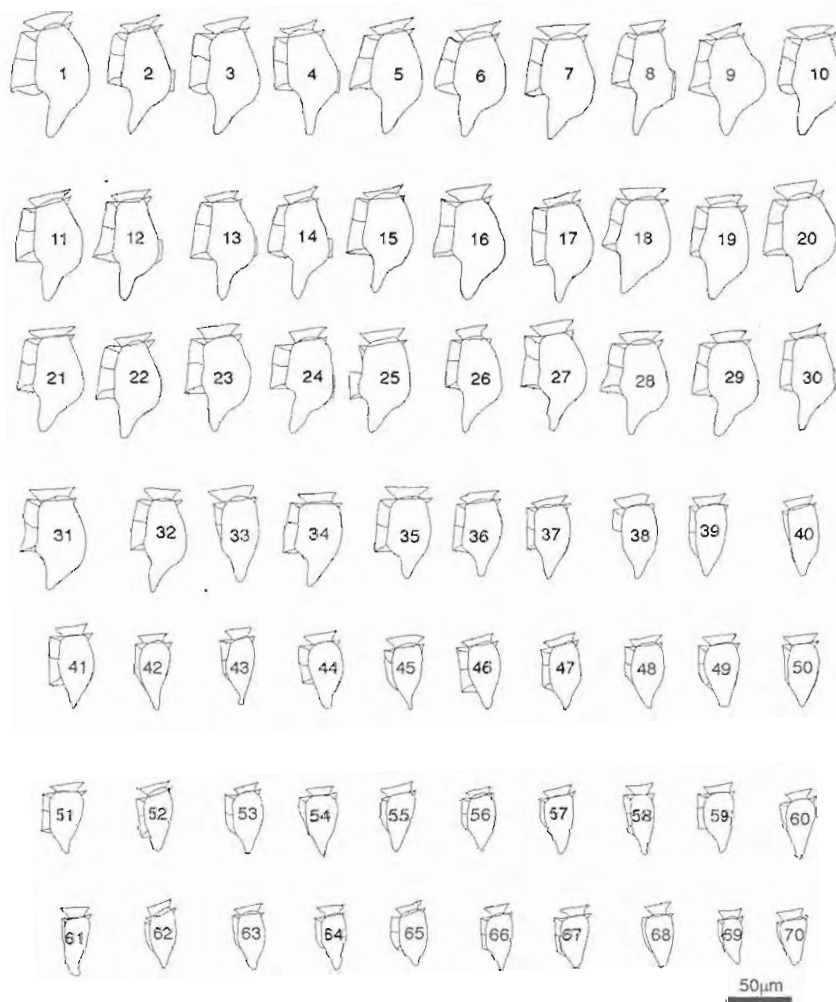


Figura 1.- Serie de dibujos (ordenados según la longitud) realizados a partir de fotografías de ejemplares en la misma muestra (Fangar, Integrada est. central, 6 octubre 1997)

estuvieron presentes *D. sacculus* y *D. rotundata* en el periodo citado, con concentraciones celulares muy bajas (inferiores a 20 cels/L). En el final de este periodo -6 oct. correspondiente a la muestra analizada en detalle- hubo una pobreza muy grande de fitoplancton acompañado de un incremento muy grande en ciliados (que alcanzaron una concentración de 300.000 cels/L en la superficie de la estación central). La semana consecutiva no hubo muestreo, por mal tiempo, y en la siguiente (20 oct.) dominaron las diatomeas y picoplacton, desapareciendo prácticamente las dinoflageladas. Durante todo el periodo que se relata hubo resultados negativos en el análisis de toxicidad DSP por biotest sobre mejillones.

En la muestra integrada de la estación central del Fangar (6 Oct.97, equivalente a 333 ml) se cuantificaron 175 células correspondientes a *D. caudata*, 50 células correspondientes a *D. diegensis* (y otras muy pequeñas sumadas) y 6 células con morfología intermedia, las cuales representan una abundancia relativa de 76%, 21% y 6% respectivamente. La concentración celular global de *Dinophysis* spp. en aquella muestra fue de 693 cel./L.

En la serie de 70 dibujos ordenados según la longitud de los ejemplares (Fig. 1) se observa una variabilidad morfológica muy grande, que incluye *D. caudata*, *D. diegensis* y algunas morfologías intermedias entre las dos anteriores.

Los ejemplares nº1 al nº30 son asignados con facilidad a *D. caudata*. En estos ejemplares se observa una variabilidad notoria, tal como la presencia de un engrosamiento en el margen dorsal de la hipoteca (que es un resto de la conexión entre células hermanas después de la división vegetativa, nº4, 8,12,13,14,30), protuberancias antapicales (en el nº 19 hay dos protuberancias), las proporciones de la hipoteca (comparar a nivel de ejemplo nº8 y nº9) y especialmente la curvatura de la hipoteca en sus márgenes ventral y dorsal. En cuanto a la curvatura de la hipoteca en la mitad posterior del margen dorsal es de resaltar una variabilidad que va desde la concavidad acusada (ej. nº 4 y 6) hasta ser rectilíneo (ej. nº 18). En cuanto a la curvatura de la hipoteca en la mitad posterior del margen ventral, es un rasgo también sujeto a variabilidad acusada (comparar nº 23 y 24). El apéndice caudal también está sujeto a variaciones importantes en cuanto a inclinación y grosor (comparar como ejemplo el nº 4 con el 7) y su contorno a veces es muy irregular (nº 27). En la serie de fotografías hay un momento en que no se percibe el apéndice caudal diferenciado de *D. caudata* y que se pasa a una terminación más o menos cónica de *D. diegensis* (véase la serie entre nº 31 y nº 40). Si bien en los ejemplares más grandes la anchura máxima ocurre en la parte media de la hipoteca, en los más pequeños ocurre en la parte anterior. Las aletas sulcales también presentan una variabilidad notoria, en particular la izquierda. La falta o el poco desarrollo de alguna parte de la aleta sulcal izquierda (nº 25, 38) está relacionada con la división celular, según la cual cada célula hija recibe una parte de aleta sulcal izquierda de la célula madre (o la anterior o la posterior) y regenera con el tiempo la otra parte. Las aletas sulcales de los ejemplares más pequeños están muy reducidas, en ocasiones no fue posible ver con claridad los radios de la aleta izquierda (nº 40, 45, 50, 54, 55, 57, 60, 61, 62, 64, 68, 69, 70).

Fue notorio que se encontraron ejemplares de la morfología *D. caudata* en parejas de reciente división (12 parejas, representando un 7.4% células en división relativo a *D. caudata*). Sin embargo, no se observó ninguna célula en parejas en las otras morfologías así como tampoco se observó ninguna pareja entre células grandes-células pequeñas.

Las medidas efectuadas en los 70 ejemplares fotografiados presentaron un rango muy amplio, 35-79 μm de longitud de la hipoteca y 15-41 μm de anchura. Hubo una mejor relación lineal entre la longitud y la anchura de la hipoteca que entre éstas y la medida de la aleta circular posterior. A pesar de que se diferencian dos grupos de medidas, correspondientes a

las morfologías *D. caudata* y *D. diegensis*, la variación de tamaño es continua.

Respecto a los poros de la hipoteca analizados en microscopía electrónica de barrido, no ha sido posible reconocer diferencias significativas entre los ejemplares de *D. caudata* y los de *D. diegensis*, ni en el nº poros/área ni en el diámetro de los poros. Los poros se presentaron como perforaciones de la placa celulósica, de contorno circular, con bordes lisos y hundidos y sin mostrar elevaciones sobre la superficie de las placas en los ejemplares analizados. Aunque es posible reconocer alineaciones de los poros en la hipoteca, bien siguiendo líneas paralelas la parte anterior de las placas o bien siguiendo líneas oblicuas en la parte central de dichas placas, su distribución dista mucho de seguir un patrón geométrico simple.

DISCUSIÓN

La muestra del Fangar que se analizó en detalle corresponde al final de un largo episodio de permanencia de *D. caudata* en las dos bahías del delta del Ebro (aunque las concentraciones fueron inferiores en Alfacs que en Fangar) durante el final de verano y principios del otoño, con más de 2 meses de duración. Si bien en la bahía de Alfacs las concentraciones de *D. caudata* fueron fluctuantes, en la bahía del Fangar hubo una tendencia clara de aumento de las concentraciones celulares en la estación central a lo largo del tiempo, por lo que se considera la población del Fangar analizada en detalle como desarrollada "in situ". Al final del episodio hubo un cambio drástico en la composición del fitoplancton en el Fangar, y se supone que las poblaciones de dinoflagelados anteriores fueron diluidas y exportadas hacia el exterior. El hecho de que en la muestra analizada en detalle únicamente se observó 1 ejemplar de *D. sacculus* refuerza la nula (o muy escasa) interferencia que pudieran haber tenido de otras especies del género *Dinophysis* en relación con las especies en litigio. Las concentraciones celulares de *D. caudata* que se alcanzaron en la muestra analizada se consideran como muy altas para la costa catalana, y cabe considerar a aquella población en reproducción activa. Esta consideración está justificada por la elevada frecuencia de parejas de división cuantificadas en la muestra (7.4% de células en división, teniendo en cuenta únicamente las morfologías *D. caudata*) y la ausencia de tecas vacías en la muestra.

En cuanto a la morfología de las especies involucradas en este trabajo, *D. caudata* Saville-Kent 1881 y *D. diegensis* Kofoid 1907, hay buen número de publicaciones que las consideran (Rampi e Bernhard, 1980; Dodge, 1982; Balech, 1988; Taylor *et al.*, 1995; Steidinger and Tangen, 1996, entre otras), apoyados por dibujos, aunque no se han podido consultar las descripciones originales. En estos trabajos se comenta por un lado que hay confusión entre las dos especies, pero por otro lado se dan argumentos para separarlas. Rampi e Bernhard (1980), consideran dos variedades en *D. caudata*: *D. caudata* Saville-Kent var. *caudata* y *D. caudata* var. *acutiformis* (Pavillard) Kofoid & Skogsberg, diferenciadas principalmente por la convexidad dorsal muy acentuada y por el estrangulamiento posterior poco evidente en la segunda respecto de la primera. Estos mismos autores diferencian a *D. diegensis* Kofoid por tener hipoteca netamente cónica, con margen dorsal ligeramente convexo, prolongada en una punta más o menos aguda (lo cual se contradice mucho con los dibujos que presentan, en los cuales la hipoteca termina en un apéndice caudal de forma parecida a una tetilla elongada o dedo). Dodge (1982) considera a *D. caudata*, sorprendentemente para nosotros y a diferencia de las otras citas, como una especie distintiva (=bien distinta) del género. Balech (1988) comenta sobre *D. caudata* que "es una especie fácilmente distinguible, pero con variaciones bastante grandes", la cual "fue conocida con muchos otros nombres (allieri, inaequalis, semicarinata, etc.) y alguna vez considerada variedad de *D. acuta*". Taylor *et al.* (1995) comentan sobre *D. caudata* que la forma celular es bastante variable, en especial la longitud de la proyección ventral y el grado de la expansión dorsal, y que las células con proyección corta parecen similares a *D. diegensis*.

Steidinger and Tangen (1996) señalan el parecido entre las dos especies (incluso también el de *D. caudata* con *D. tripos*), pero remarcan que *D. diegensis* puede ser distinguida por la forma del cuerpo principal y la aleta sulcal izquierda.

En torno a la identidad de *D. diegensis*, ha habido cierta confusión, debido a la ocurrencia simultánea con *D. tripos* (Moita and Sampayo, 1993) y que los autores citados interpretaron a *D. diegensis* como gameto de *D. tripos*, a diferencia de Reguera *et al.* (1990) que encontraron a *D. diegensis* junto con *D. caudata*. La solución a este problema (Reguera *et al.* 1995) se dio mediante una fotografía de una célula de *D. caudata* conteniendo en su interior a *D. diegensis*.

La diferenciación de *D. caudata* y *D. diegensis* se basa, en síntesis, en la presencia de un apéndice caudal en *D. caudata*, mientras que en *D. diegensis* desaparece la diferenciación del apéndice caudal respecto del cuerpo y la curvatura de los márgenes ventral y dorsal de la hipoteca se hace más suave y la anchura de la hipoteca se va estrechando paulatinamente en dirección antapical. En el análisis detallado efectuado sobre la muestra del Fangar, se ha visto que el contorno de la hipoteca en sus márgenes ventral y dorsal están sujetos a una gran variabilidad, así como también en la forma de la aleta sulcal izquierda. Aunque es posible asignar la mayoría de los ejemplares representados en la Figura 1 a las dos especies en litigio, hay ejemplares intermedios conflictivos cuya adscripción a una u otra morfología no es clara. La variabilidad observada engloba a las dos especies en litigio y además las medidas efectuadas muestran que la variación es continua y lineal. Por consiguiente, toda la variabilidad morfológica descrita para la muestra del Fangar se adscribe a *D. caudata* con la consideración de *D. diegensis* como una forma de la especie anterior, de manera similar a la solución tomada en el caso de *D. sacculus* Stein y *D. reniformis* Pavillard (Zingone *et al.*, 1998). Así, se propone clasificar los morfotipos sin una discontinuidad clara entre el apéndice caudal y el cuerpo como *D. caudata* f. *diegensis* (Kofoid) comb. nov. En relación a los ejemplares pequeños de *D. caudata* encontrados en este estudio, no se descarta que puedan corresponder a fases sexuales (tema discutido más abajo en un contexto más amplio), tales como gametos. Sobre ello se ha de decir que 1) únicamente se encontraron pares, y por lo tanto indicativo de división celular, en los ejemplares grandes, 2) la muestra analizada corresponde a una "fase terminal" del desarrollo de la población y es en estas fases cuando parece más probable ocurrir sexualidad, 3) en las fases iniciales e intermedias del desarrollo durante 2 meses consecutivos en el Fangar no se detectaron formas pequeñas, únicamente la típica forma "caudata", y 4) no se han podido distinguir cigotos, con doble flagelo longitudinal, ya que ello requiere células vivas y nuestras muestras estaban fijadas.

En cuanto al origen de la variabilidad morfológica, el ambiente afecta al tamaño celular en especies de *Dinophysis*, como las citas de células más grandes en áreas de baja salinidad que en áreas de salinidad más alta salinidad y la observación de que las bajas temperaturas tienden a dar células relativamente más grandes (Dodge, 1982). Balech (1988) cita que generalmente los individuos de *D. caudata* de aguas costeras son más toscos, anchos, de apéndice caudal más corto y grueso, y que las paredes tecales también suelen ser más gruesas. Otra fuente de variabilidad morfológica es la división vegetativa (o binaria que ocurre como el proceso más normal de división). Así se han citado variaciones en el contorno celular debidos al crecimiento de la zona intercalar de las valvas en células muy engrosadas (Jacobson and Andersen, 1994) y la debilidad de las nuevas valvas formadas durante o inmediatamente después- de la división vegetativa (Hansen, 1993), además de las bien conocidas variaciones de las aletas cingulares y sulcales, o la presencia de un engrosamiento en el margen dorsal, también en relación con la división vegetativa. La debilidad de las valvas recién formadas podría ser la explicación de las bastante numerosas observaciones de ejemplares en diversas especies de *Dinophysis* con 2 valvas diferentes (Hansen, 1993; Reguera *et al.*, 1995; Delgado *et al.*, 1996;

entre otras). Por otro lado, parte de la variabilidad morfológica en *Dinophysis* podría relacionarse con estadios sexuales, como gametos, cigotos o quistes (McKenzie, 1992; Moita and Sampayo, 1993; Reguera *et al.*, 1995; Delgado *et al.*, 1996; Giacobbe and Gangemi, 1997), aunque en la actualidad este tema no está resuelto. Sobre ello se ha de considerar la observación de ejemplares de tamaño reducido procedentes de células normales mantenidas en pocillos (Delgado *et al.*, 1996). Así, a pesar de que hay evidencia de existir sexualidad en especies de *Dinophysis*, por la observación de células con dos flagelos longitudinales (McLachlan, 1993; Delgado *et al.*, 1996; Giacobbe and Gangemi, 1997), debemos ser precavidos en relación con los hipotéticos gametos y quistes ya que su existencia no está demostrada con claridad. Los hipotéticos gametos son ejemplares de pequeño tamaño que se encuentran simultáneamente con las células normales, en ocasiones formando parejas mediante unión ventral, en las cuales no se sabe distinguir de si es un proceso sexual o de predación de una célula sobre otra lo que está ocurriendo. Ello apunta claramente la necesidad de un mayor conocimiento de la biología del género *Dinophysis* para poder comprender toda la variabilidad morfológica observada en las muestras naturales.

BIBLIOGRAFÍA

- Balech, E. 1988. Los Dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. Pub. Esp. Inst. Esp. Oceanogr. N^o1. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, 310 p.
- Bravo, I., Reguera, B., and Fraga, S. 1995a. Description of different morphotypes of *Dinophysis acuminata* complex in the galician Rias in 1991. In: Harmful Marine Algal Blooms (P. Lassus, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou eds). Lavoisier, Paris. pp. 21-26.
- Bravo, I., Delgado, M., Fraga, S., Honsell, G., Lassus, P., Montresor, M., and Sampayo, M.A. 1995b. The *Dinophysis* genus: toxicity and species definition in Europe. In: Harmful Marine Algal Blooms (P. Lassus, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou eds). Lavoisier, Paris. pp. 843-845.
- Delgado, M., Garcés, E., and Camp, J. 1996. Growth and behaviour of *Dinophysis sacculus* from NW Mediterranean. in: Harmful and Toxic Algal Blooms (T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo eds.). IOC-Unesco. pp. 261-264.
- Dodge, J.D. 1982. Marine Dinoflagellates of the British Isles. HMSO, London. 303 p.
- Fritz, L. and Triemer, R.E. 1985. A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. J. Phycol., 21: 662-664.
- Giacobbe, M.G. and Gangemi, E. 1997. Vegetative and sexual aspects of *Dinophysis pavillardii* (Dinophyceae). J. Phycol., 33: 73-80.
- Hallegraeff, G.M. 1995. Taxonomic Principles. In: Manual on Harmful Marine Microalgae (G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson and A.D. Cembella eds.). IOC Manuals and Guides No.33. UNESCO, Paris. pp. 279-282.
- Hansen, G. 1993. Dimorphic individuals of *Dinophysis acuta* and *D. norvegica* (Dinophyceae) from Danish waters. Phycologia 32(1), 73-75.
- Jacobson, D.M., and Anderson, R.A. 1994. The discovery of mixotrophy in photosynthetic

- species of *Dinophysis* (Dinophyceae): light and electron microscopical observations of food vacuoles in *Dinophysis acuminata*, *D. norvegica*, and two heterotrophic dinophysoid dinoflagellates. *Phycologia* 33(2): 97-110.
- McKenzie, L. 1992. Does *Dinophysis* (Dinophyceae) have a sexual life cycle?. *J. Phycol.* 28: 399-406.
- McLachlan, J.L. 1993. Evidence for sexuality in a species of *Dinophysis*. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea* (T.J. Smayda and Y. Shimizu eds.). Elsevier B.V. pp. 143-146.
- Moita, M.T., and Sampayo, M.A. de M. 1993. Are there cysts in the genus *Dinophysis*?. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea* (T.J. Smayda and Y. Shimizu eds.). Elsevier B.V. pp. 153-157.
- Rampi, L., e Bernhard, M. 1980. Chiave per la Determinazione delle Peridinee Pelagiche Mediterranee. CNEN RT/BIO, Roma. 187p.
- Reguera, B., Bravo, I., and Fraga, S. 1990. Distribution of *Dinophysis acuta* at time of a DSP outbreak in the rias of Pontevedra and Vigo (Galicia, NW Spain). *International Council for the Exploration of the Sea, C.M.* 1990/L:14.
- Reguera, B., Bravo, I., and Fraga, S. 1995. Autoecology and some life history stages of *Dinophysis acuta* Ehrenberg. *J. Plankton Res.* 17(5), 999-1015.
- Steidinger, K.A. and Tangen, K. 1996. Dinoflagellates. In: *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates* (Tomas, C.R. ed.). Academic Press, San Diego. pp 387-598.
- Taylor, F.J.R., Fukuyo, Y., and Larsen, J. 1995. Taxonomy of Harmful Dinoflagellates. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae* (G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson and A.D. Cembella eds.). IOC Manuals and Guides No.33. UNESCO, Paris. pp. 283-317.
- Zingone, A., Montresor, M., and Marino, D. 1998. Morphological variability of the potentially toxic dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyceae) and its taxonomic relationship with *D. pavillardii* and *D. acuminata*. *Eur. J. Phycol.* 33: 259-273.

DISTINTOS ESTADIOS DEL CICLO VITAL Y EL CICLO CELULAR DE Dinophysis caudata SAVILLE-KENT Y SU RELACIÓN CON Dinophysis diegensis KOFOID

Beatriz Reguera, Isabel Ramilo y Elena Ávila.

Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Aptdo. 1552. 36280 Vigo.

RESUMEN

Se describen observaciones originales sobre el ciclo vital y el ciclo celular de *Dinophysis caudata* Saville Kent, componente del complejo de especies de *Dinophysis* agente de episodios crónicos de presencia de toxinas diarreicas en los bivalvos (DST) en las Rías Bajas Gallegas. Se confirmó la formación de "células pequeñas" a partir de morfotipos normales mediante un proceso de división "depauperante" que daba lugar a dos células hijas dimórficas. La posterior separación de las células dimórficas y degeneración de la porción de placa hipotecal tipo caudata que sobresale de la placa tipo diegensis daba lugar a dos células hijas con morfotipo idéntico al de células descritas como *Dinophysis diegensis* Kofoid. También se observaron formas intermedias, que darían lugar a células de difícil adscripción a una u otra morfoespecie, y parejas aparentemente conjugadas de *D. caudata*/*D. diegensis*. Se sugiere que la formación de células pequeñas (de *D. diegensis*) es una división "depauperante" que puede dar lugar a la diferenciación de gametos, lo cual apoya hipótesis previas (Reguera *et al.*, 1990 y 1995; Moita and Sampayo, 1993) de que *D. diegensis* es un gameto de *D. caudata*. Por primera vez se estiman tasas de división in situ de esta especie, y se describen observaciones nuevas sobre quistes putativos y tétradas de células de *D. caudata* que se sugiere podrían resultar de las dos divisiones meióticas que siguen a la germinación de quistes. Las mediciones de individuos totalmente desarrollados de *D. caudata* del otoño de 1994 y 1997 no presentaron diferencias significativas, mostrando morfotipos muy estables. El morfotipo "adulto" de las costas gallegas sería similar al *D. caudata* var *abbreviata* descrito por Jorgensen (1923), y las variaciones morfológicas registradas serían justificables por el proceso que se describe de formación de células pequeñas, formas intermedias e incluso el desarrollo posterior de *D. diegensis* hasta convertirse de nuevo en una forma vegetativa típica de *D. caudata*.

INTRODUCCIÓN

Dinophysis caudata es un componente habitual de la comunidad fitoplanctónica de las Rías Bajas gallegas. Células aisladas de esta especie se pueden detectar entre primavera y otoño en los arrastres verticales planctónicos que se realizan en los programas de monitoreo del medio marino y de obtención de series temporales en Galicia. Las concentraciones máximas observadas oscilan entre 10^2 - 10^3 cel · l⁻¹ y excepto años excepcionales aparecen normalmente en otoño (septiembre-octubre) cuando el cambio de régimen de vientos y el fin de la estación de afloramiento dan lugar a importantes transportes transversales a la plataforma,

bloqueo de la circulación estuárica positiva habitual en las rías y hundimiento de agua de la plataforma al interior de las rías (Figueiras *et al.*, 1990; Fraga *et al.*, 1988). Este proceso físico, muy marcado en otoño, también puede darse durante períodos de relajación en la temporada de afloramiento (Reguera *et al.*, 1996), cuando se producen hundimientos más transitorios que favorecen la selección de *Dinophysis* spp y otros dinoflagelados nadadores en la capa superficial de agua, y el hundimiento temporal de las diatomeas del máximo subsuperficial de clorofila.

D. caudata, pues, forma parte del conjunto de especies de *Dinophysis* cuya ocurrencia ocasiona episodios crónicos de presencia de toxinas diarreas en los bivalvos (DST) en las Rías Bajas, principalmente entre finales de verano y primera mitad del otoño (septiembre-octubre). No obstante la contribución de esta especie a los episodios tóxicos pudiera ser nimia si se consideran las moderadas concentraciones que alcanzan sus poblaciones (5-25% del total de *Dinophysis* spp), y la baja toxicidad por célula detectada en la única muestra analizada hasta la fecha de individuos aislados por micromanipulación (Fernández *et al.*, este volumen). La habitual escasez de *D. caudata* en aguas templadas, y la carencia de cultivos establecidos justifica las grandes lagunas de conocimiento que existen sobre el ciclo vital, ecología y toxicología de esta especie.

Jørgensen (1923), tras múltiples observaciones en muestras recogidas durante las "Danish Oceanographic Expeditions" en el Mediterráneo y mares adyacentes, entre 1908-1910, describe a *D. caudata* como una especie de morfología muy variable, en parte debido a la inmigración de varias formas, y en parte a que esta especie es de una gran plasticidad y se adapta a amplios cambios de condiciones hidrográficas, especialmente de salinidad. Ello explicaría la gran lista de sinónimos, variedades (pedunculata, abbreviata, allieri...) y combinaciones nuevas aplicadas a los distintos morfotipos (Kofoid and Skogsberg, 1928) de la "morfoespecie" que denominamos actualmente *D. caudata*. Jørgensen consideró que *D. caudata* constituía parte de la flora autóctona del Mar Mediterráneo, donde podía observarse a lo largo del año, y con frecuencia constituía la especie de *Dinophysis* más abundante en verano, cuando se podían observar manchas en distintas regiones. Además, sugirió que los incrementos de esta especie observados en el Mar de Alborán en otoño podrían explicarse por la existencia de un transporte de masas de agua, a través del Estrecho de Gibraltar, del Atlántico al Mediterráneo.

Taylor (1976), en su estudio de dinoflagelados de la "Indian Expedition" también señala que *D. caudata* es una especie de morfología muy variable, lo cual habría conducido a muchos autores a reconocer distintas taxa dentro del conjunto que forma la especie según Kofoid & Skogsberg. Taylor encontró esta especie en abundancia en estaciones próximas a la costa, la describió como estrictamente nerítica y común en aguas desde tropicales hasta cálido-templadas. También observó que *D. caudata* y las otras dos especies más próximas del género, *D. tripos* y *D. miles* se encontraban frecuentemente unidas en parejas, tripletes, o cuadrupletes, sugiriendo que posiblemente fuera resultado de una separación incompleta después de la división vegetativa o fisión.

En años recientes se han reportado mareas rojas de *D. caudata*, causantes de mortalidades de peces, en el Golfo de Tailandia y en el Mar Interior de Seto (Japón) (Okaichi, 1967). Santhanam and Srinivasan (1996) observaron densas floraciones ($1.5 \cdot 10^6$ cel \cdot l⁻¹) de esta especie en la Bahía de Tuticorin (sur de India) a 30.5 °C y salinidad 35 psu, en el mes de mayo, en una zona de elevados aportes de alcantarillado y Tahri-Joutei (1998) la señaló como un potencial agente de episodios DST en la costa mediterránea de Marruecos próxima a Gibraltar, donde detectó concentraciones de $1.5 \cdot 10^3$ cel \cdot l⁻¹. *D. caudata* también es frecuente

en el conjunto de especies de *Dinophysis* asociadas a episodios DST en el Adriático norte (Boni *et al.*, 1993).

La existencia de dimorfismo y estadios sexuales putativos en el ciclo vital de *Dinophysis* ha sido señalada por diversos autores en distintas especies del género (ver Tabla I). En el caso de *D. caudata*, Reguera *et al.* (1990 y 1995) observaron células similares a *D. diegensis* formadas aparentemente a partir de una célula vegetativa de *D. caudata* e hipotetizaron que

Tabla I: Relación de *Dinophysis spp* en las que se ha observado dimorfismo, nombre asignado a la "forma pequeña" correspondiente y referencia.

<i>Dinophysis caudata</i> (n = 50)	Octubre 94	Octubre 97
Longitud(L) Media \pm SD Rango	90 \pm 4.2 79 - 100 μ m	90 \pm 4.0 82 - 103 μ m
Profundidad (D) Media \pm SD Rango	47 \pm 4.0 41 - 65 μ m	46 \pm 3.8 41 - 59 μ m
L : D Media \pm SD Rango	1.9 \pm 0.1 1.71 - 2.21	2.0 \pm 0.2 1.72 - 2.21

podría tratarse de potenciales gametos de esta última al igual que *D. dens* lo sería de *D. acuta*. Moita & Sampayo (1993) sugirieron que *D. diegensis* es un posible gameto de *D. tripos* ó *D. caudata*. Estos últimos autores también mostraron una serie de imágenes que sugerían un proceso de formación de quistes de resistencia en poblaciones naturales de *D. tripos*.

La variabilidad morfológica que presentan las distintas especies de *Dinophysis* constituye un quebradero de cabeza para los expertos encargados de identificación de especies en programas de seguimiento de fitoplancton potencialmente tóxico, máxime si (como parece ser el caso en el par *D. acuminata/D. sacculus*) existe un "continuum" entre dos morfoespecies, apareciendo individuos difíciles de adscribir a una u otra "especie" (Bravo *et al.*, 1995).

En el presente trabajo se describen nuevas observaciones sobre *D. caudata* y *D. diegensis* obtenidas durante estudios "in situ" del ciclo celular de *D. caudata* que apoyan hipótesis previas sobre la conespecificidad de ambas morfoespecies, y sobre el potencial papel de *D. diegensis* como gameto de la primera. También se describen observaciones de especímenes que sugieren la existencia de procesos de formación de quistes de resistencia y germinación de quistes en *Dinophysis caudata*. Los resultados aquí presentados son un resumen de otros más detallados que se documentarán con fotografías en una revista especializada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las observaciones descritas en este trabajo se hicieron a partir de muestras tomadas dentro del proyecto "Radiales" del IEO, en el que rutinariamente se fijan inmediatamente con lugol las muestras discretas tomadas a distintas profundidades con botellas Niskin, y con formol neutro los arrastres verticales colectados con malla de 10-20 μm . Otras muestras proceden de muestreos intensivos de 24-36 h en una estación fija para estudios del ciclo celular y determinación de tasas de división in situ de especies de *Dinophysis* realizados del 27 al 28 de octubre de 1994, y del 15 al 16 de octubre de 1997. En estos muestreos intensivos se toman muestras cada 1-2 h, se retiene la fracción de 20-100 μm en arrastres verticales que se fijan con formol neutro (o se resuspenden en metanol helado) y se toman muestras discretas a distintas profundidades con botella para establecer la variación diurna de distribución vertical de las especies de interés. Para estimación de la tasa de división mínima (μ_{min}) se siguió la modificación del modelo del índice mitótico de McDuff and Chisholm, (1982) propuesta por Vaulot (1992) para casos en que no se conocen los tiempos de duración de las distintas fases del ciclo celular:

$$\mu_{\text{min}} = \ln (1 + f_{\text{max}})$$

en la que f_{max} es la frecuencia máxima de células en fase de citoquinesis + células recién divididas registrada en las muestras a lo largo de un ciclo celular completo.

Ambos modelos utilizan criterios morfológicos (cambios de morfología nuclear y celular) para determinar la frecuencia de células de la población total que están en proceso de división o acaban de dividirse. En el caso de *Dinophysis caudata*, las parejas recién divididas (y también individuos recién divididos, por separación accidental de las parejas causadas por la manipulación) se distinguieron de los normales por el desarrollo incompleto de la aleta sulcal izquierda: una de las células hijas carece de la costilla tercera (R3), y otra de la costilla primera (R1). Se examinaron entre 250 y 500 individuos de cada muestra. La frecuencia de células (f) de *D. caudata* que habían sufrido división vegetativa o fisión se estimó según la fórmula:

$$f = (P_R + I_R / 2) / N$$

$$N = 2 P_C + P_R + I_C + I_{R/2}$$

donde N= población total de individuos/parejas de *D. caudata* examinados; P_R = nº de parejas en fase de división o recién divididas; I_R = nº de individuos recién divididos; P_C = nº de parejas (P) e I_C = nº de individuos que han completado su desarrollo.

Las observaciones morfométricas se realizaron al microscopio óptico invertido (400 X), midiéndose la longitud de la placa hipotecal (L), y la profundidad máxima (D) en 50 individuos "adultos", completamente desarrollados, de cada episodio, en muestras procedentes de la misma hora del día (aprox. 6.30 GMT) .

RESULTADOS

Descripción morfológica de Dinophysis caudata Saville Kent

Especie del género *Dinophysis* de talla media-grande (70 - 110 μm) con un prominente

proceso posterior en forma de dedo. En los especímenes gallegos, en visión lateral izquierda, el margen ventral es recto hasta la altura de la tercera costilla (R3) y luego presenta un brusco giro hacia la región ventral en un tramo que concluye en la base de la aleta sulcal izqda. donde comienza la formación del proceso antiapical. El margen dorsal es convexo, y se curva gradualmente hasta llegar a la base (o zona más ancha) del proceso. Las principales fuentes de variabilidad en la especie son la longitud y forma del proceso antiapical, la proporción entre el largo y la profundidad de la célula, y la envergadura de la aleta sulcal izquierda. La ornamentación de las placas hipotecales es con areolas exagonales con un poro central en cada areola (tipo E de Hallegraeff and Lucas, 1988). Los morfotipos observados en muestras de la costa gallega se asemejan a la var. *abbreviata* de Jorgensen (1923). Son morfotipos robustos $L = 90 \mu\text{m}$, $D = 46 \mu\text{m}$, poco estilizados, con un cociente L:D de 1.7 - 2.2, y proceso antiapical relativamente corto (ver Tabla II). No se observaron diferencias significativas en la morfología de individuos de *D. caudata* procedentes de dos episodios, distanciados 3 años entre sí, pero desarrollados en la misma época otoñal (segunda quincena de octubre), y en muestras tomadas a la misma hora del día (6.30 GMT).

Estadios de la División Vegetativa ó Fisión Celular

Al igual que otras especies de *Dinophysis* (Reguera *et al.*, 1995; Garcés *et al.*, 1997), *D. caudata* mostró una división in situ "en fase", es decir, cada día se divide tan sólo una fracción (f) de la población total, pero lo hacen todas en un intervalo de tiempo restringido (Chisholm, 1981). Durante los muestreos intensivos tomados cada 1-2 h se observaron parejas que tras haber completado la citoquinesis se encontraban en fase de apertura con las 2 células hijas unidas por el margen dorsal formando un ángulo $<90^\circ$, y parejas que ya habían completado la apertura y las dos células hijas se encontraban en el mismo plano pero aún no habían completado el desarrollo de las listas sulcales, presentando cada célula hija tan sólo la mitad superior (entre la primera y segunda costilla) ó la mitad inferior (entre la segunda y tercera costilla) de la lista sulcal izquierda. Una vez completado el desarrollo de las listas sulcales, una importante proporción de células de *D. caudata* parecen mantenerse unidas por el margen dorsal durante un largo período de tiempo, aunque también se observan células individuales con la lista sulcal izquierda completa ó con desarrollo incompleto. Las parejas completas resultantes de división vegetativa en las horas previas muestran la lista sulcal izquierda con una mitad más "envejecida" que presenta reticulación, y otra mitad más "joven" de aspecto hialino.

<i>Dinophysis caudata</i> (n = 50)	Octubre 94	Octubre 97
Longitud(L) Media \pm SD Rango	90 \pm 4.2 79 - 100 μm	90 \pm 4.0 82 - 103 μm
Profundidad (D) Media \pm SD Rango	47 \pm 4.0 41 - 65 μm	46 \pm 3.8 41 - 59 μm
L : D Media \pm SD Rango	1.9 \pm 0.1 1.71 - 2.21	2.0 \pm 0.2 1.72 - 2.21

Tabla II. Medidas de individuos de *D. caudata* durante dos episodios de DST en las Rías Bajas Gallegas (n = 50 en cada episodio).

En las figuras 1A y 1B se muestra la distribución de la suma de frecuencias de células en proceso de citoquinesis y células recién divididas durante los dos muestreos intensivos in situ desarrollados en octubre de 1994 y del 1997. Si bien la tasa de división celular es inferior en el muestreo de 1994 que en el de 1997 (μ min 0.17 y 0.21 respectivamente), los valores significativos de f total (superiores a 3%) se distribuyen entre las 5 h y las 15 h, con un máximo muy marcado entre las 9.00 y las 11.00 h (GMT) en los dos años de muestreo.

Formación de células de D. diegensis, y parejas conjugadas D.diegensis/D.caudata

Durante los muestreos intensivos en estudios del ciclo celular se observaron parejas dimórficas de *D. caudata* que parecían haber sufrido una "fisión reductora". Cada célula hija tenía una mitad de la hipoteca correspondiente a la de una célula vegetativa de *D. caudata*, y la otra mitad correspondiente a una célula de *D. diegensis*. Se observaron distintos grados de reducción en las células hijas formadas, así como parejas intermedias en las que resultaba conflictivo adscribir las células a *D. caudata* ó a *D. diegensis*. La porción de hipoteca "tipo caudata" que sobresalía de la porción "tipo diegensis" en cada célula hija, unida a su pareja por el puente megacítico, aparecía en algunos individuos más o menos degenerada, unas veces después de la separación de las dos células hijas dimórficas, y otras veces antes de la separación, habiendo desaparecido por completo en las células de *D. cf diegensis* totalmente desarrolladas, con la aleta sulcal izda. completa. Este desarrollo completo se observa en unos casos antes de la separación de las células hijas, mientras que en otros casos (quizás separados por la manipulación del arrastre) se pueden observar individuos de *D. diegensis* con la lista sulcal izquierda incompleta, o una de las dos células hijas dimórficas, aún con restos de la hipoteca correspondiente a *D. caudata*, y la lista sulcal izquierda incompleta. En todos estos casos las células en pareja aparecen unidas por el margen dorsal.

En la figura 1C se presenta la distribución de células de *D. diegensis* encontradas en las muestras integradas de 1994, diferenciándose los casos de células en formación (parejas ó individuos dimórficos, con la lista sulcal izda incompleta), ó recién divididas (lista sulcal izda. incompleta). La formas pequeñas constituyeron un pequeño porcentaje de la población total de *D. caudata* (max. 6%). La distribución temporal de parejas dimórficas, y células pequeñas recién divididas es similar a las de parejas de células en fase de división vegetativa normal y células recién divididas.

En algunas muestras se pudieron observar algunas parejas conjugadas aisladas de *D. caudata* y *D. diegensis* fuertemente unidas por el margen ventral a la altura del poro flagelar, entre la primera y la segunda costilla de la aleta sulcal izquierda. Las dos células aparecían fuertemente unidas y no se pudieron separar incluso cuando fueron manipuladas con micropipeta y trasladadas de la cámara de sedimentación a un portaobjetos.

Observación de putativos planozigotos y quistes en germinación, y de tétradas.

En una muestra de arrastre fitoplanctónico vivo, constituido fundamentalmente por diatomeas (*Skeletonema costatum*, *Pseudo-nitzschia* spp.), a principios de diciembre 1994, se observó un espécimen con un movimiento rotatorio lento análogo al de "danza de sexual" de gametos en fusión, de aspecto muy similar a los presentados en el trabajo de Moita y Sampayo (1993) como quiste putativo de *D. tripos*. Esta forma se recogió con una micropipeta y se transfirió a un porta para ser fotografiado. Posteriormente se colocó en un pocillo de una placa de cultivo de tejidos, relleno con medio K, de la que se sacaba eventualmente para obtener más fotografías. La forma inicial era ovalada con un pequeño proceso en la región posterior, y en su interior se distinguía una forma similar a una célula vegetativa de *D. caudata*. Tenía una cubierta

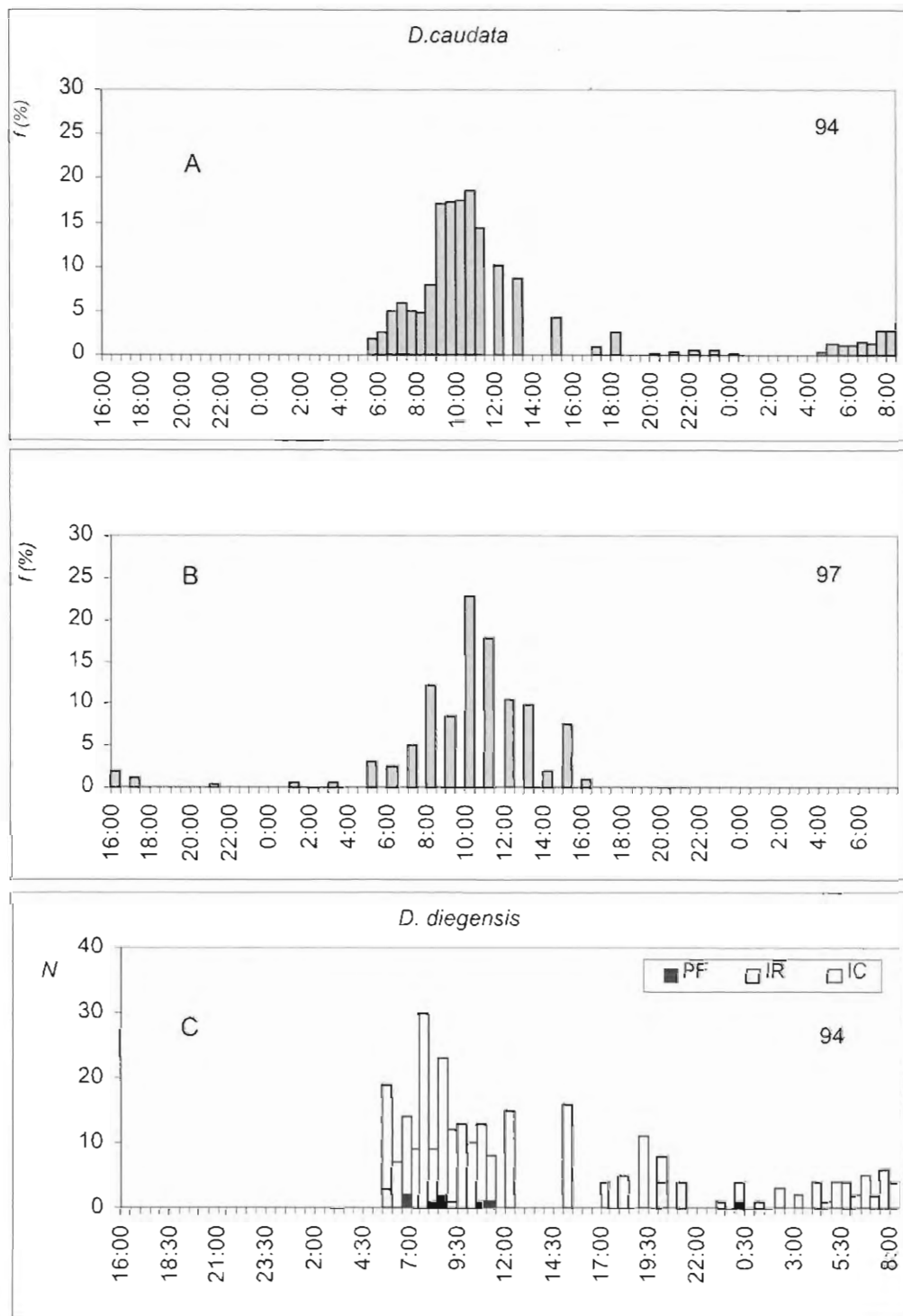


Figura 1. Distribución de frecuencias (1%) de células de *D. caudata*, en fase de división ó recién divididas, en el tiempo: 1A) en Octubre de 1994. 1B) en Octubre de 1997. 1C) Distribución de células pequeñas (*D. cf. diegensis*) en fase de formación (PF), recién divididas (IR) y completamente desarrolladas (IC) durante el ciclo de octubre de 1994.

de placas sueltas, hialinas, que recordaban a *Helgolandinium (Fragillidium) subglobosum* cuando está en fase de formación de quiste y emite las tecas sueltas que se mantienen alrededor pero separadas del contorno del quiste. En el caso del quiste putativo de *D. caudata*, estas placas hialinas estaban casi tocando el contorno del quiste en formación. Posteriormente la pared interior de fué contrayendo, y ya en la séptima semana se habían desprendido las placas envolventes iniciales. Este potencial planozigoto en aparente proceso de formación de hipozigoto se mantuvo vivo ocho semanas, hasta sufrir una fuerte contaminación bacteriana.

En muestras previas fijadas, de principios de otoño del 94, se observaron otros individuos de morfología análoga a los quistes putativos descritos en el párrafo anterior, en los que se distinguía una fisión del contenido citoplasmático; en las mismas muestras se encontraron tétradas de *D. caudata* que se mostraban en visión antiapical, observándose los cuatro grupos de aletas cingulares (anteriores y posteriores) de la tétrada dispuestas como los cuatro pétalos de una flor.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La variabilidad de tamaño y forma en especies de *Dinophysis* ha sido ampliamente discutida y documentada en el caso de *Dinophysis acuminata*. Solum (1962) sugirió que estos cambios de forma eran la respuesta a condiciones cambiantes de salinidad y temperatura, y que las células aclimatadas a salinidades inferiores a 25 ppt eran más grandes. López (1955), en su amplio trabajo con *Ceratium tripos*, encontró una correlación inversa entre temperatura y tamaño celular. Bravo *et al.* (1995a) sugirieron una respuesta similar para el complejo *Dinophysis acuminata* en las Rías Bajas gallegas; estos autores ilustraron un ejemplar de *D. acuminata* que presentaba bandas intercalares en la hipoteca, como si indicara distintas etapas de crecimiento, y su interpretación fue que el tamaño y forma de la teca parecen responder a condiciones ambientales cambiantes..

Balech (1988), basado en sus observaciones en el Atlántico Sudoccidental, comentó que si bien *D. caudata* es una especie más o menos termófila, parece ser muy tolerante, pues se la puede encontrar en aguas de temperaturas y salinidades muy variadas. Balech registró esta especie en abundancia tanto en zonas neríticas como oceánicas, y sugirió que los individuos de aguas más o menos costeras eran más toscos, anchos, de paredes más gruesas, y proceso antiapical más corto y grueso. En el caso de las costas gallegas, las observaciones sobre *D. caudata* están basadas en organismos recolectados a principios de otoño, la única época del año en que se detectaron en concentraciones apreciables (superiores a 200 cel · l⁻¹). Los individuos muestreados en octubre de 1994 y octubre de 1997, todos ellos adultos y con las listas sulcales totalmente desarrolladas, presentaron una morfología muy uniforme, y que se correspondería con los individuos costeros, toscos y poco estilizados sensu Balech, o con la variedad *abbreviata* ilustrada por Jorgensen (1923) de las costas de Málaga. En este muestreo no se incluyó el pequeño porcentaje de células similares a *D. diegensis* y formas intermedias entre éste y *D. caudata*. Las dimensiones de longitud y profundidad de los individuos muestreados se mantuvieron dentro de los rangos dados para *D. caudata*; había variaciones de tamaño, pero la forma era estable y respondiendo a un morfotipo común.

En diferentes muestreos (en los que *D. caudata* era abundante) se pudo observar una pequeña proporción (1-5 %) de individuos dimórficos en los que se adivinaba un proceso de división reciente, ya que se trataba de parejas o individuos con la aleta sulcal izquierda incompleta, dando lugar a individuos similares a los descritos como *D. diegensis*. Se observaron también situaciones intermedias, en las que la placa menor de la célula dimórfica presentaba rasgos difícil de adscribir a *D. caudata* o *D. diegensis*: el tamaño era intermedio entre

los rangos dados para estas dos especies, y se observaba un progresivo estiramiento de la región del margen dorsal comprendida entre el final de la región dorsal media-posterior y la base (zona más ancha) del proceso antiapical, región que aparece bruscamente curvada en *D. caudata*. La región sobresaliente de la placa hipotecal más grande, en los individuos dimórficos, aparece en algunos casos borrosa, como si hubiera comenzado a degenerar hasta adaptarse al nuevo tamaño impuesto por la mitad más pequeña. La frecuencia de parejas dimórficas se distribuye en el tiempo de forma similar a la frecuencia de células vegetativas en procesos de división asexual normal. Estas observaciones, unidas a la de parejas conjugadas *D. caudata*/*D. diegensis* firmemente unidas por el margen dorsal, a la altura del poro flagelar, quistes putativos en formación, quistes putativos en una aparente primera división meiótica, y tétradas de células (que pudieran permanecer unidas tras la segunda división meiótica) nos conducen a considerar que estos morfotipos "anómalos" y las células dimórficas no son sino distintos estadios del ciclo vital de esta especie que forman parte de la reproducción sexual, y en concreto del proceso de formación de gametos anisógamos. Así pues, bajo determinadas condiciones ambientales (y quizás factores intrínsecos de la población) un porcentaje variable de la población (normalmente muy bajo, entre 1 y 5%) sufriría una división distinta, conducente a la formación de células pequeñas (putativos gametos). Las células dimórficas intermedias parecen indicar que esta potencial "gametogénesis" no es un proceso de "no retorno" en el que se llega a una pequeña célula final, sino que el proceso se puede detener en un estadio intermedio. Las células de formas intermedias, ya totalmente desarrolladas, con las dos hipotecas iguales y la lista sulcal izquierda completa podrían proceder de :

- a) Células dimórficas que alcanzaron una reducción "intermedia" ;
- b) Células pequeñas, similares a *D. diegensis* que han aumentado de tamaño y van camino de convertirse en células vegetativas normales por:
 - haberse recuperado las condiciones adecuadas de crecimiento,
 - haberse aclimatado la población a las nuevas condiciones, o simplemente por
 - no haber encontrado la pareja compatible para la conjugación.

En cualquiera de los casos, estos procesos justificarían la presencia, en una población madura que ha estado sometida a condiciones ambientales cambiantes, de un continuum de tamaños y formas intermedias entre *D. caudata* y *D. diegensis* análogo a las observaciones de Delgado *et al.* (este volumen) en una muestra en aguas Catalanas.

La formación de células pequeñas en dinoflagelados ha sido extensamente revisada por Silva and Faust (1995). En algunos casos las células pequeñas se forman por gemación. Silva (1971) observó que en el proceso de gemación de *Gyrodinium instriatum* parte del núcleo se fragmentaba y posteriormente quedaba envuelto en su propia membrana celular. Partensky and Vaulot (1989) describieron un proceso de gemación en *Gymnodinium cf. nagasakiense* como una división atípica y de carácter no sexual. El ciclo celular de gemación era un proceso separado temporalmente de la división vegetativa, y estos autores lo interpretaron como una forma de división acelerada que la población podría explotar bajo determinadas condiciones ambientales. En el caso de *Dinophysis* spp, la formación de células pequeñas sigue un patrón temporal similar al de división vegetativa normal, y excepto años excepcionales (MacKenzie, 1992) las células pequeñas constituyen una pequeña fracción de la población total, lo cual no concuerda con una estrategia de obtención de mayor tasa de división; no obstante ambos tipos de división pueden presentar sus máximos espacialmente segregados en la columna de agua. Las células pequeñas en *Dinophysis* spp se forman en un proceso de división que da dos células hijas idénticas pero de tamaño reducido y forma distinta que las células vegetativas normales. Además, en células de *D. acuminata* teñidas con DAPI se pudieron observar ejemplares con una "anómala" localización del núcleo, cerca de la región del poro flagelar (Reguera *et al.*, 1996).

Existen numerosas observaciones que evidencian la "plasticidad" de las hipotecas de *Dinophysis*. Delgado *et al.* (1996), en células aisladas en placas de cultivo de tejidos, observaron que las células grandes de *D. sacculus* podían dar lugar a células pequeñas, pero también lo contrario. Reguera (datos no publ.) observó procesos similares en *D. acuminata*: poblaciones de aspecto homogéneo de esta especie, mezcladas con las otras especies acompañantes del medio natural y mantenidas en laboratorio, daban lugar 4-6 días más tarde a un auténtico abanico de tallas y formas. Los resultados en grupos de 10-15 células de tamaño y forma homogéneos, aisladas y mantenidas en placas de pocillos con medios de enriquecimiento fueron similares. En estos experimentos también se observaron parejas conjugadas de organismos de distinto tamaño, a veces en planos perpendiculares, en aparente danza de gametos, y casos aislados de "engullimiento", en que la célula más grande parece estar tragándose a la pequeña a través de la región epitecal. No obstante, no se llegó a alcanzar la formación de quistes, y al cabo de varias semanas se recuperaba la homogeneidad de tallas inicial. Estas observaciones parecen indicar que *Dinophysis* reacciona con gran rapidez a los cambios ambientales, dando lugar a células pequeñas que exhiben una distinta movilidad, y que presumiblemente se comportarán como gametos en condiciones que favorezcan la conjugación y posterior fusión de núcleos y citoplasma. Las observaciones de Delgado *et al.* (1996) y Reguera (no publ.) muestran que el proceso de formación de células pequeñas es reversible, es decir, los potenciales gametos pueden "desdiferenciarse", una vez superado el efecto del factor que indujo a estos cambios, y convertirse en células de mayor tamaño similares a las células vegetativas originales o incluso con un tamaño intermedio que correspondería al de formas intermedias de difícil clasificación.

La formación de tríadas y tétradas como resultado de las dos primeras divisiones meióticas tras la germinación del quiste ha sido ilustrada en cultivos de *Prorocentrum micans* (Bhaud *et al.*, 1988) y *Prorocentrum lima* (Faust, 1993). Taylor (1976) describe la presencia de tétradas como una observación frecuente en muestras de *D. caudata* y *D. tripos* procedentes de zonas costeras tropicales en el océano Índico. Kofoid and Skogsberg (1928) creen que el mantenimiento de las células unidas en parejas podría ser una estrategia de *D. caudata*, *D. tripos* y *D. miles* (a quienes reunieron en el grupo *caudata*) para mantener su flotabilidad en aguas cálidas estratificadas. En muestras de la costa gallega, estas tétradas se han observado tan sólo ocasionalmente, en un año de abundancia excepcional y coincidiendo con la ocurrencia de potenciales quistes en fase de primera división meiótica. Además, no se observaron tétradas cuando se mantuvieron en laboratorio, sin aireación, densos arrastres de poblaciones naturales ricas en *D. caudata* durante varios días, lo cual sería de esperar si se trata de parejas que se mantuvieron unidas tras una segunda generación en un medio muy estable. Tampoco se observaron tétradas en las muestras de los dos ciclos celulares descritos en este trabajo, y en el que se revisaron cientos de células de *D. caudata* a distintas horas del día. Si fuera que en aguas menos estables se mantienen unidas las tétradas procedentes de una simple división de una pareja vegetativa normal, tendría que haberse observado algún caso en las horas de máxima división vegetativa. Se sugiere, pues, que las tétradas observadas serían un eslabón más del ciclo vital no descrito de esta especie. Las observaciones de Taylor (1976) corresponderían a *D. caudata* en zonas tropicales de crecimiento óptimo para esta especie y con frecuente germinación de quistes. Tras todo lo expuesto, se concluye que :

- *Dinophysis caudata* presenta una división en fase, presentando valores mínimos de μ comparables a los de las otras especies de *Dinophysis* que co-ocurren con esta;
- El morfotipo vegetativo de *D. caudata* presente en las costas gallegas presenta una forma muy estable, comparable al *D. caudata* var. *abbreviata* de Jorgensen (1923), con variaciones en sus dimensiones que entran en el rango de descripción de la especie;

- La formación de "células pequeñas", proceso que sólo desarrolla un pequeño porcentaje de la población, y en periodos coincidentes con el de la división vegetativa normal, constituye la principal fuente de variabilidad que da lugar a células similares a *D. diegensis*, y células intermedias entre *D. caudata* y *D. diegensis*. *D. diegensis*, pues, es un estadio del ciclo vital de *D. caudata*;
- La formación de parejas conjugadas *D. caudata* /*D. diegensis*, y putativos procesos de formación/germinación de quistes, y observación de tétradas, apoyan la existencia de una fase sexual en el ciclo reproductor de *D. caudata*.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al "Centro de Control da Calidade do Medio Mariño" (Xunta de Galicia) por sus alertas de la presencia de especies potencialmente tóxicas y toxicidad en los bivalvos, que constituyen un apoyo logístico imprescindible para nuestro trabajo; a Elena Ávila por su apoyo técnico y a la tripulación del B.O. "J. M.. Navaz" por su constante servicio en la recogida de arrastres fitoplanctónicos siempre que fueron requeridos. Este trabajo ha sido financiado con fondos de los proyectos MAR95-1791 y MAR98-0978 de la CICYT, y del proyecto MAS3 CT98-0188 de la Comisión Europea.

REFERENCIAS

- Balech, E. (1988). Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr., 1: 310 p.
- Bardouil, M., Berland, B., Grzebyk, D., and Lassus, P. (1991). L'existence de kystes chez les Dinophysales. C. R. Acad. Sci. Paris Ser.III, 312: 663-669.
- Bhaud, Y., Soyer-Gobillard, M.O., and Salmon, J.M. (1988). Transmission of gametic nuclei through a fertilization tube during mating in a primitive dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. Journal of Cell Science 89: 197-206.
- Boni, L., Milandri, A., Poletti, R. and Pompei, M. (1993) DSP cases along the coast of Emilia-Romagna (Northwestern Adriatic Sea). In: Smayda, T.J. and Shimizu, Y. (Eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 475-481.
- Bravo, I., Reguera, B., and Fraga, S. (1995). Description of different morphotypes of *D. acuminata* complex in the Galician Rias Bajas in 1991. In: Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien P. and Marcaillou-Le Baut C. (Eds.) Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, pp. 21-26.
- Bravo, I., Delgado, M., Fraga, S., Honsell, G., Montresor, M., and Sampayo, M.A. de M. (1995a). The *Dinophysis* genus: toxicity and species definition in Europe. In: Lassus et al. (eds.). Harmful Marine Algal Blooms, Lavoisier, Paris, pp. 843-845.
- Chang, J., and Carpenter, E. J. (1991). Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. V. Application to natural populations in Long Island Sound. Mar. Ecol. Prog. Ser. 78: 115-122.

- Chisholm, S.W. (1981). Temporal patterns of cell division in unicellular algae. *Ca. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 150-181.
- Delgado, M., Garcés, E., and Camp, J. (1996). Growth and behaviour of *Dinophysis sacculus* from NW Mediterranean Sea. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds.) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO Publisher pp. 261-264.
- Delgado, M., Vila, M., Garcés, E. y Camp, J. (este volumen). Variabilidad morfológica en *Dinophysis caudata* y su delimitación con *Dinophysis diegensis*.
- Faust, M.A. (1993). Sexuality in a toxic dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. In: Smayda, T.J. and Shimizu, Y. (Eds.). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 121-126.
- Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I. Y Martínez, A. (este volumen). Toxinología y contenido tóxico de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* de las Rías Bajas Gallegas. *Aula Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas*, Sevilla, 5-7 Mayo 1999, 10 pp.
- Figueiras, F.G., and Fraga, F. (1990). Vertical nutrient transport during proliferation of *Gymnodinium catenatum* Graham in Ría de Vigo, northwest Spain. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L. and Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 144-148.
- Fraga, S., Anderson, D.M., Bravo, I., Reguera, B., Steidinger, K., and Yentsch, C.M. (1988). Influence of upwelling relaxation on dinoflagellates and shellfish toxicity in Ría de Vigo, Spain. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 27: 349-361.
- Fukuyo, Y., Toyoda, Y., and Miyazaki, S. (1981). Dinoflagellates found in Sanriku coast. I. Genus *Dinophysis*. *Otsuchi Mar. Res. Cent. Rep.* 7: 3-23.
- Garcés, E., Delgado, M. and Camp, J. (1997). Phased cell division in natural population of *Dinophysis sacculus* and the in situ measurement of potential growth rate. *J. Plankton Res.* 19: 2067-2077.
- Hallegraeff, G.M., and Lucas, I.A.N. (1988). The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* (Dinophyceae): photosynthetic, neritic and non-photosynthetic, oceanic species. *Phycologia*, 27: 25-42.
- Hansen, G. (1993). Dimorphic individuals of *Dinophysis acuta* and *Dinophysis norvegica* (Dinophyceae) from Danish waters. *Phycologia*, 32: 73-75.
- Jorgensen, E. (1923). Mediterranean Dinophysiaceae. *Rep. Dan. Oceanogr. Exped.*, 2 (J2): 1-48.
- Kofoed, C.A. and Skogsberg, T. (1928). The Dinophysoideae. *Mem. Mus. comp. Zool. Har.* 51: 1-766 + 31 pl.
- López, J. (1955). Variación alométrica en *Ceratium tripos*. *Inv. Pesq.*, 2: 131-159.
- MacKenzie, L. (1992). Does *Dinophysis* (Dinophyceae) have a sexual life cycle? *J. Phycol.*, 28: 399-406.

- Maneiro, I., Frangópulos, M., Guisande, C., Fernández, M., Reguera, B., Riveiro, I. (sometido). Zooplankton as a potential transmission vector of Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins through the food web. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*
- McDuff, R.E., and Chisholm, S.W. (1982). The calculation of in situ growth rates of phytoplankton populations from fractions of cells undergoing mitosis: A clarification. *Limnol. Oceanogr.* 27(4): 783-788.
- McLachlan, J.L. (1993) Evidence for sexuality in a species of *Dinophysis*. In: Smayda, T.J., and Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 143-146.
- Moita, M.T. and Sampayo, M.A. (1993) Are there cysts in the genus *Dinophysis*. In: Smayda, T.J., and Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 153-158.
- Okaichi, T. (1967). Red tides found in and around the Seto Island Sea in 1965. *Tech. Bull. Fac. Agricul. Kagawa Univ.* 15: 181-185.
- Partensky, F., and Vaulot, D. (1989). Cell size differentiation in the bloom-forming *Gymnodinium cf. nagasakiense*. *J. Phycol.* 25: 741-750.
- Paulsen, O. (1949). Observations on dinoflagellates. *K. danske Vidensk. Selsk. Biol. Skr.*, 6(4):1-67.
- Pfiester, L.A. (1975) Sexual reproduction of *Peridinium cinctum f. ovoplanum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 11, 259-265
- Reguera, B., Bravo, I., and Fraga, S. (1990). Distribution of *Dinophysis acuta* at the time of a DSP outbreak in the rias of Pontevedra and Vigo (Galicia, NW Spain). *International Council for the Exploration of the Sea, C.M.* 1990/L:14.
- Reguera, B., Bravo, I., Mariño, J., Campos, M.J., Fraga, S., and Carbonell, A. (1993). Trends in the occurrence of *Dinophysis spp* in Galician coastal waters. In: Smayda T.J., and Shimizu Y. (Eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 559-564.
- Reguera, B., Bravo, I., and Fraga, S. (1995). Autoecology and some life history stages of *Dinophysis acuta* Ehrenberg. *J. Plankton Res.* 17: 999-1015.
- Reguera, B., Bravo, I., MacCall, H. and Reyero, M.I. (1996). Phased cell division and other biological observations on *Dinophysis spp* populations during in situ cell cycle studies. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds.) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO Publishers, pp. 257-260.
- Santhanam, R., and Srinivasan, A. (1996). Impact of dinoflagellate *Dinophysis caudata* bloom on the hydrography and fishery potentials of Tuticorin Bay, South India. . In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds.) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO Publishers, pp. 41-44.
- Silva, E.S. (1971). The "small form" in the life cycle of dinoflagellates and its cytological

- interpretation. In: Farinacci, A. (Ed.) Proceedings of the 2nd Planktonic Conference, Roma 1970, Tecnoscienza, Roma, pp. 1157-1167.
- Silva, E.S., and Faust, M.A. (1995). Small cells in the life history of dinoflagellates (Dinophyceae): a review. *Phycologia* 34 (5): 396-408.
- Solum, I. (1962). The taxonomy of *Dinophysis* populations in Norwegian waters in view of biometric observations. *Nytt. Mag. Bot.*, 10: 5-32.
- Taylor, F.J.R. (1976). Dinoflagellates from the International Indian Ocean Expedition. A report of material collected by the R.V. "Anton Bruun" 1963-1964. *Bibliotheca Botanica*, Stuttgart 1976, 234 pp. + 46 pl.
- Tahri-Joutei, L. (1998). *Gymnodinium catenatum* Graham blooms on Moroccan waters. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. and Wyatt, T. (Eds.) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, pp.66-67.
- Vaulot, D. (1992). Estimate of phytoplankton division rates by the mitotic index method: The f_{max} approach revisited. *Limnol. Oceanogr.* 37(3): 644-649.

VARIACIÓN EN EL PATRÓN DE LECTINAS DURANTE EL CICLO CELULAR DE DINOFLAGELADOS

Sonsoles González-Gil, Santiago Fraga y Angeles Aguilera
Instituto Español de Oceanografía, Apto 1552, 36280 Vigo.

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que presentan lugares de unión capaces de reconocer una secuencia específica de residuos de azúcar y unirse de forma no covalente y reversible a ella (Goldstein *et al.*, 1980). Inicialmente fueron aisladas de plantas y más recientemente se ha demostrado su presencia en otros muchos organismos, incluyendo hongos, protozoos, algas, moluscos e incluso mamíferos (revisiones en Etzler, 1985; Slifkin & Doyle, 1990). Dada su propiedad de unirse a glucoproteínas de la superficie celular, a proteoglicanos y glucolípidos, se han venido utilizando ampliamente en biología celular como herramientas bioquímicas para localizar y aislar moléculas de la membrana plasmática que presentan azúcares, así como en microbiología clínica en la identificación de bacterias y otros organismos patógenos como *Leishmania* o *Trypanosoma* y en la detección de células infectadas por virus o parásitos (rev. en Slifkin & Doyle, 1990). La capacidad que poseen, además, de unirse covalentemente a fluorocromos como el FITC hacen de ellas una herramienta muy útil en la identificación de dichos residuos, bien sea mediante microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o cualquier método capaz de cuantificar fluorescencia.

Los glicoconjugados juegan un importante papel en organismos unicelulares en funciones tales como el reconocimiento de patógenos (Sharon & Lis, 1993) o adhesión celular (Watanabe *et al.*, 1981), entre otras. Así mismo, muchas especies de fitoplancton excretan componentes al medio que son particularmente abundantes durante sus blooms, y están compuestos en su mayoría por polisacáridos (Vieira & Myklestad, 1986). Varios estudios con diatomeas indican, sin embargo, que la composición y cantidad de estos exudados varía en función del estado fisiológico de la especie (Nalewajko & Lean, 1972). En este trabajo se intenta comprobar mediante el uso de lectinas, si la composición de azúcares de tres dinoflagelados varía a lo largo de su ciclo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos clónicos de los dinoflagelados *Gymnodinium catenatum* Graham (GC21V), *Gyrodinium impudicum* Fraga (Gy5V) y *Prorocentrum micans* Ehrenberg (PMs), (de la colección de cultivos del I.E.O. de Vigo) se cultivaron en tubos de vidrio con 25 ml de medio K modificado sin Tris ni silicatos (Keller & Guillard, 1985), bajo un ciclo de 14:10 h LD de intensidad $70 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ procedente de tubos fluorescentes day-light y una temperatura de $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Una vez establecidos los cultivos se inocularon botellas Pyrex de vidrio de 1 litro conteniendo 600 ml de medio K modificado con unos 100 ml de cada una de las especies a una concentración

aproximada de unas 500 células ml⁻¹. El crecimiento de los cultivos se mantuvo en estas condiciones durante al menos 3 transferencias, realizándose éstas una vez cada 15-20 días según la especie a estudiar. Para la sincronización, justo después de terminar el período de luz del tercer día después de la inoculación, se pusieron los cultivos en oscuridad durante 82 horas. Una hora antes de que se restableciera el ciclo normal de 14:10 hr LD se empezaron a coger muestras para el análisis de lectinas. La recogida de muestras se efectuó cada dos horas durante las 41 horas siguientes. Durante los periodos de oscuridad del ciclo, la recogida de muestras se efectuó bajo una luz roja para no exponer los cultivos a la luz blanca. Las células se preservaron con formalina (5% v/v).

Una vez extraída la formalina mediante centrifugación, las 4 especies se incubaron durante 1-2 horas en oscuridad con 100 ml de cada una de las lectinas fluorescentes siguientes (Tabla 1): Concanavalin A (Con A), *Ulex europaeus* (UEA-I), *Triticum vulgare* (WGA) y *Dolichos biflorus* (DBA) (Sigma), todas ellas a una concentración de 100 µg ml⁻¹. Después de la incubación, se lavaron tres veces con agua de mar filtrada para eliminar los posibles restos de lectina y se mantuvieron en oscuridad hasta su posterior visualización al microscopio de fluorescencia.

Tabla 1- Lectinas utilizadas en el experimento y su especificidad.

LECTINA	AZUCAR
Concanavalin A (Con A)	α-Manosa, α-Glucosa
<i>Triticum vulgare</i> (WGA) Acido Siálico	N- Acetil- β - D- Glucosamina
<i>Ulex europaeus</i> (UEA-I)	α-L-Fucosa
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	N- Acetil- α- D- Galactosamina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de células de *G. catenatum* unidas a cada una de las lectinas para cada hora analizada del ciclo se representa en la Figura 1. De entre todas ellas, *Dolichos biflorus* es la que menos se une a las células, con un porcentaje de aproximadamente 0-10% de células unidas a la lectina, indicando que *G. catenatum* no presenta en su membrana celular restos de N- Acetil-Galactosamina. Por el contrario, los resultados para las otras tres lectinas son bien diferentes, aunque en todas ellas se pueden observar grandes cambios en la unión en función de las horas analizadas. Así por ejemplo mientras que las células de *G. catenatum* se unen a *T. vulgare* en todas las horas analizadas del ciclo, aunque con variaciones de hasta el 80% de unas horas a otras, tanto *U. europaeus* como Concanavalin A tienen momentos del ciclo en el que ninguna de las células analizadas se encuentra unida a ellas. Esto sugiere que a lo largo de su ciclo celular, la membrana de *G. catenatum* sufre cambios en su composición de azúcares de membrana, llegando incluso a perder dichos azúcares presentes en algunos momentos del ciclo, como ocurre por ejemplo con la fucosa, azúcar del que es específico *U. europaeus*.

Casi todas las muestras analizadas presentaban células positivas y células negativas, es decir células a las que se había unido una lectina y células a las que no, e incluso diferencias

entre diferentes células de una misma cadena. Además, se encontraron entre un 10 y un 20% de las células en división en lo que la lectina analizada (en este caso *T. vulgaris*) se unía de manera diferente según la situación de la célula en la cadena. Así, la célula que aún se mantiene individual prácticamente no se une a la lectina (y por tanto fluoresce en rojo), mientras que a medida que las células se van dividiendo (con su zigzag característico, Blackburn *et al.*, 1989) la "positividad" va siendo mayor (es decir las células se hacen más fluorescentes).

La unión de las lectinas a *G. impudicum* queda reflejada en la Figura 2, encontrándose el mismo tipo de respuesta que para *G. catenatum*. Las lectinas que presentan un porcentaje de unión más uniforme a lo largo del ciclo fueron Concanavalin A y *T. vulgaris*, con aproximadamente un 80-100% de células unidas a ellas en la mayor parte del ciclo, sin embargo este porcentaje se ve reducido prácticamente a un 0% en ambos casos en determinadas horas. Lo mismo ocurre cuando se analizó la unión a *U. europaeus* y *D. biflorus*, aunque en estos casos las variaciones fueron todavía más frecuentes. Esta especie presenta en todos los cultivos una gran cantidad de moco, constituido fundamentalmente por polisacáridos, que en muchos casos se teñía claramente con, concretamente, Concanavalin A.

Respecto a *P. micans*, los resultados se representan en la Figura 3. De las tres especies analizadas, ésta es la que menos afinidad tiene por las lectinas, especialmente por *U. europaeus* y *D. biflorus*, a las que escasamente se unen el 5% de las células analizadas y sólo en momentos determinados del ciclo. Esto sugiere que *P. micans* no tiene restos en su membrana ni de fucosa ni de galactosamina. Sin embargo, y al igual que las anteriores especies, dos de las lectinas analizadas (Concanavalin A y *T. vulgaris*) se unen de manera muy diferente a *P. micans* según la hora del ciclo analizada. En particular, el cambio más espectacular ocurre cuando el dinoflagelado se incubó con *T. vulgaris* y se analizaron las primeras muestras; parece como si se diera un proceso de introducción de la lectina dentro del dinoflagelado, al teñirse prácticamente todo el interior celular y no sólo la parte externa como cabría esperar. Este hecho parece haberse dado en otras ocasiones con esta misma especie al ser tratada con Concanavalin A, produciéndose una entrada de la lectina a través del canal flagelar (Klut *et al.*, 1988). En nuestro caso, esto solo es observable con *T. vulgaris* y no con Concanavalin A. El por qué de este hecho nos es desconocido, ya que las lectinas se unen a las membranas celulares mediante la unión a determinados receptores de membrana y no mediante difusión como ocurre con otros fluorocromos de bajo peso molecular (como el naranja de acridina por ejemplo); según Klut y colaboradores, la entrada de fluorocromos en algunos fitoflagelados se daría por vesículas derivadas del plasmalema, mientras que en dinoflagelados lo harían por la púsula.

El porcentaje de células unidas a cada una de las cuatro lectinas analizadas ha sufrido grandes variaciones de unas horas a otras, en general para las tres especies estudiadas, lo que parece indicar que la composición de las membranas de estas especies sufre cambios estructurales a lo largo de su ciclo. Es posible que bajo condiciones de stress o bajo deficiencias nutricionales, la composición de estos glicoconjugados varíe, y es posible incluso que simplemente cambien a lo largo del ciclo celular de los organismos. Las lectinas o cualquier molécula que sirviese para estudiar dichos compuestos serían de gran ayuda a la hora de elucidar funciones específicas de los azúcares de membrana.

BIBLIOGRAFÍA

Blackburn, S. J. *et al.* (1989). Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxin dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania. *J. Phycol.* 25: 577-590.

- Etzler, M. E. (1985). Plant lectins: molecular and biological aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 209-234.
- Goldstein, I. J. et al. (1980). What should be called a lectin? *Nature* 285: 66.
- Keller, M. D. & Guillard, R.R.L. (1985). Factors significant to marine dinoflagellate culture. En: *Toxic Dinoflagellates*. Anderson, D. M. et al. (eds). Elsevier Sci. Pub.Co. pp. 113-116.
- Klut, M. E. et al. (1985). Some cytochemical studies on the cell surface of *Amphidinium carterae*. *Protoplasma* 129: 93-99.
- Klut, M. E. et al. (1988). The use of fluorochromes in the cytochemical characterization of some phytoflagellates. *Histochemical Journal* 20: 35-40.
- Nalewajko, C. & Lean, D. R. S. (1972). Growth and excretion in planktonic algae and bacteria. *J. Phycol.* 8: 361-366.
- Sharon, N. & Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Sci. American* 68: 74-81.
- Slifkin, M. & Doyle, R. J. (1990). Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiol. Rev.* 3: 197-218.
- Vieira, A. A. & Myklestad, S. (1986). Production of extracellular carbohydrates in cultures of *Ankistrodesmus densus*. *J. Plankton Research* 8: 985-994.
- Watanabe, S. et al. (1981). The relation of Concanavalin A receptor distribution to the conjugation process in *Tetrahymena thermophila*. *J. Protozool.* 28: 171-175.

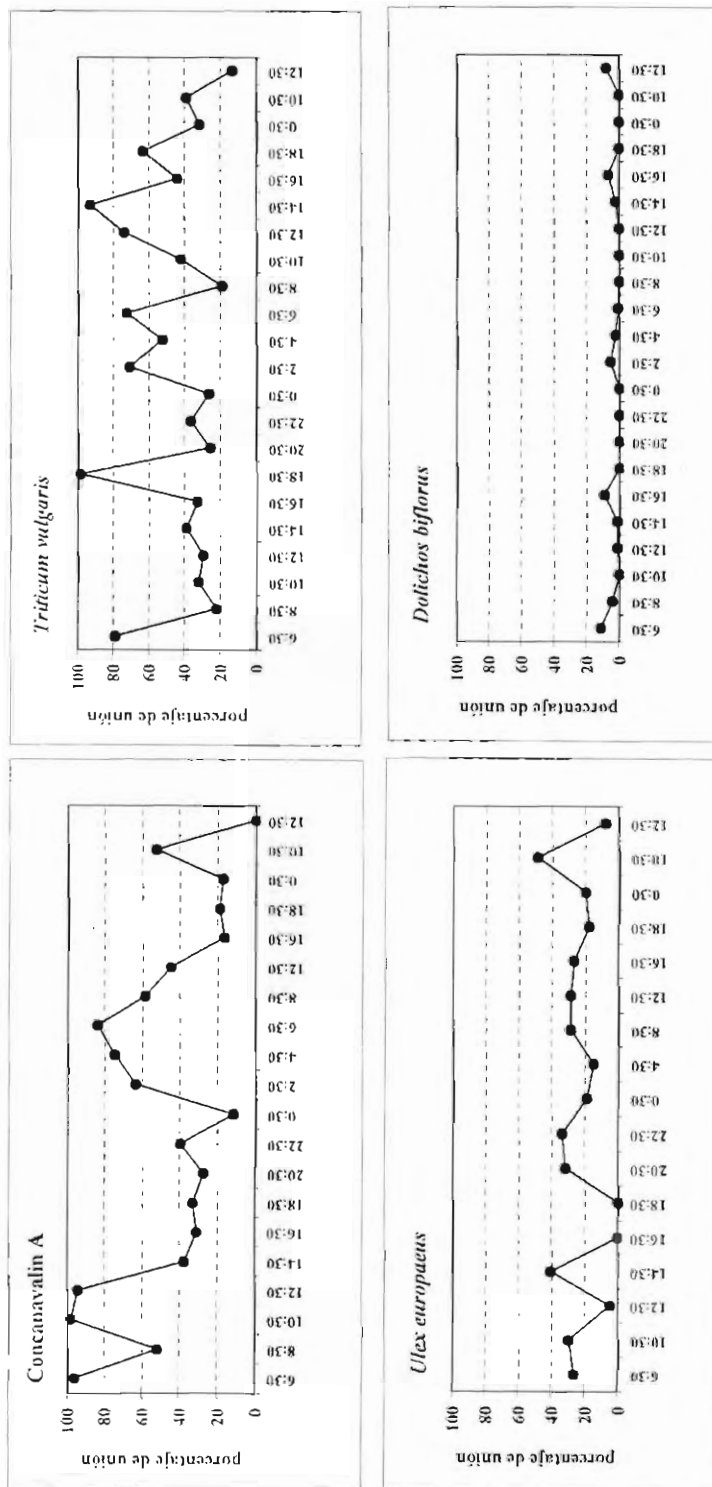


Figura 1- Porcentaje de células de *Gymnodinium catenatum* unidas a cada una de las lectinas

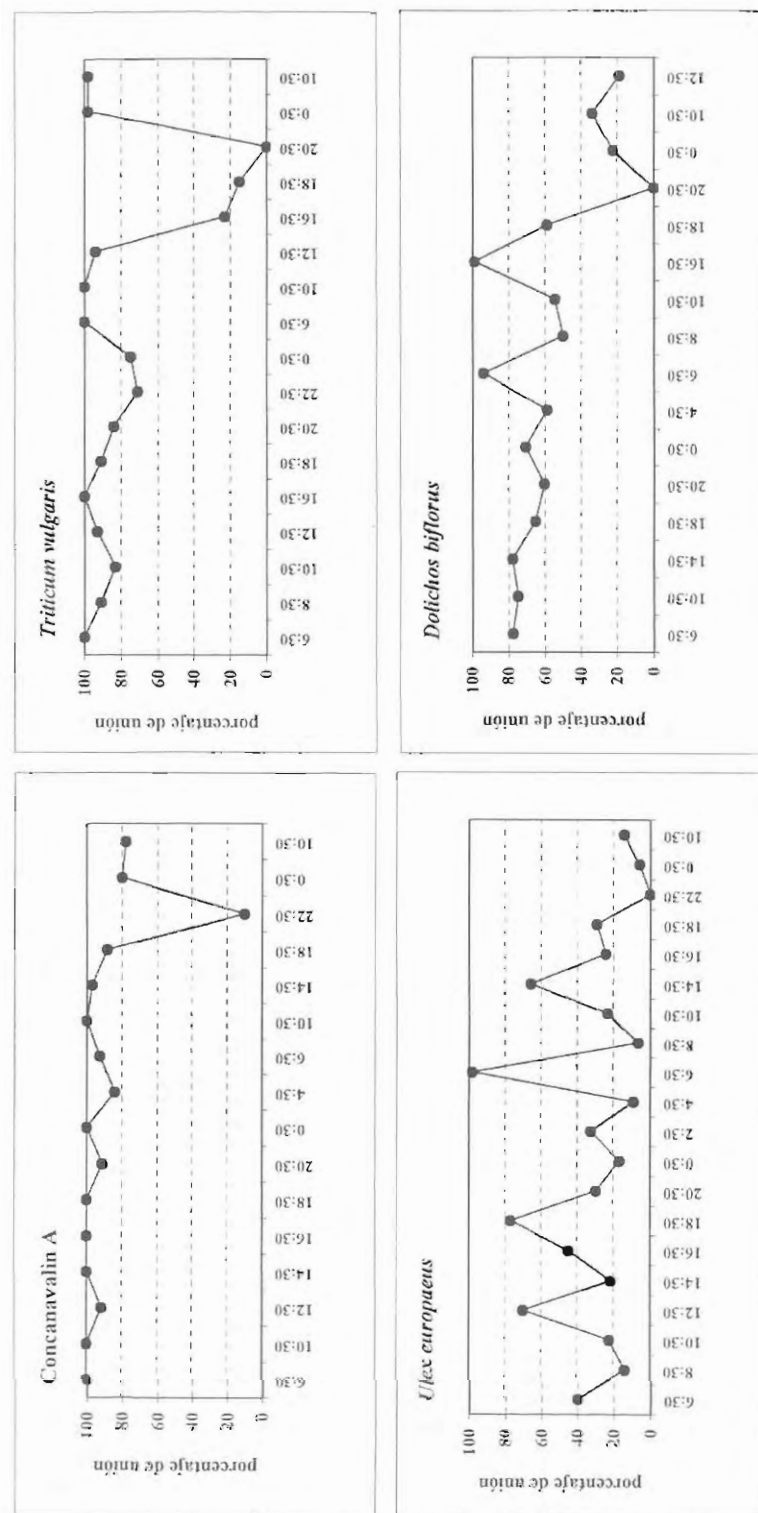


Figura 2- Porcentaje de células de *Gymnodinium impudicum* unidas a cada una de las lectinas

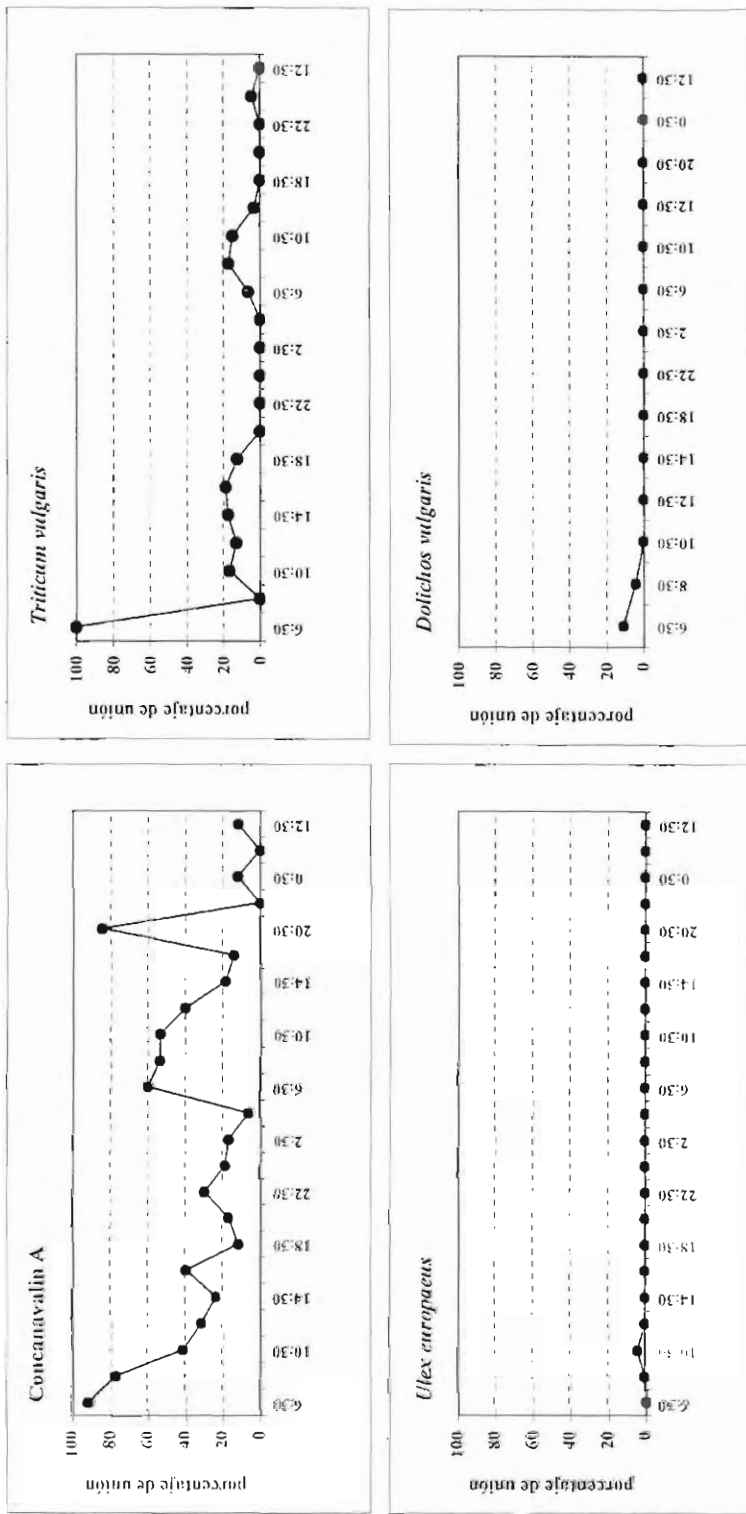


Figura 3 - Porcentaje de células de *P. micans* unidas a cada una de las lectinas

EFFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO DE DINOFLAGELADOS

M.J. Alvarez¹, A. Aguilera¹, J.M. Franco², S. Fraga¹ y S. González-Gil¹.

¹Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo 1552, 36280 Vigo. ²Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), C/ Eduardo Cabello, 6, 36080 Vigo.

RESUMEN

Tres especies de dinoflagelados, dos de ellas pertenecientes al género *Alexandrium*, *A. minutum* (tóxica) y *A. affine* (no tóxica) y la otra perteneciente al género *Gymnodinium*, *G. catenatum*, fueron crecidas en diez medios de cultivo diferentes en su composición química.

Las densidades celulares más altas fueron alcanzadas en los medios de cultivo con agua de mar natural, destacándose un crecimiento mayor en el medio K-HM para las tres especies. El contenido en clorofila *a* fue mayor en los medios con agua natural, que en aquellos donde la base de agua de mar fue artificial, observándose valores mínimos alrededor de 0.079-0.18 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de clorofila en los medios f/2.

GC21V presentó toxinas Cs durante los diez primeros días de cultivo para todos los medios experimentales. Además, los cultivos utilizados en los medios f/2 (Art-HM y Art-C) con agua de mar artificial mostraron un primer pico de GTXs al comienzo de la curva de crecimiento. Los niveles de GTX4 en AL1V se mantuvieron altos y constantes a lo largo de los medios de cultivo utilizados.

INTRODUCCIÓN

El agua de mar constituye el medio ideal para el crecimiento de organismos marinos (Johnston, 1963), pero supone un medio complejo, puesto que se ve afectado por numerosos parámetros físicos, químicos y biológicos que hacen variable su composición. En base a esto, numerosos medios de enriquecimiento y sintéticos fueron formulados para poder establecer el crecimiento de los principales grupos de fitoplancton marino (Provasoli *et al.*, 1957; Guillard, 1975).

Para el mantenimiento de cultivos de fitopláncton se necesita siempre el aporte indispensable de unos elementos nutritivos, tales como la adición de fosfatos, nitratos, amonio, silicatos, vitaminas, minerales. Cada uno de ellos, ya se encuentre a niveles de trazas, presenta un papel específico y definido, que puede influir sobre la tasa de crecimiento, así como sobre la asimilación nutricional y la inducción de determinadas rutas bioquímicas, que dan lugar a la síntesis de compuestos, tales como proteínas, aminoácidos, toxinas, lípidos de reserva y

estructurales, etc. (Flynn *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). Todo ello hace que según se trate de un tipo de alga u otro, cada una presente una composición bioquímica variable, característica de cada especie.

Dentro de los dinoflagelados responsables de mareas rojas en Galicia, encontramos *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* y *Alexandrium affine*. Los dos primeros han sido responsables de episodios tóxicos de PSP en las rías gallegas (Fraga *et al.*, 1988; Reguera *et al.*, 1991) y *A. affine* no produce toxinas de tipo paralizante (Lee *et al.*, 1989).

Con este estudio, queremos ver qué cambios significativos se observan en las tres especies de dinoflagelados, al ser crecidas en diez medios de cultivo, donde ha sido variada la composición química de los mismos, según sea el origen y procedencia del agua de mar y los nutrientes de enriquecimiento añadidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tres cepas, pertenecientes a la colección del Centro Oceanográfico de Vigo (IEO), fueron elegidas para el desarrollo de este experimento: *Alexandrium minutum* Halim (AL1V), *Alexandrium affine* (PA2V) y *Gymnodinium catenatum* Graham (GC21V). Para los tres cultivos, se procedió a un acondicionamiento previo en el medio de cultivo correspondiente, utilizando tubos Pyrex de 25 ml y cuyo crecimiento fue monitorizado en medidas de fluorescencia de la clorofila a. La iluminación del cultivo fue de $70 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$, con un fotoperíodo de 14:10 h (L:O) y el rango de temperatura fue de $19 \pm 1^\circ \text{C}$.

Para cada una de las cepas de dinoflagelados, se emplearon diez medios diferentes, divididos en dos grupos según se utilizaba como base del medio de cultivo, agua de mar natural u agua de mar artificial (ASPM). Para cada grupo, se utilizaron cinco tipos de enriquecimientos: dos medios f/2 y K (uno de cada, es de composición comercial, obtenido de Sigma y el otro, fue hecho a mano con los nutrientes, vitaminas y metales traza correspondientes). El medio de enriquecimiento L1 se basó exclusivamente en la adición de nutrientes hechos a mano. En la Tabla 1 y 2, se muestra la composición química y nomenclatura empleada para los diez tipos de medios experimentados.

El volumen de cultivo fue de 500 ml y para cada uno de los medios se utilizó un inóculo de 500 cels/ml. Se tomaron muestras cada dos días, para medidas de clorofila a en vivo, conteo celular en una cámara Sedgewick-Rafter y determinación del perfil de toxinas, a lo largo de la fase exponencial de la curva de crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo. Para la determinación de toxinas y clorofila a en vivo, las muestras fueron recogidas en filtros de fibra de vidrio de 13 mm de diámetro y mantenidas a -30°C hasta el momento de la extracción.

Análisis de clorofila a: este tipo de ensayo se realizó según el método de Jeffrey y Humphrey (1975). Se tomaron muestras de 10 ml de cultivo, recogidas sobre un filtro de fibra de vidrio; cuya extracción se realizó con acetona al 90%. El análisis cuantitativo de clorofila a se realizó mediante la lectura de fluorescencia en un fluorímetro Turner. Se emplearon blancos como referencias.

Análisis de toxinas: este tipo de análisis se llevó a cabo por CLAE y se cuantificó mediante derivatización postcolumnal y detección fluorimétrica, según fue descrito en el método de Franco y Fernández (1993). Se utilizó un estándar, procedente del NRC, para la identificación y cuantificación de las toxinas.

RESULTADOS

Los valores más altos de $\mu_{\text{máxima}}$ en las tres especies de dinoflagelados fueron alcanzados en el medio K-C, variando entre 0.59 y 0.91 (d^{-1}), tal y como se muestra en la Figura 1. AL1V y PA2V no mostraron diferencias muy significativas de crecimiento a lo largo del cultivo en los medios f/2. Por otro lado, los niveles más altos de células por mililitro a lo largo de la curva de crecimiento, característica para cada una de las especies estudiadas se consiguieron en el medio K-HM.

Las diferencias en el contenido de clorofila a por ml de cultivo entre los medios de agua de mar sintética y natural se muestran en la Figura 2. En ambos tipos, se observaba una fase de aclimatación, hasta que se producía un aumento en los niveles de clorofila a, alrededor de los días 25-30 días del ciclo celular. Sin embargo, los contenidos de clorofila a más altos fueron detectados en los cultivos con agua de mar natural. Además, aquellos con un enriquecimiento hecho a mano (no comercial) mostraban valores, tres veces más altos de clorofila a por mililitro, que aquellos donde los nutrientes añadidos eran de origen comercial.

La Figura 3 muestra el perfil de toxinas GTXs presente en *A. minutum*, expresados como una distribución porcentual. El contenido en GTX4 parece mantenerse constante a lo largo del cultivo para los distintos tratamientos experimentales, variando desde valores mínimos del 42%, como ocurre en el caso de K-C y L1-Art, hasta valores del 100% en los medios K-C y L1. Es de destacar la presencia de niveles altos de GTX1 en el medio f/2-HM al comienzo del cultivo; aunque se observa una incidencia de esta toxina en todos los medios experimentales alrededor de los días 16-19 del ciclo celular. GTX2 aparece en muy bajas cantidades sin mostrar una pauta definida.

La composición de toxinas totales de *G. catenatum* se presenta en la Figura 4. Medios como f/2 Art-HM y f/2 Art-C, mostraron al comienzo del cultivo niveles altos de toxinas GTXs. Por otro lado, los niveles de toxinas Cs más elevados se detectaron en los primeros estadios del cultivo, manteniéndose hasta el día 13-16. A partir de este momento, comienzan a incrementarse las cantidades de saxitoxina para todos los medios experimentales, excepto en los medios f/2 donde se mantienen hasta el día 19 del ciclo celular.

No existe mucha variabilidad significativa, cuando valoramos el contenido de toxinas de forma global; pero si que hemos detectado diferencias más claras y definitivas, al estudiarlas de forma individualizada, dentro de los tres grupos principales de toxinas totales (GTXs, Cs y STXs) (datos no mostrados).

REFERENCIAS

- Brown MR, Dunstan GA, Norwood SJ y Miller KE (1996). Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycology*. 32, 64-73.
- Flynn KJ, Flynn K, John EH, Reguera B, Reyero MI y Franco JM (1996). Changes in toxins, intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity. *J. Plankton Res.* 18, 2093-2111.
- Fraga S, Anderson DM, Bravo I, Reguera B, Steidinger KA y Yentsch CM (1988). Influence of upwelling relaxation on dinoflagellates and shellfish toxicity in Ría de Vigo, Spain.

Estuarine Coastal Mar. Sci. 27, 349-361.

Franco JM y Fernández P (1993). Separation of paralytic shellfish toxins by reserved phase high performance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Cromatographia* 35, 613-620.

Guillard RRL (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Smith WL and Chanley MH [eds.]. Plenum Pub. Co. pp. 29-60.

Guillard RRL y Hargraves PE (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*. 32, 234-236.

Jeffrey SW y Humphrey, GF (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167, 191-194.

Johnston R (1963). Sea water, the natural medium of phytoplankton. I. General features. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 43, 427-456.

Keller MD y Guillard RRL (1985). Factors significant to marine dinoflagellate culture. In: *Toxic Dinoflagellates. Proc. Third Int. Conf. On Toxic Dinoflagellates* (8-12 de junio, 1985. St. Andrews, Canadá). Anderson DM et al [eds.]. Elsevier, Nueva York. pp. 113-116.

Lee JS, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P y Yasumoto T (1989). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellates species. *J. Applied Phycol.* 1, 147-152.

Provasoli L, McLaughlin JJA y Droop MR (1957). The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25, 392-428.

Reguera B, Campos MJ, Fraga S, Mariño J y Bravo I (1991). The monitoring of harmful algal blooms in Galicia (NW Spain). In: *Colloque International des Biotoxines Marines*. Remy J [ed.]. Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires. Paris. pp. 217-223.

Tabla 1. Composición definida de los medios experimentales. Las concentraciones son dadas en µM.

Medio basal	Agua de mar natural		ASPM ^a	
	f/2	K ^{**}	LI ^{***}	f/2
<i>Nutrientes principales</i>				
NaNO ₃	883,0	883,0	883,0	883,0
NH ₄ Cl	-	50,0	-	50,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	36,3	36,3	36,3	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	22,05
Na ₂ glicerol·PO ₄	-	-	-	14,20
<i>Metales traza</i>				
Na ₂ EDTA	11,70	100,0	11,70	-
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	-	-	-	100,0
FeNa ₂ EDTA	-	-	-	11,70
FeCl ₃ ·6H ₂ O	11,70	11,70	11,70	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,04	0,01	0,01	0,01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,08	0,08	0,08	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,05	0,05	0,05	-
CoSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	0,08
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,90	0,90	0,90	0,09
Ni ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,03	0,03	0,09	0,01
Li ₂ SeO ₃	-	0,01	0,01	0,01
NiSO ₄ ·6H ₂ O	-	-	0,01	-
Na ₃ VO ₄	-	-	0,01	-
K ₂ CrO ₄	-	-	0,001	-
Tampón Tris	-	-	-	1000,0
<i>Vitaminas</i>				
Tiamina·HCl	0,30	0,30	0,30	0,30
Biotina	0,0021	0,0021	0,0021	0,0021
B12	0,00037	0,00037	0,00037	0,00037

^a Agua de mar artificial

^b Guillard (1975).

^{**} Keller & Guillard (1985), sin tampón Tris. El fosfato orgánico (Na₂ glicerol·PO₄) es sustituido por fosfato inorgánico (NaH₂PO₄·H₂O), y CoCl₂ es añadido en sustitución del CoSO₄ como fuente de cobalto.

^{***} Guillard & Hargraves (1993).

Tabla 2. Nomenclatura empleada en los diez medios de cultivos experimentales.

-
1. f/2 Art-HM: ASPM + nutrientes hechos a mano.
 2. f/2 Art-C: ASPM + nutrientes de origen comercial.
 3. f/2-HM: agua de mar natural + nutrientes hechos a mano.
 4. f/2-C: agua de mar natural + nutrientes de origen comercial.
 5. K Art-HM: ASPM + nutrientes hechos a mano.
 6. K Art-C: ASPM + nutrientes de origen comercial.
 7. K-HM: agua de mar natural + nutrientes hechos a mano.
 8. K-C: agua de mar natural + nutrientes de origen comercial.
 9. L1 Art: ASPM + nutrientes hechos a mano.
 10. L1: agua de mar natural + nutrientes hechos a mano.
-

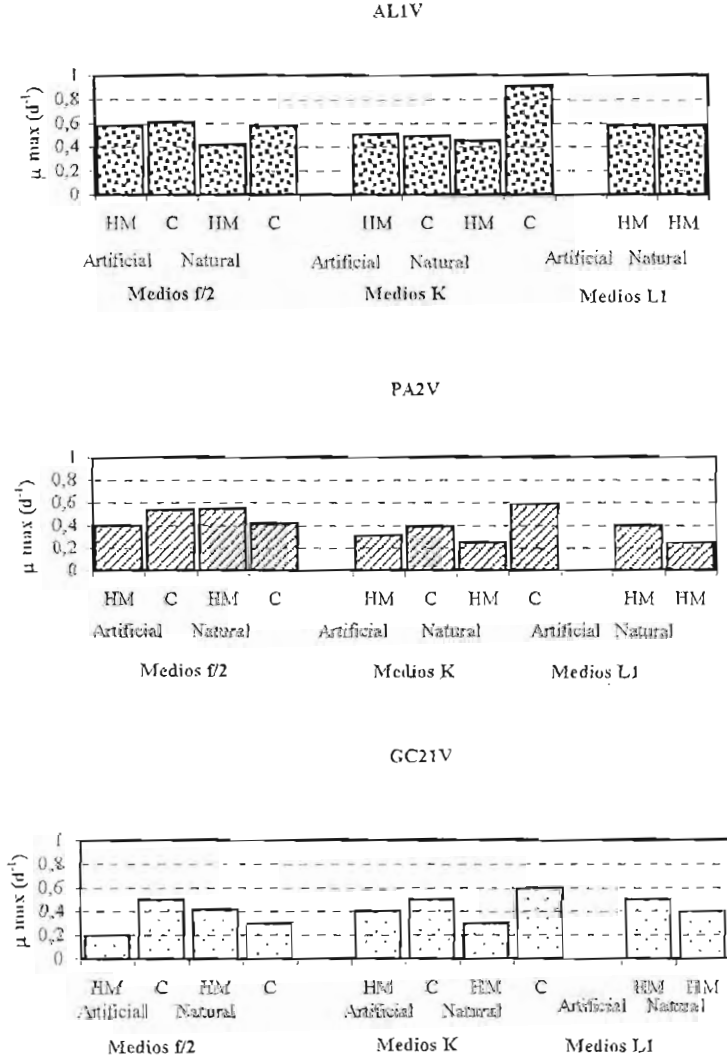


Figura 1. Tasas de crecimiento mostradas por AL1V, PA2V y GC21V, expresadas como μ_{max} (d^{-1}).

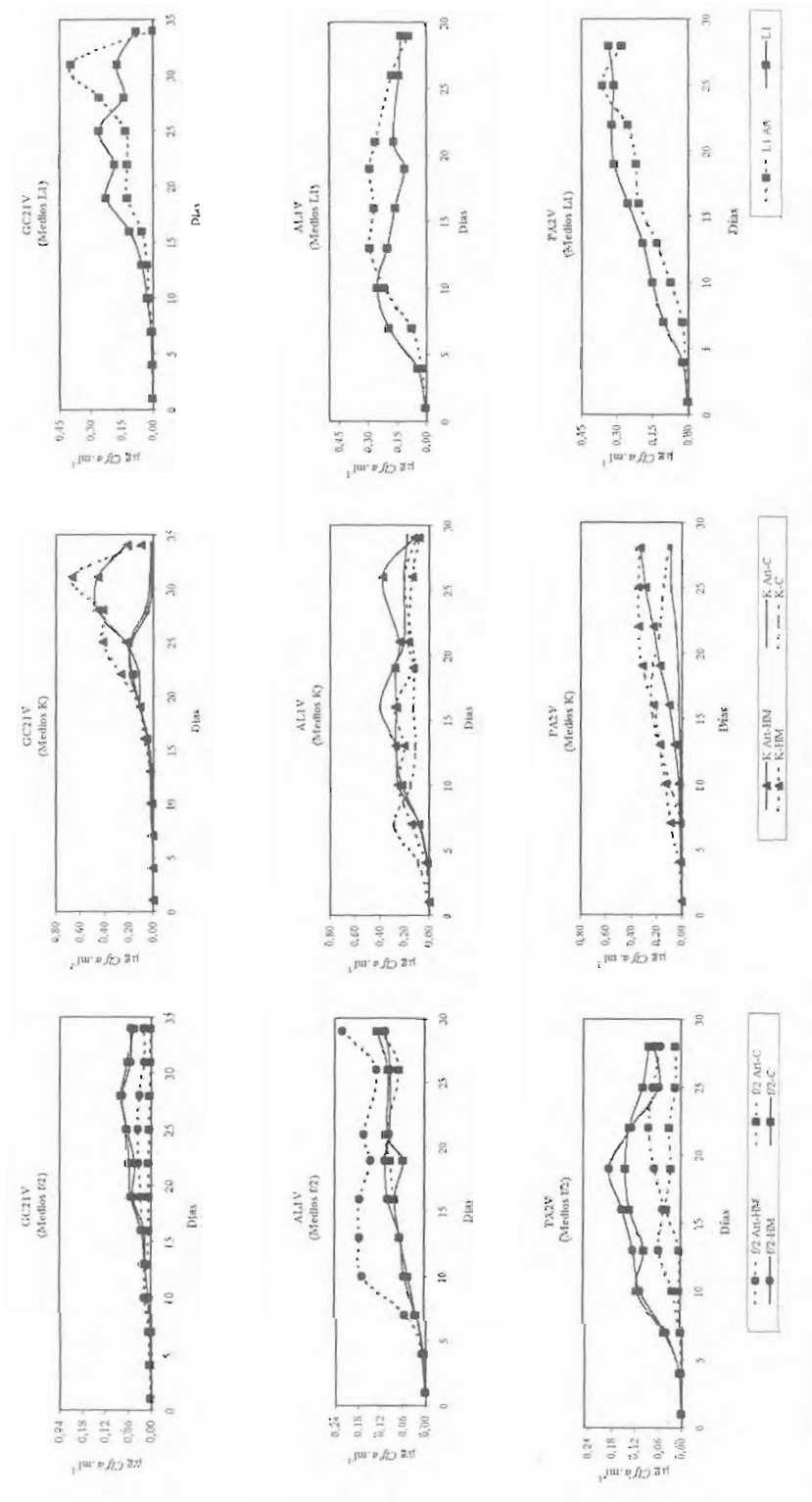


Figura 2. Contenido en clorofila a en las tres especies de dinoflagelados (GC21V, AL1V y PA2V) a lo largo del crecimiento en los diez medios de cultivo experimentales.

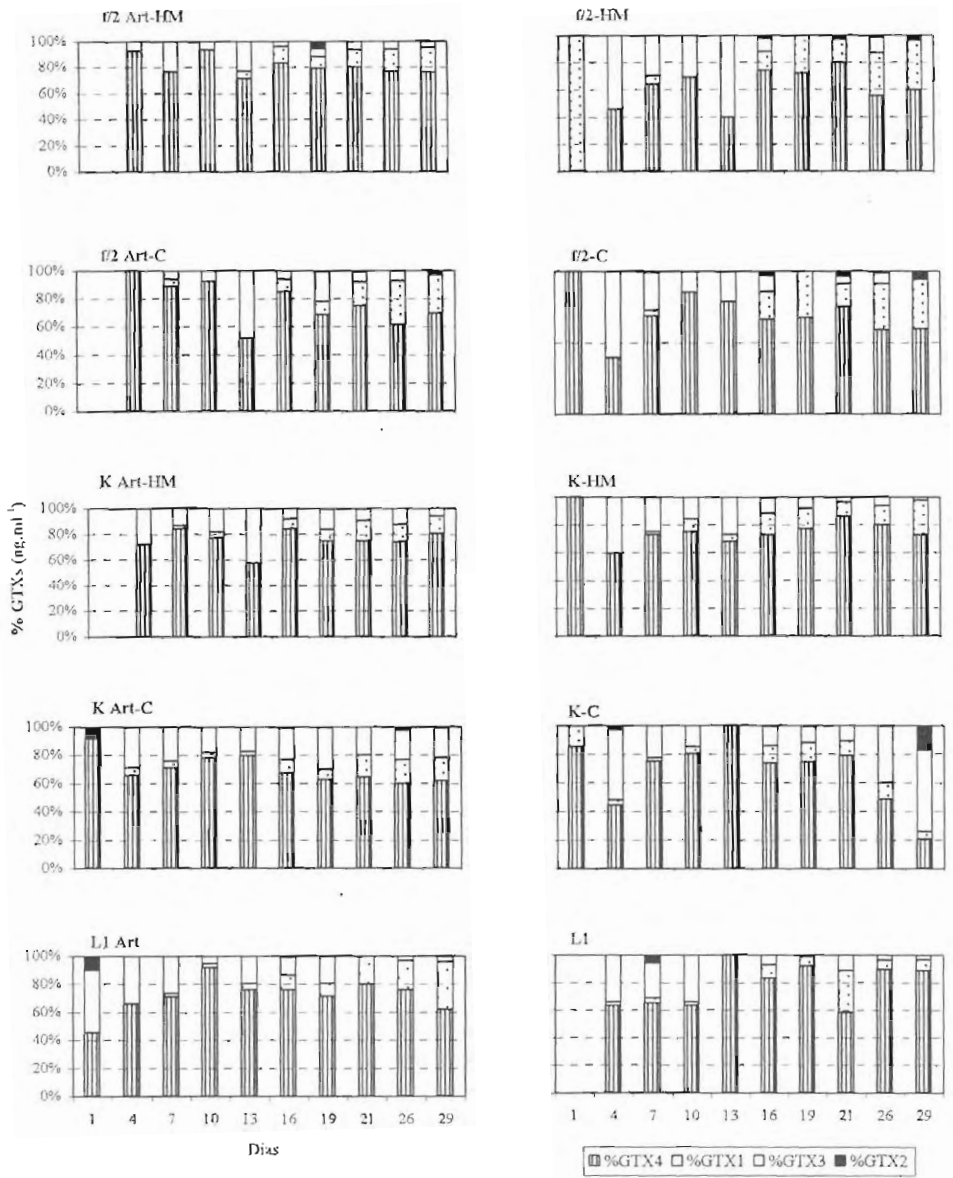


Figura 3. Perfil de toxinas GTXs en A11V para los diez medios de cultivo experimentados, expresadas en %.

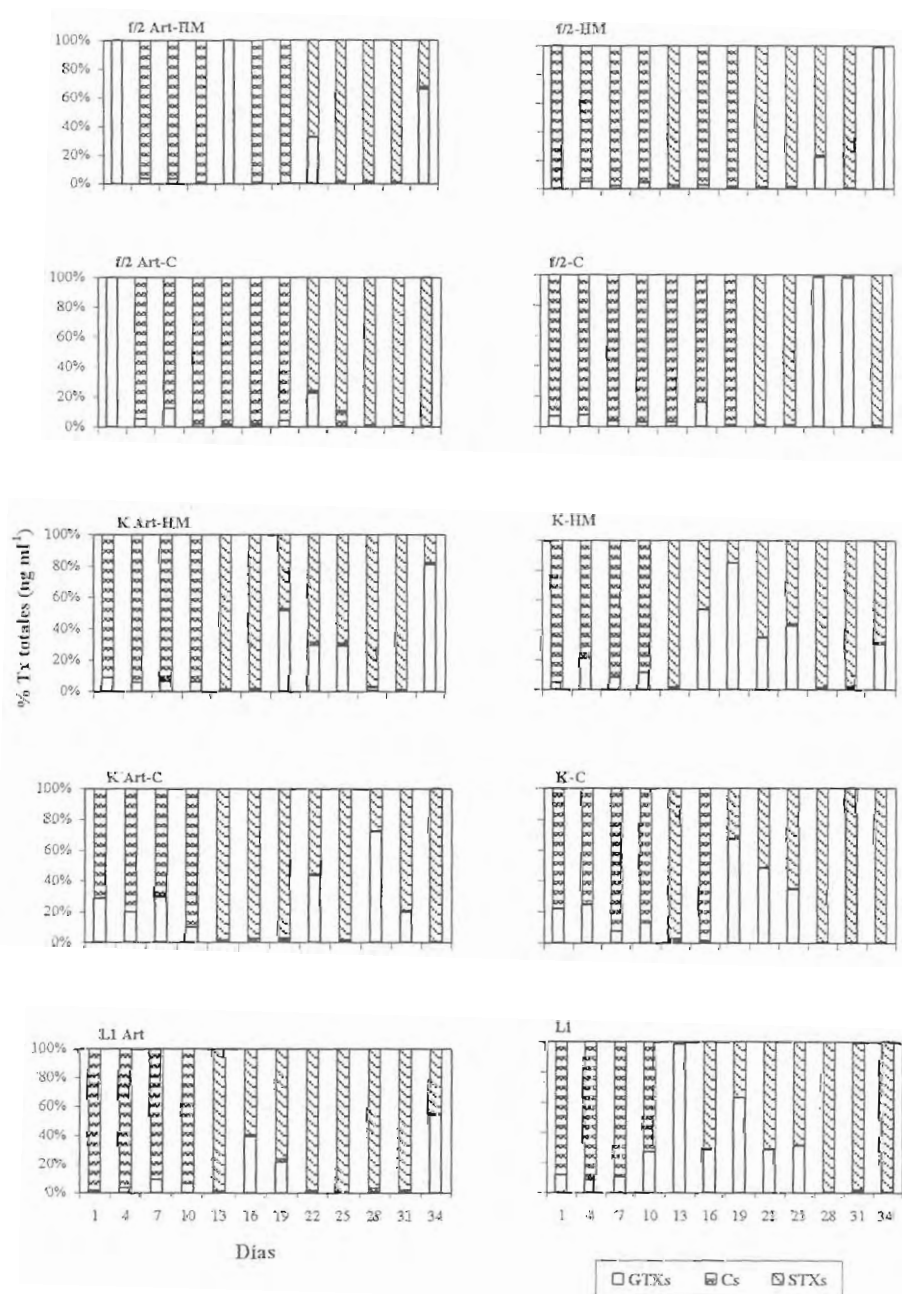


Figura 4. Perfil de toxinas totales en GC21V en los diez medios de cultivos empleados, expresados en %.

VARIACIÓN EN LA RELACIÓN ENTRE LA FLUORESCENCIA IN VIVO Y LA CLOROFILA A ASOCIADA A LA DINÁMICA OCEANOGRÁFICA

F. Rodríguez¹, Y. Pazos², A. Moroño², J. Maneiro², J. Blanco¹ y M. Zapata¹

1 Centro de Investigacións Mariñas. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia. Apdo 13, 36620, Vilanova de Arousa, Pontevedra.

2 Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia. Peirao de Vilaxoán, 36600, Vilagarcía de Arousa, Pontevedra.

El presente trabajo se ha realizado sobre los datos obtenidos en una estación (P2) de la ría de Pontevedra durante el año 1997 (Figura 1), mediante los análisis y muestreos semanales que realiza el Centro de Control de Calidade do Medio Mariño de Vilaxoán (Pontevedra).

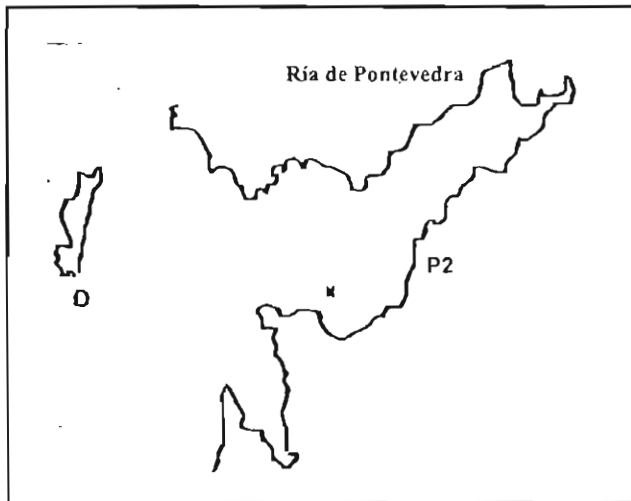


Figura 1. Area de estudio.

Los valores de fluorescencia in vivo, temperatura, conductividad y transmitancia, se obtuvieron en continuo de la columna de agua mediante un SEALOGGER CTD modelo SBE 25. Al mismo tiempo, se recogieron muestras mediante una manguera dividida en tres intervalos para el análisis de pigmentos (0-5 m, 5-10 m, 10-15 m). Dichas muestras se filtraron a través de filtros GF/D y GF/F y se extrajeron en acetona al 90% para la posterior determinación de clorofila a mediante espectrofluorimetría.

A partir de los datos de temperatura y salinidad (Figura 2) podemos distinguir en el año estudiado dos grandes períodos que denominamos como invernal y de afloramiento. El primer período comprende los meses de enero, febrero y diciembre y se caracteriza por una estratificación de origen halino en la columna de agua e inversión térmica. Las concentraciones de nitratos y silicatos integradas en la columna de agua alcanzan sus valores máximos durante la fase invernal (Figura 3a) mientras que los valores de clorofila a y fluorescencia en la columna de agua son menores. Durante este período son también comunes los procesos de hundimiento debidos al predominio de vientos del sur-suroeste (Figura 3b), épocas en las que se observa un descenso de la concentración de nutrientes en la columna de agua (Figura 3a). El segundo período se extiende entre los meses de marzo y noviembre, caracterizándose por fases de estratificación tras sucesivos procesos de afloramiento con los correspondientes incrementos en la concentración de nutrientes (Figura 3a) y máximos de fluorescencia y clorofila a (Figura 4).

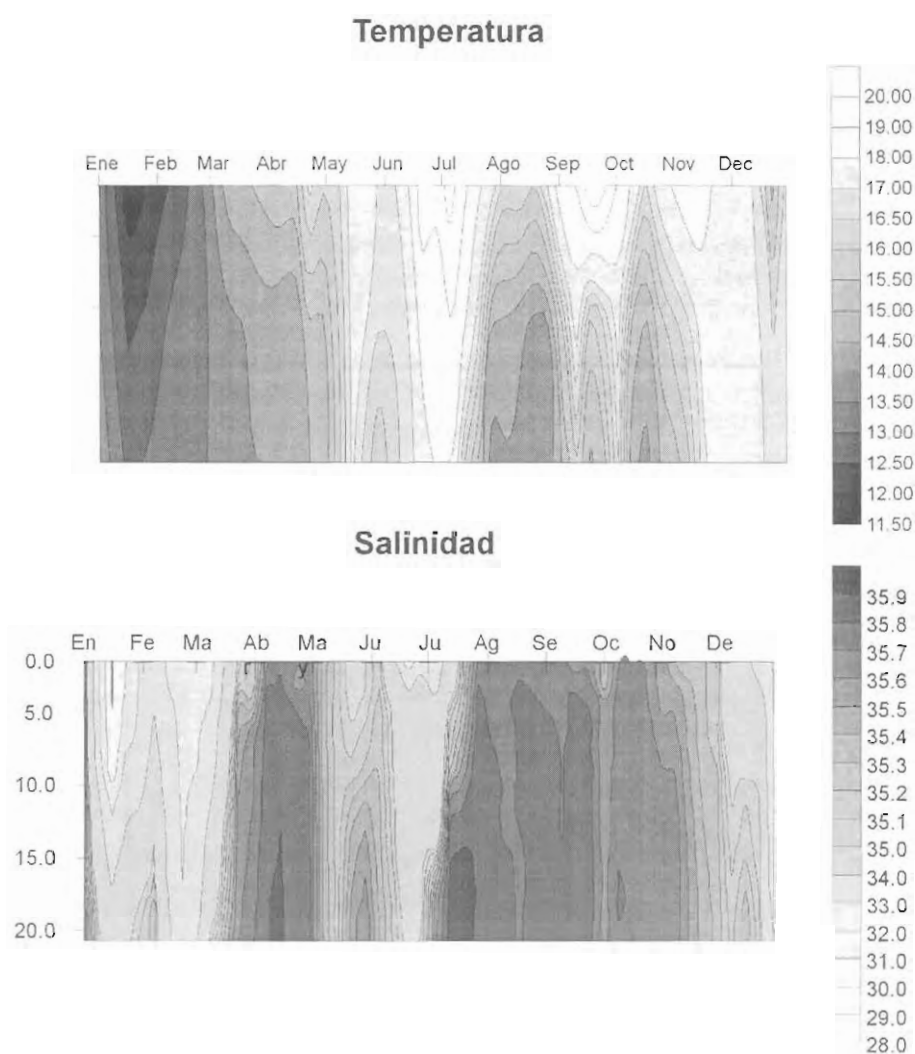


Figura 2. Variación temporal de temperatura y salinidad en la estación P2.

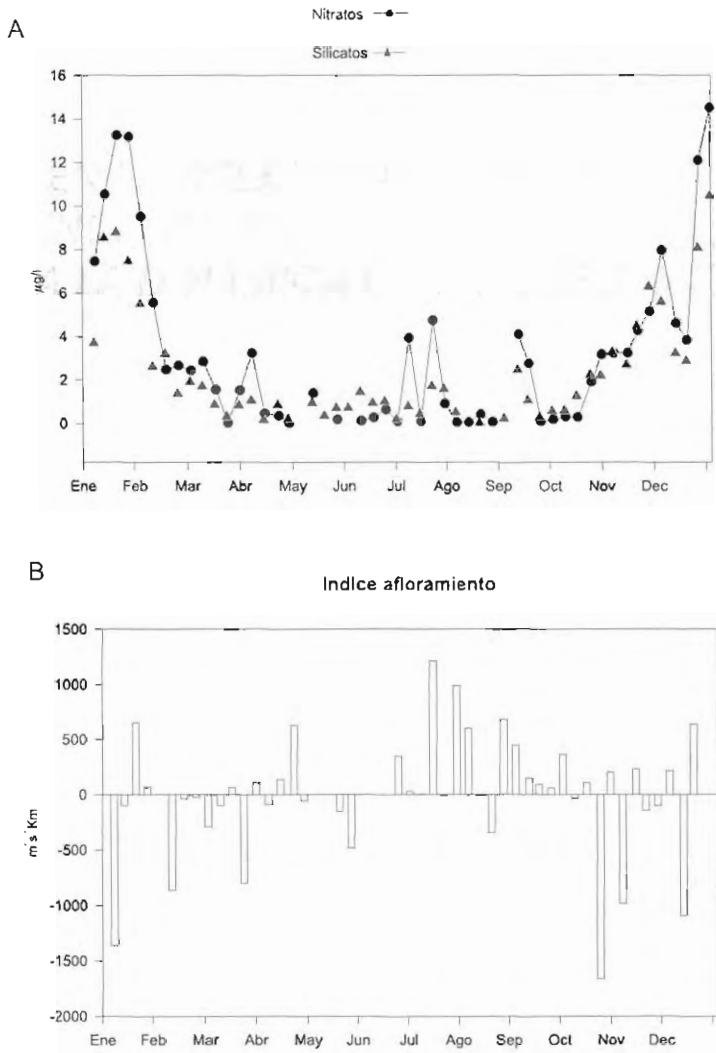


Figura 3. Variación temporal de A) nitratos y silicatos, B) índice de afloramiento.

La estimación de la concentración de clorofila a a partir de una regresión lineal con la fluorescencia in vivo resulta satisfactoria a 0-5 m ($r^2 = 0,84$; $n = 44$; $P < 0,001$), mientras que a mayor profundidad la relación lineal es menos evidente (5-10 m: $r^2 = 0,61$, $n = 44$, $P < 0,001$; 10-15 m: $r^2 = 0,66$, $n = 44$, $P < 0,001$) (Figura 5).

Un test de paralelismo entre pendientes de las regresiones en cada profundidad confirma que existen diferencias significativas entre ellas, debido a que la pendiente calculada para la profundidad 0-5 m es estadísticamente superior a las otras dos. Este dato se repite en el análisis de otras series anuales en la estación P2 desde 1993, indicando una tendencia de valores más bajos de fluorescencia por unidad de clorofila a en la capa superficial. Dicho resultado podría ser explicado mediante mecanismos de fotoinhibición. Estos reducen el rendimiento fluorescente del PS II liberando parte del exceso de energía en forma de calor y constituyen así

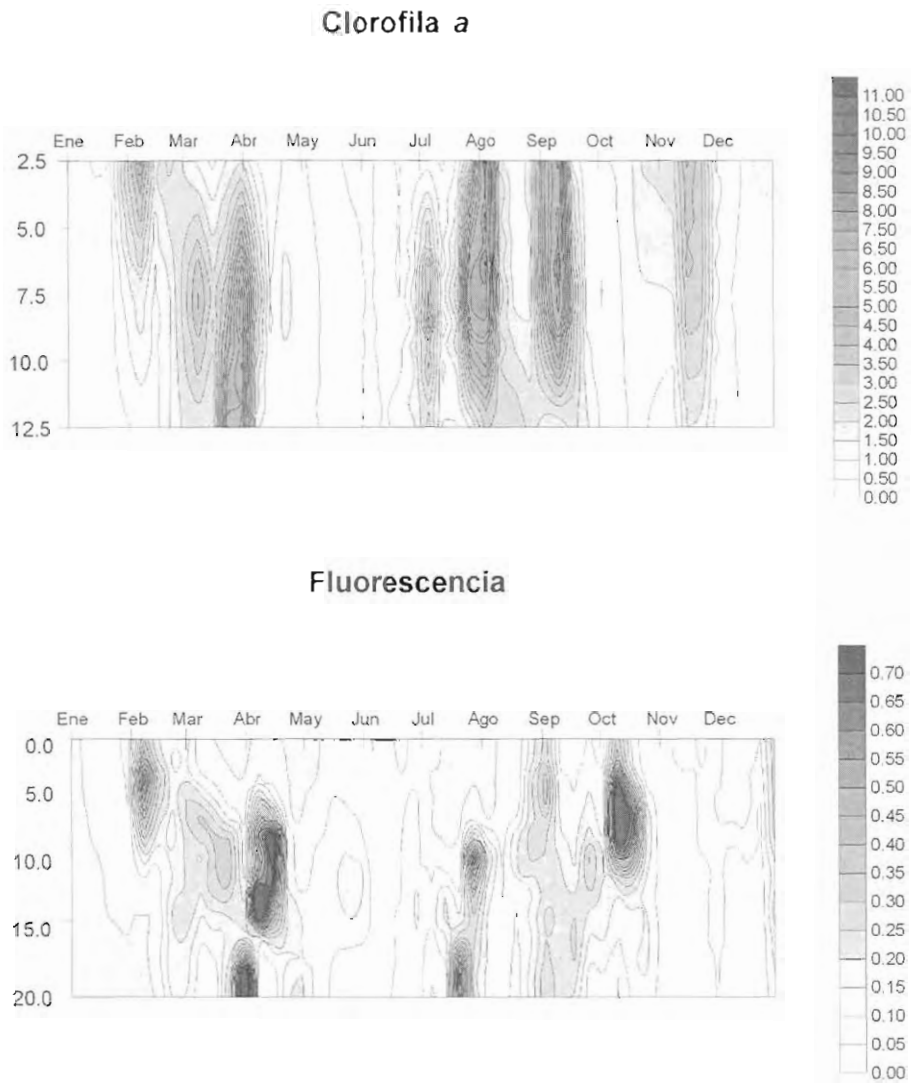


Figura 4. Variación temporal de clorofila a determinada espectrofluorimetricamente y fluorescencia in vivo..

una de las posibles causas de las diferencias en R según la profundidad (Loftus y Seliger, 1975; Uehlinger, 1985).

La incorporación en la regresión de variables físico-químicas (temperatura, transmitancia, salinidad y nutrientes) mejora los coeficientes de correlación para la estimación de clorofila a (0-5 m: $r^2= 0,92$, $n= 44$, $P<0,001$; 5-10 m: $r^2= 0,68$, $n= 44$, $P<0,001$; 10-15 m: $r^2= 0,78$, $n= 44$, $P<0,001$). Las variables incluídas en las ecuaciones aplicando el método forward son fluorescencia, transmitancia y salinidad a 0-5 m, fluorescencia y salinidad a 5-10 m y fluorescencia y NO_3^- a 10-15 m.

Sin embargo, el margen de error cometido a través de la regresión múltiple en el cálculo de la concentración de clorofila a (determinado mediante Root Mean Square) es del 11%, 20%

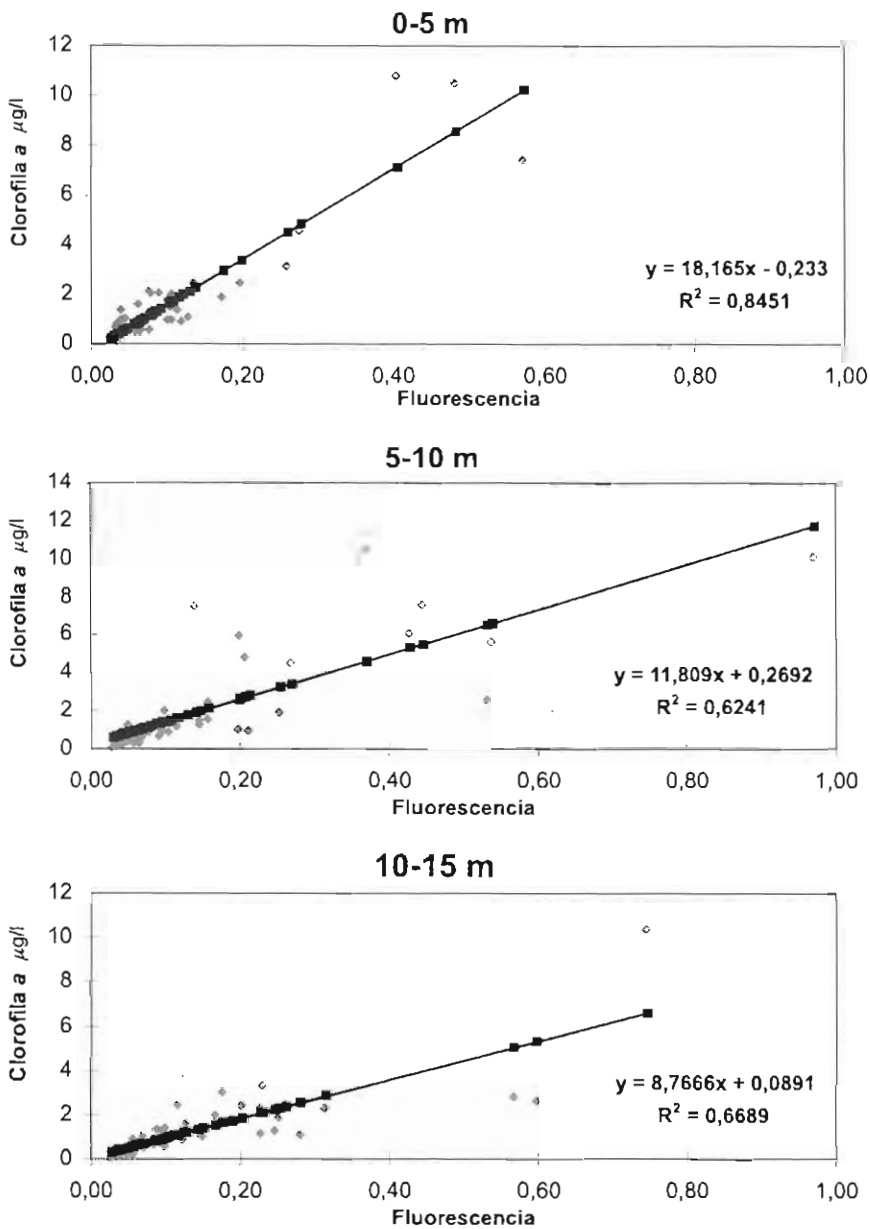


Figura 5. Regresión lineal entre la concentración de clorofila a y fluorescencia en los rangos de profundidad 0-5, 5-10 y 10-15m.

y 13% en cada profundidad, mientras que en el caso de la regresión simple los valores son del 7%, 13% y 7% (Figura 6).

Los valores del cociente fluorescencia in vivo/clorofila a (R) se han referido a tres intervalos de profundidad (0-5 m, 5-10 m, 10-15 m). El rango observado de variación en R es de un orden de magnitud y su valor medio aumenta con la profundidad (0-5 m: 0,066; 5-10 m: 0,086; 10-15 m: 0,11). Dicho incremento se debe en mayor parte a la fluorescencia (0-5 m: 0,078; 5-10 m: 0,10; 10-15 m: 0,11) dado que los valores medios de clorofila a extraída no

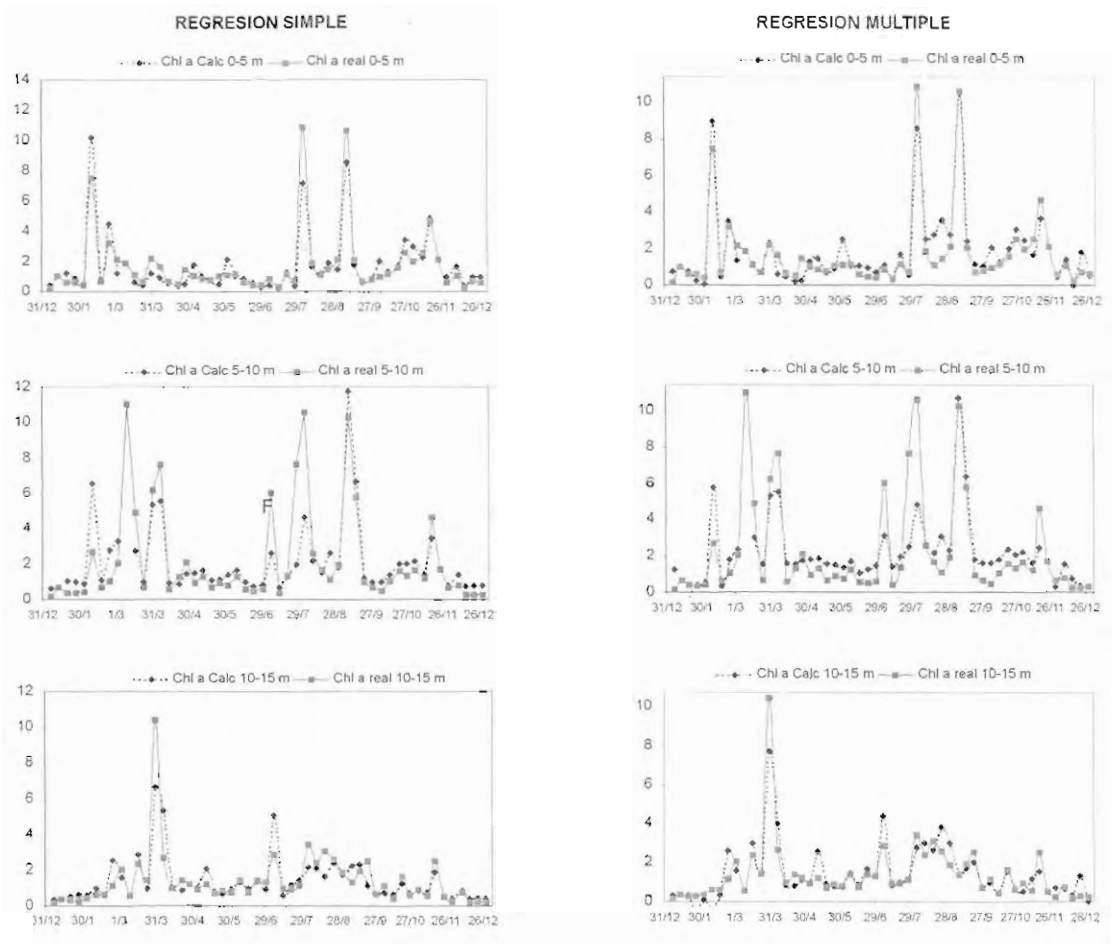


Figura 6. Estimación de la concentración de clorofila a mediante regresión simple con fluorescencia y regresión múltiple incluyendo variables físico-químicas.

presentan grandes diferencias con la profundidad (1,20 mg/l, 1,36 mg/l y 1,16 mg/l, respectivamente).

La distribución temporal de R se asemeja a la estructura definida en la columna de agua mediante temperatura y salinidad (Figura 7). Sus valores máximos se observan durante el período invernal en el cual el fitoplancton presenta una proporción mayor de pequeños flagelados (Chl a GFF= 22% Chl a total). Debido al mayor rendimiento fluorescente que poseen los organismos de menor tamaño celular (Alpine y Cloern, 1985), dicho porcentaje de clorofila a contenida en la fracción GFF puede tener una influencia significativa en los valores de R durante la fase invernal. Por el contrario, los valores mínimos de R se observan en las fases de afloramiento donde las condiciones oceanográficas son propicias para el desarrollo de fitoplancton de mayor tamaño (Chl a GFD= 93% Chl a total). En este sentido cabe destacar que R está significativamente correlacionado con la proporción de clorofila a GFF/GFD a 0-5 m ($r=0,56$, $n=49$, $P<0,001$) y 5-10 m ($r=0,38$, $n=49$, $P<0,01$). Sin embargo, a 10-15 m no existe

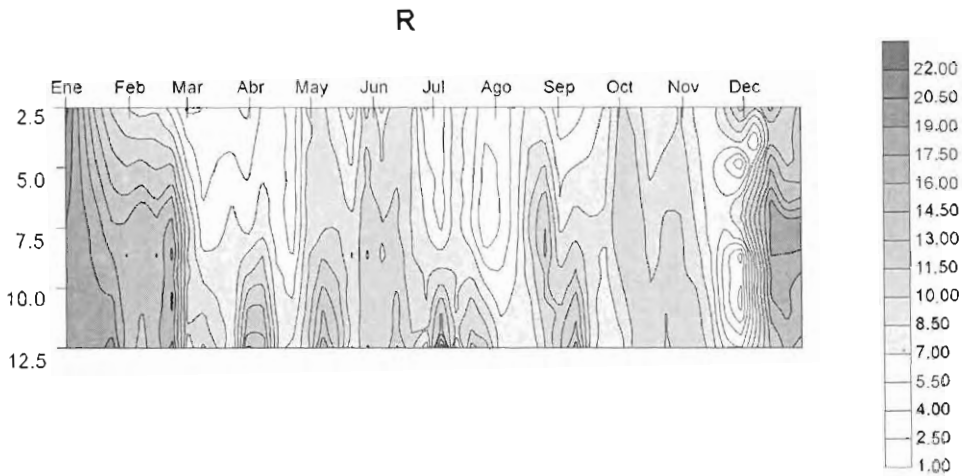


Figura 7. Variación temporal de R (fluorescencia in vivo/clorofila a).

dicha relación ($r= 0,04$, $n=49$) lo cual parece indicar que están actuando otros factores sobre la variación observada en dicho cociente.

Con el fin de describir la variación de R en relación a las condiciones oceanográficas, se ha realizado un análisis de componentes principales para cada rango de profundidad utilizando las variables medidas por CTD, nutrientes, clorofila a total, clorofila a GFF/clorofila a Total y R observados.

En cada uno de estos análisis se ha obtenido un primer componente principal (que explica entre un 38-45% de la varianza total según el análisis) con una asociación directa entre R y nutrientes (NO_3 y SiO_3), e inversa a su vez respecto a la temperatura y/o salinidad.

La interpretación de este resultado se relaciona con la observación anteriormente citada de altos valores de R en invierno (mayor concentración de nutrientes, baja temperatura y salinidad por aportes continentales y lluvia) en contraste con los períodos de proliferación tras los episodios de afloramiento en primavera y verano. La distribución temporal del primer componente obtenido en cada análisis es muy similar a la mostrada por NO_3 y SiO_3 , observándose con mayor claridad los incrementos debidos a los afloramientos de primavera y verano a medida que aumenta la profundidad (Figuras 8b, 9b y 10b).

Las conclusiones de este trabajo, son por tanto, que la estimación de la clorofila a a partir de fluorescencia in vivo es más precisa en superficie (0-5 m), mientras que a mayor profundidad existen interferencias debido probablemente a factores ambientales no contemplados en este estudio (radiación incidente y estado fisiológico del fitoplancton). Por otro lado, las variaciones en R dependen principalmente de la evolución en las condiciones oceanográficas, dado que éstas son las que rigen el desarrollo y la sucesión anual de diferentes poblaciones fitoplanctónicas.

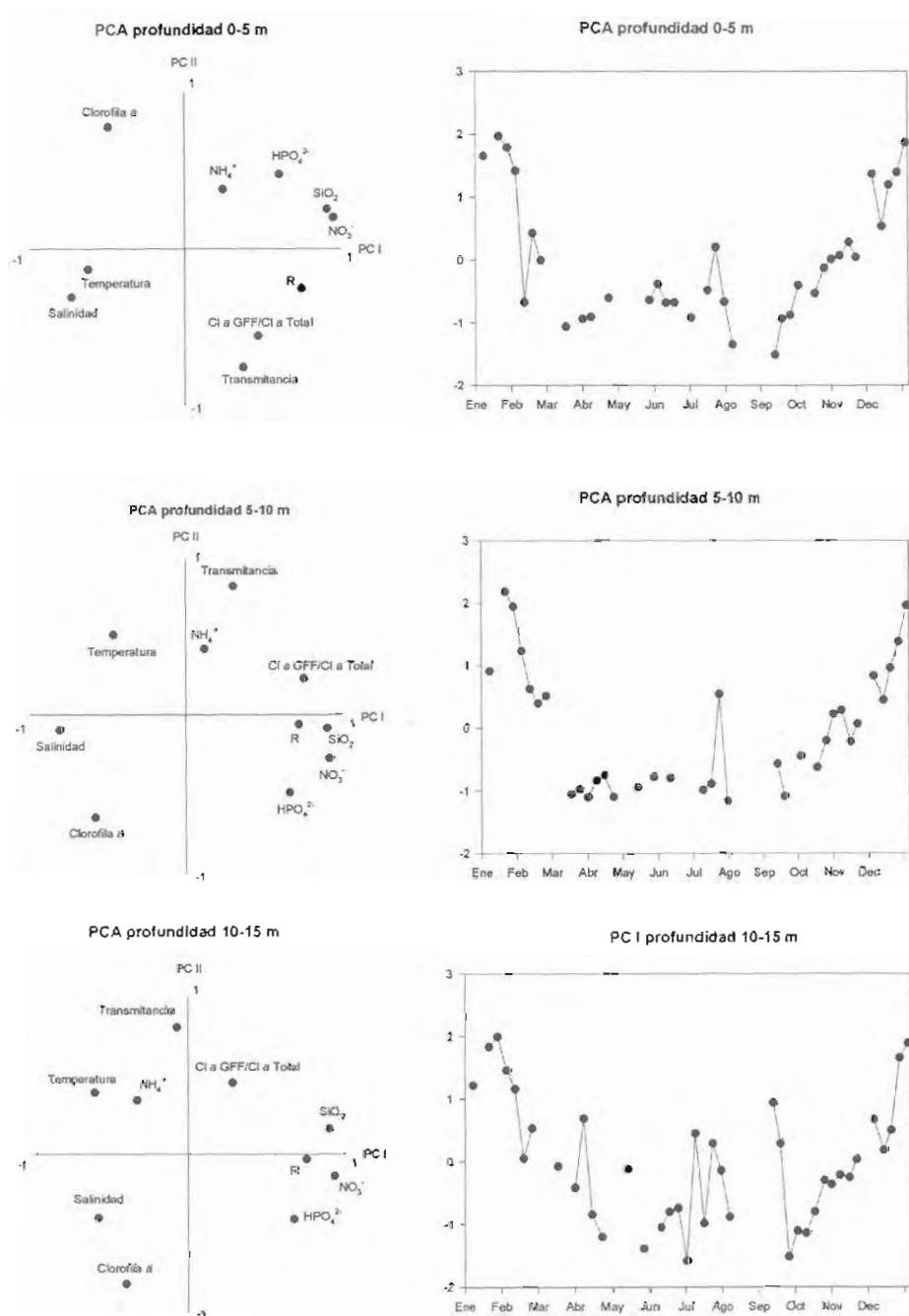


Figura 8. Análisis de componentes principales en cada rango de profundidad y variación temporal del primer componente extraído en cada análisis.

BIBLIOGRAFÍA

- Alpine A.E. y Cloern J.E. Differences in in vivo fluorescence yield between three phytoplankton size classes (1985). *Journal of Plankton Res.* Vol 7, nº3, pp 381-390.
- Estrada M., Marrasé C. y Salat J. In vivo fluorescence/chlorophyll a ratio as an ecological indicator in oceanography (1996). *Scientia Marina*, 60 (Supl 1): 317-325.
- Falkowski P. and Kiefer D.A. Chlorophyll a fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass (1985). *Journal of Plankton Res.* Vol 7, nº5, pp 715-731.
- Loftus M.E. y Seliger H.H. Some limitations of the In vivo fluorescence technique (1975). *Chesapeake Science*. Vol 16, nº 2, pp 79-82.
- Strass V. On the calibration of large-scale fluorometric chlorophyll measurements from towed undulating vehicles (1990). *Deep Sea-Res*, Vol 37, nº3, pp 525-540.
- Uehlinger U. An in situ pulse light fluorometer for chlorophyll determination as a monitor for vertical and horizontal phytoplankton distribution in lakes (1985). *Journal of Plankton Res.* Vol 7, nº5, pp 605-615.

NUEVAS PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS A PROLIFERACIONES FITOPLANCTÓNICAS EN LA COSTA MEDITERRÁNEA

J. Camp, M. de Torres*, M. Masó y E. Garcés.

Institut de Ciències del Mar, Pg. Joan de Borbó, s/n, 08039 Barcelona, SPAIN

*Junta de Sanejament, Generalitat de Catalunya, Provença, 204-208 08036 Barcelona.

El Mediterráneo ha sido considerado, tradicionalmente, como un mar pobre en nutrientes y en consecuencia, poco favorable para el desarrollo de mareas rojas. La asunción sin reservas de patrones generalistas, junto con la escasa atención que han merecido las condiciones fisicoquímicas de las aguas litorales próximas, exceptuando las estuáricas, han perpetuado una visión sesgada del problema que conviene revisar.

El Mediterráneo es realmente un mar pobre en nutrientes en la mayor parte de su zona fótica, durante la mayor parte del año. Si nos ceñimos a las aguas costeras, entendiendo como tales las que cubren las plataformas continentales, el panorama no cambia mucho, pero sí lo hace radicalmente cuando consideramos la franja de aguas someras que están en contacto directo con el continente. Así, si los valores típicos de las aguas superficiales mediterráneas para DIN, PO₄ y SiO₄ son menores de 1, 0.1 y 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$, la mayor parte del año, en las aguas someras en contacto con la costa, estos valores aumentan entre medio y más de un orden de magnitud. Aunque hay una notable variabilidad espacio-temporal los valores medios pasan a ser, respectivamente, de 42, 1.7 y 7.4 y los más frecuentes en torno a 5, 0.3 y 3.2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (datos de la Junta de Sanejament de la Generalitat de Catalunya procedentes del programa de vigilancia y control ambiental de las aguas litorales, periodo 93-98).

La relación entre nutrientes en aquellos aspectos que parecen de relevancia para las proliferaciones algales nocivas (PAN), es también digna de mención. Las relaciones N/P indican generalmente un cierto déficit de P (o al menos, un no exceso de N) siendo su valor promedio, próximo a 20, con una distribución irregular a lo largo del litoral. En la mayor parte del mismo son frecuentes valores entre 20 y 50, que indican déficit de P, mientras que en tramos costeros con elevada demografía, como la comarca del Barcelonés (alrededor de 3 10^6 habitantes en 30 km de costa) los valores de la relación N/P pueden ser entre 5 y 10. Las relaciones DIN/Si están habitualmente por encima de 1, con un valor promedio cercano a 5 que pone de manifiesto una notable ventaja teórica de las proliferaciones de dinoflagelados frente a las de diatomeas.

En resumen, las aguas litorales próximas del Mediterráneo tienen una cantidad apreciable de nutrientes con una estequiometría favorable al desarrollo de dinoflagelados sobre diatomeas y con frecuente escasez de P, a priori, favorable a la generación de proliferaciones algales nocivas (que desviarían el exceso de capacidad reductora hacia la producción de mucílago, toxinas, etc, tópico en el que no entraremos).

Las cantidades de nutrientes apuntadas son capaces de generar una biomasa fitoplanctónica notable. Si aceptamos una relación en peso entre el limitante teórico habitual, el P, y la clorofila, del orden de 0.8, tendríamos unos valores potenciales de clorofila en las aguas próximas de la costa del orden de $7 \mu\text{g Chla l}^{-1}$, como valor más frecuente (mediana) y un valor medio de $40 \mu\text{g Chla l}^{-1}$. Evidentemente estos valores teóricos medios no se corresponden con los medidos en el campo que, en promedio, son de un orden de magnitud inferior, lo que nos indica que el fitoplancton se genera en otro sitio. Así pues, las aguas litorales próximas exportan hacia las aguas litorales más lejanas, capacidad productiva que se diluye en un espacio cada vez mayor. Algo parecido a lo que sucede en un estuario que en realidad no es más que un caso particular del litoral. En razón de sus características de sistema en equilibrio dinámico y sometido a gradientes debemos considerar, siempre que tratemos problemas de aguas costeras, las entradas o aportes, juntamente con las variables relacionadas con los tiempos de residencia y los tiempos de renovación, ya que sin ellos no se puede entender el sistema.

La antropización del litoral tiene consecuencias importantes sobre los dos aspectos fundamentales de la problemática que nos ocupa: los aportes y la dilución. Por una parte la elevada demografía va unida a un aumento de los vertidos de nutrientes que enriquecen notablemente las aguas costeras, y por otra, se genera al mismo tiempo una demanda de aguas tranquilas, es decir, confinadas, para distintos usos (espigones para protección de playas, diques, puertos, etc). Mas allá de las disquisiciones teóricas de lo que pueden representar 100 habitantes por metro lineal de costa, en la comarca del Barcelonés, excretando cada uno 1 kg de P al año, están las analíticas de las aguas costeras que reflejan la magnitud real de este efecto, y que ya hemos comentado. Respecto al confinamiento que se ha generado en las aguas basta repasar una aeroguía del litoral para verlo. Solo en Cataluña, en 400 Km de costa, existen más de 40 puertos y un número de obras costeras de menor magnitud que no contabilizamos, y esta ordenación no difiere mucho de la perpetrada en otras zonas del Mediterráneo noroccidental.

Un puerto o barrera física, no es igual en un mar con mareas débiles que en otro donde sean fuertes. Desde luego, no todo el intercambio entre el agua de un puerto y el mar se debe al forzamiento mareal, hay muchos otros factores, pero sólo por este efecto un puerto de profundidad media, próxima a los cuatro metros en la costa Atlántica, tendrá un tiempo medio de residencia del agua inferior a dos días, mientras que en la costa Mediterránea superará los veinte. Si relacionamos esto con las tasas de división habituales en los dinoflagelados, veremos que la problemática potencial es radicalmente distinta. Si unimos a esto la capacidad de las aguas confinadas de actuar como trampas de sedimentación, y la habilidad de muchos dinoflagelados para hacer quistes de resistencia, el escenario mediterráneo respecto a las proliferaciones algales nocivas, va tomando forma.

Frente a un modelo -GALLEGO- de generación de mareas rojas gobernado por fenómenos de mesoscala oceánica, y modificado localmente por factores de escala pequeña, tenemos el modelo -CATALAN- en el que la generación se daría por coincidencias de fenómenos de escala pequeña que pueden generalizarse en determinadas condiciones, dependientes de fenómenos de escala mediana. El modo como pueden interaccionar ambas categorías de fenómenos, realimentándose o resonando, (estamos pensando en el caso del *A. catenella* del verano de 1998 o en el de *G. impudicum* del verano de 1995) es un tema interesante que requiere mayor investigación.

Las consecuencias de la aceptación de este modelo son múltiples y de diversa índole, y se ajustan bastante bien a hechos reales observados, lo que constituye un criterio positivo para su asunción. Dejamos los aspectos más fundamentales, o teóricos, para otra ocasión y nos

ceñiremos a los mas inmediatos y tangibles.

El modelo de generación de mareas rojas a partir de fenómenos de mesoscala cuyo control principal se da a nivel planetario, implica una notable constancia temporal que redundará en el establecimiento de un conocimiento empírico, memoria histórica y cierta predictibilidad defensiva. Dicho de otra forma, en los lugares que hay mareas rojas desde siempre, la población ha evolucionado con ellas y las administraciones, si quieren hacerlo, tienen pautas con las que poder trabajar.

El modelo de generación a partir de fenómenos de escala pequeña, en su mayoría relacionados con la creciente presencia y acción humana, implica una situación nueva sobre la que no hay memoria ni tradición. La predictibilidad es baja y la concienciación de las administraciones es emergente, como el fenómeno mismo, considerando además el consiguiente desfase temporal que existe. Todo ello genera una situación transitoria de cierta indefinición que entre todos debemos intentar solucionar.

Desde la perspectiva práctica que nos ocupa, y relacionados directamente con la salud, tranquilidad y bienestar de las personas, hay una serie de hechos concretos y notables que merecen ser comentados:

- 1) desde finales de los 80, en que comenzó a vigilarse sistemáticamente el fitoplancton en la costa catalana, todos los fenómenos relevantes por su extensión y/o toxicidad para las personas y la vida acuática, han sido no convencionales. Es decir, no descritos anteriormente, recién descritos, descritos casi al mismo tiempo, relacionados con nuevas especies, etc.. Como ejemplos podemos citar la primera toxicidad de PSP en el Mediterráneo con *A. minutum*; la extensa marea roja de *G. impudicum* descrita en 1995; la mortalidad de peces y otros organismos por *G. corsicum* descrita en 1995; la descripción de las habilidades y comportamiento de *A. taylori* en el Mediterráneo en 1994; la primera toxicidad de PSP extensa, debida a *A. catenella* y comentada en este congreso, etc.. Algunos de estos acontecimientos han sido y son muy aparentes, y por tanto, no parece creíble que si existían desde siempre hubieran podido pasar desapercibidos en una costa en la que existe una cierta tradición de estudios fitoplanctónicos.
- 2) las actuaciones emprendidas en cada caso, en la costa catalana, se han basado en la asunción de un modelo de generación de mareas rojas en el Mediterráneo, a partir de interacciones concretas, en lugares concretos. El mismo sistema de monitoreo a través de los puertos es consecuencia de este enfoque, y hasta el momento los resultados son mucho mejores que los obtenidos con anteriores métodos de vigilancia si bien cabe, todavía, mejorarlos. La capacidad predictiva lograda ha sido consecuencia de una cierta fe en los modelos básicos expuestos y en mejoras sucesivas de los mismos. En cualquier caso, pensamos que para afrontar la problemática de las PAN en el Mediterráneo, o en cualquier otro sitio, se necesita algo más que programas de monitoreo rutinarios carentes del respaldo conceptual adecuado.
- 3) los sectores de la Administración que trabajamos directamente en estos temas en Cataluña (CSIC, Departament de Medi Ambient y Departament de Agricultura, Ramaderia i Pesca) hemos tomado conciencia de la importancia y gravedad que las PAN tienen también en el Mediterráneo, y por ello, hemos establecido diversos convenios de colaboración. No obstante, existen todavía ciertas disfunciones (vacíos competenciales, fallos de comunicación y coordinación entre sectores de la Administración, etc.) que

ponen en peligro la salud de las personas y generan elevados costes para la Administración.

Como ejemplos de peligro para la salud podemos citar la pesca y comercialización ilegal de mejillones extraídos de algunos puertos con toxicidad elevada por PSP, que siendo una actividad prohibida legalmente, no es objeto de control sanitario. Otro ejemplo sería la posibilidad de que un mejillón de roca, con elevados niveles de PSP, sea consumido directamente por algunos usuarios de las playas, a quienes nadie tiene obligación de prevenir puesto que llevan a cabo una actividad ilegal en Cataluña, para la que no se ha desarrollado ningún programa de vigilancia ni de información.

Como ejemplos de elevados costes para la Administración podríamos citar las obras de búsqueda de pozos negros y emisarios ocultos, que expliquen la aparición de "manchas de aguas residuales" en ciertas playas, varios años después de que se haya descrito y publicado el origen fitoplanctónico de las mismas. Otro caso sería el requerimiento por delito ecológico al responsable de la empresa del saneamiento de las playas en las que prolifera *A. taylor*. Y finalmente, también mencionar las importantes implicaciones que estas proliferaciones pueden ocasionar en el sector turístico.

Hasta el momento, estas problemáticas se han resuelto merced a la buena disposición de personas que han actuado bajo su responsabilidad, mas allá de sus atribuciones, y bordeando el enfrentamiento con sectores legalistas de las mismas administraciones. Seguir confiando en estos procedimientos nos parece tentar a la suerte. Por ello en la Comunidad Autónoma de Cataluña actualmente nuestros esfuerzos se dirigen a la creación de un sistema estable y coordinado, que trate toda esta problemática típica Mediterránea dentro de un contexto más amplio de control del medio litoral.

Esperamos en la próxima Reunión Ibérica dar buenas noticias al respecto.

EL PROYECTO "HARMFUL ALGAE EVENT DATA BASE" (HAEDAT)

Angeles Aguilera

COIHEO Centro Científico y de Comunicación sobre Algas Nocivas. Centro Oceanográfico de Vigo. Cabo Estay-Carido.

Apdo. 1552. 36080 Vigo.

Desde 1987 el Working Group on Harmful Algae Bloom Dynamics (WGHABD) que pertenece al International Council for the Exploration of the Sea (ICES) ha estado elaborando informes anuales que recogen, entre otras cosas, los principales episodios tóxicos ocurridos a lo largo del año en cada uno de sus países miembros. Dichos informes, denominados Informes Nacionales, siguen un formulario común que debe ser cumplimentado por los representantes de cada país y remitido al grupo de trabajo.

Debido al creciente interés que las microalgas tóxicas están despertando, en 1997 se propuso el desarrollo de una base de datos que, aprovechando los recientes avances en el terreno de la informática y la difusión de información (Internet), reuniera los datos recogidos en dichos informes. De esta manera surgió el proyecto HAEDAT (Harmful Algae Event Database), cuyo principal propósito es crear un soporte informático que permita almacenar datos relacionados con episodios tóxicos al mismo tiempo que facilite su la consulta y el posterior análisis de los mismos.

Dicho grupo acordó definir como episodio tóxico cualquier discoloración del agua causada por la presencia masiva de alguna microalga tóxica, cualquier aumento en la concentración de una especie tóxica por encima de los niveles normales o bien, cualquier episodio donde personas, animales u otros organismos hubieran sido afectados por alguna toxina producidas por microalgas.

A partir de entonces se han seguido diversos pasos para el desarrollo de dicha base de datos. En primer lugar se estudiaron los formularios que componían los Informes Nacionales llegándose a la conclusión de que, aunque la información se encontraba claramente dividida en diferentes áreas, es necesario que dicha subdivisión se hiciera de manera más detallada. Por ese motivo, durante la última reunión del WGHABD celebrada en Alemania en 1999 se acordó modificar el cuestionario sobre el que se basan los Informes Nacionales de manera que se facilitará en gran medida el traspaso de los datos a la base de datos así como su análisis.

El nuevo cuestionario fue diseñado teniendo en cuenta los posibles intereses científicos y de administración que las personas que trabajan en este campo pudieran tener. De la misma manera intenta facilitar la cumplimentación del mismo a los encargados de elaborar los Informes Nacionales anuales. La información requerida es introducida en "cajas" o "campos" bien definidos, asimismo se permite completar el informe con datos adicionales en forma de textos, archivos (gráficos, mapas...) y uniones con otras páginas Web. Lógicamente dicho cuestionario tendrá que pasar por un período de prueba, pero pensamos que pasado dicho período la información sobre cada episodio tóxico se vera incrementada.

La información recogida en el cuestionario para cada Informe Nacional se subdivide en 6 formularios diferentes al ser introducida en la base de datos:

- Información General: la información recogida en este apartado pretende dar una visión global sobre el episodio tóxico así como la dirección de la persona (máximo dos) que recogió los datos y elaboró el informe. (Fig.1).
- Localización y Fecha: Cada episodio debe estar asociado a una fecha y localización determinada y precisa (Precise Day y Latitude and Longitude) y que debe corresponder con el momento de máxima concentración de la especie causante del episodio. En el caso de que no se conozca este dato, estos campos deben ser cumplimentados basándose en la información relacionada con la toxicidad como puede ser fecha de cierre de campos de cultivo. Dicha información será imprescindible a la hora de analizar datos o hacer búsquedas, sobre todo cuando se use información procedente de otras bases de datos. (Fig. 2).
- Microalgas: En este formulario se informará sobre la especie causante del episodio así como sobre otras especies presentes en la columna de agua al mismo tiempo. Asimismo, se incluirá cualquier información adicional sobre pigmentos o quistes. También está prevista la posibilidad de incluir imágenes de las especies en caso de que se desee (Fig.3).
- Condiciones Medioambientales: Aquí se incluye la información relacionada tanto con las condiciones medioambientales (Temperatura, salinidad, turbidez....) como con los nutrientes presentes durante el episodio. De la misma manera se puede encontrar datos sobre la columna de agua, el tiempo y sobre el origen del bloom (Fig. 4).
- Efectos Tóxicos: Este subformulario hace referencia a las toxinas detectadas así como a las decisiones administrativas, tales como cierres de zonas de cultivo, que se tomaron durante el episodio si es que las hubo. También se recogen los datos correspondientes a las pérdidas económicas y biológicas. (Fig.5).
- Información Complementaria: La persona que elabora el informe puede adjuntar en este subformulario cualquier información adicional que desee en forma de texto, web-link gráficos, archivos etc.. También se hace referencia a episodios de iguales características que se han dado en años anteriores o se puede adjuntar bibliografía relativa al episodio. (Fig.6).

En la actualidad HAEDAT cuenta con más de 850 informes desde 1987 correspondientes a 18 países miembros del ICES. Dichos informes podrán ir añadiéndose a la base de datos a lo largo de todo el año, sin necesidad de esperar a la reunión anual del WGHABD. Para ello habrá que remitir el informe a la Oficina de la COI situada en el IEO de Vigo a través de la cual será incluido. De la misma manera se podrán actualizar los informes ya existentes de años anteriores mediante el mismo procedimiento.

Hay que hacer constar que la información contenida en cada uno de los informes individuales varía mucho dependiendo de cada país. La intensidad de los sistemas de monitoring, el número de estaciones, de muestras recogidas y analizadas e incluso del tipo de análisis que se llevan a cabo con cada muestra son también muy variables, por lo que no existe una relación proporcional entre el número de episodios detectados y la incidencia real de toxicidad en una región dada. Es más, las regiones que tienen numerosos episodios tóxicos detectados pero que poseen un buen programa de monitoring y de administración son las que, probablemente, tengan menos riesgo de intoxicaciones ya que la toxicidad está muy controlada. Por el contrario, el escaso número de informes sobre este tipo de eventos puede indicar un mal control de este aspecto sanitario, pudiendo llegar a representar

problemas de salud pública.

La base de datos será accesible via Internet, mediante las direcciones de la página Web de la COI y del ICES y pasado un periodo de prueba se espera que, para finales de 1999, se haga extensiva a otros países que no pertenezcan al ICES y que tengan un programa de monitoring bien desarrollado.

Microsoft Access - (General form - Formulario)

Archivo Edición Ver Insertar Formato Registros Herramientas Vezgana ?

EVENT No.: COUNTRY:

GENERAL INFORMATION | LOCATION AND DATE | MICROALGAE | ENVIRONMENT | HARMFUL EFFECTS | COMPLEMENTARY INFORMATION

Indicate the nature of the reported event:

WATER DISCOLORATION

HIGH PHYTO CONCENTRATIONS

SEAFOOD TOXIN

MASS MORTALITIES

FOAM/MURLAGES IN THE COAST

OTHER

Is this report the outcome of a monitoring programme?

Has this event occurred before in this location?

Indicate the approximative duration of the event (days OR months):

DAYS: 0 MONTHS: 0

Individual to contact:

Additional individual to contact:

If you are not in the list please provide your name, institution, address and contact numbers (Phone, fax and e-mail)

Registro: 14 de 932

Vista Formulario

Inicio Libros - Microsoft Outlook Microsoft Access - [G... Microsoft Word - Documen 10.29

Figura 1: Formulario correspondiente a Información General.

Microsoft Access - (General form - Formulario)

Archivo Edición Ver Insertar Formato Registros Herramientas Vezgana ?

EVENT No.: COUNTRY:

GENERAL INFORMATION | LOCATION AND DATE | MICROALGAE | ENVIRONMENT | HARMFUL EFFECTS | COMPLEMENTARY INFORMATION

PRECISE DAY and PRECISE LOCATION (Geographical coordinate) OF THE REPORTED EVENT:

Every event must be associated to a PRECISE DAY (Date of the event) and a PRECISE GEOGRAPHICAL COORDINATE (Latitude and longitude). These informations are of great importance in order to favour future data analysis, especially when using information from other data bases.

PRECISE DAY: DATE OF EVENT: PRECISE LOCATION: N-S-E-W 00° 00.0' LATITUDE LONGITUDE

LOCATION INFORMATION: REGION (state, province...) REGION No. (if any; consult your country representative) LOCATION (City, Bay...) SURFACE km2: ADDITIONAL LOCATION INFORMATION:

GRAPHICAL SUPPORT (map of area)

DATE INFORMATION: INITIAL DATE: FINAL DATE: ADDITIONAL DATE INFORMATION:

Registro: 14 de 932

Vista Formulario

Inicio Libros - Microsoft Outlook Microsoft Access - [G... Microsoft Word - Documen 10.29

Figura 2: Formulario correspondiente a Localidad y Fecha.

Microsoft Access - [General form : Formulario]

Archivo Edición Ver Insertar Formato Registros Herramientas Ventana ?

EVENT No: _____ COUNTRY: _____

GENERAL INFORMATION | LOCATION AND DATE | MICROALGAE | ENVIRONMENT | HARMFUL EFFECTS | COMPLEMENTARY INFORMATION

CAUSATIVE ORGANISM UNKNOWN

If the species/genus is not included in the search list, please write its name under 'Comments'.
The maximum cell concentration should be provided herein and should correspond to the precise day and location.

CAUSATIVE SPECIES

Event No	CAUSATIVE SPECIES/GENUS	TAXONOMICAL CLASS	(Cells/L)	COMMENTS

Registros: 1 de 1 de 1

ADDITIONAL SPECIES

EVENT No	SPECIES/GENUS	TAXONOMICAL CLASS	(Cells/L)	COMMENTS

Registros: 1 de 1 de 1

PIGMENT ANALYSIS: _____

CYSTS: _____

PICTURE OF ORGANISM: _____

ADDITIONAL MICROALGAE INFO: _____

Registros: 1 de 932 de 932

Vista Formulario

Inicio Libros - Microsoft Outlook Microsoft Access - [G... Microsoft Word - Documen... 10:30

Figura 3: Formulario correspondiente a Microalgas.

Microsoft Access - [General form : Formulario]

Archivo Edición Ver Insertar Formato Registros Herramientas Ventana ?

EVENT No: _____ COUNTRY: _____

GENERAL INFORMATION | LOCATION AND DATE | MICROALGAE | ENVIRONMENT | HARMFUL EFFECTS | COMPLEMENTARY INFORMATION

ENVIRONMENTAL CONDITIONS

The information herein provided should correspond to the environmental conditions recorded at the precise location and day of the event, corresponding to the maximum cell concentration recorded for the causative species. Complementary information can be if possible provided in the 'Additional Environmental Information' box.

WEATHER: _____

WATER VERTICAL STRUCTURE: _____

TEMPERATURE (°C): _____

TURBIDITY (Secchi disk m): _____

TURBIDITY (NTU): _____

pH: _____

OXYGEN CONTENT (µM/kg): _____

OXYGEN SATURATION %: _____

SALINITY (psu): _____

WIND DIRECTION: _____

WIND VELOCITY: 0

CURRENT DIRECTION: _____

CURRENT VELOCITY: 0

Please, if available, indicate here maximum/minimum temperature and salinity recorded during the whole duration of the event:

MAXIMUM TEMPERATURE (°C): _____

MINIMUM TEMPERATURE (°C): _____

MAXIMUM SALINITY (psu): _____

MINIMUM SALINITY (psu): _____

NUTRIENT CONCENTRATION

NUTRIENT	NUTRIENT CONCENTRATION

Registros: 1 de 1 de 1

ALGAL BLOOM

LOCATION IN WATER COLUMN: _____

ADDITIONAL ENVIRONMENTAL INFORMATION: _____

BLOOM ADVECTED

BLOOM IN SITU

ADVECTED/IN SITU COMMENTS: _____

Registros: 1 de 932 de 932

Vista Formulario

Inicio Libros - Microsoft O... Microsoft Acc... Microsoft Word - D... Dibujo - Pant... 10:36

Figura 4: Formulario correspondiente a Condiciones Medioambientales

Microsoft Access - [General form : Formulario]

Archivo Edición Ver Insertar Formato Registros Herramientas Ventana 2

EVENT No: _____ COUNTRY: _____

GENERAL INFORMATION | LOCATION AND DATE | MICROALGAE | ENVIRONMENT | HARMFUL EFFECTS | COMPLEMENTARY INFORMATION

Has the event affected?

HUMANS BIRDS FISH BENTHIC LIFE

OTHER TERRESTRIAL AQUATIC MAMMALS SHELLFISH PLANKTONIC LIFE

Has any toxicity been detected?

ASSOCIATED SYNDROM UNEXPLAINED TOXICITY

If intoxications occurred, please indicate the species implicated in the transmission of toxins (Transvectors):

TOXIN ASSAY INFORMATION (If available, indicate in section TOXIN CONTENT-TOXICITY any quantitative or qualitative measure)

SPECIES CONTAINING THE TOXIN	TOXIN TYPE	TOXIN	TOXIN CONCENTRATION (ppm/100 g)	ASSAY TYPE	USE OF A KIT
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Registros: 14 de 1 de 1

EXTENT OF THE EFFECT (qualification of biological damage: animal deaths...)

ECONOMIC LOSSES (production value, direct loss, indirect loss...)

MANAGEMENT DECISION

ADDITIONAL HARMFUL EFFECT INFORMATION

Registros: 14 de 932 de 932

Vista Formulario

Figura 5: Formulario correspondiente a Efectos Nocivos.

Microsoft Access - [General form : Formulario]

Archivo Edición Ver Insertar Formato Registros Herramientas Ventana 2

EVENT No: _____ COUNTRY: _____

GENERAL INFORMATION | LOCATION AND DATE | MICROALGAE | ENVIRONMENT | HARMFUL EFFECTS | COMPLEMENTARY INFORMATION

PREVIOUS OCCURRENCES IN THIS REGION

Are there any biological samples available for further analysis? Please indicate the type of sample.

ADDITIONAL EVENT INFORMATION (text)

ADDITIONAL EVENT INFORMATION (file):

ADDITIONAL EVENT INFORMATION IN THE WEB (web links):

EVENT RELATED BIBLIOGRAPHY

Please write here any comments to improve this form:

Registros: 14 de 932 de 932

Vista Formulario

Figura 6: Formulario correspondiente a Información Complementaria.

GRUPO DE TRABAJO SOBRE SEGUIMIENTO DE FITOPLANCTON Y ACTUALIZACIÓN DE ESPECIES TÓXICAS Y NOCIVAS DEL LITORAL IBÉRICO

Durante la reunión se revisaron las especies del listado de la IV Reunión Ibérica celebrada en S. Carles de la Ràpita en 1995. Se acordó considerar *D. skagii*, *D. dens* y *D. diegensis* "formas pequeñas" de *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata*, respectivamente y *Alexandrium lusitanicum* sinónimo de la especie *Alexandrium minutum*.

Para la actualización de la lista se decidió agrupar las especies en las siguientes categorías:

- Especies tóxicas de efectos probados en aguas ibéricas.
- Especies tóxicas de efectos por probar en aguas ibéricas.
- Especies nocivas de efectos probados en aguas ibéricas.
- Especies nocivas de efectos por probar en aguas ibéricas.

Se catalogaron como especies tóxicas aquellas que producen toxinas que pueden ocasionar algún síndrome de intoxicación en el hombre y, especies nocivas, las que pueden tener efectos negativos sobre la fauna marina o desencadenar pérdidas socioeconómicas (discoloraciones, espumas, etc). Dentro de los grupos de especies tóxicas y nocivas de efectos probados, sólo se han contemplado aquellas cuyos efectos fueron positivos, no incluyendo especies de toxicidad probada sin efectos.

En el listado figura la distribución de las especies en cada una de las comunidades (Galicia, Portugal, Andalucía atlántica y mediterránea, Valencia, Cataluña y Baleares).

Los datos para la elaboración de la lista fueron facilitados por:

Santiago Fraga	Galicia
M ^a Antonia Sampayo	Portugal
Luz Mamán (*)	Andalucía
Cristian Gomis	Valencia
Magda Vila	Cataluña
Marga Puigserver	Baleares

(*) Los cultivos de las especies *Pseudo-nitzschia australis* y *Ostreopsis* sp de origen andaluz fueron llevados a cabo por Santiago Fraga en el Instituto Español de Oceanografía de Vigo.

ANEXO 1

Especies tóxicas		Distribución										Tox (+) Medio Natural										
Toxicidad probada en aguas ibéricas		Toxicidad					Tox (+) en cultivo					Tox (+) Medio Natural										
		G	P	AA	AM	V	C	B	G	P	AA	AM	V	C	B	G	P	AA	AM	V	C	B
<i>Alexandrium catenella</i>	PSP																					
<i>Alexandrium minutum</i> (incluido <i>lusitanicum</i>)	PSP																					
<i>Dinophysis acuminata</i> (<i>D. skagii</i>)	DSP																					
<i>Dinophysis acuta</i> (<i>D. dens</i>)	DSP																					
<i>Dinophysis sacculus</i>	DSP																					
<i>Gymnodinium catenatum</i>	PSP																					
<i>Ostreopsis</i> sp	¿ Palytoxina ?																					
<i>Prorocentrum lima</i>	DSP																					
<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	ASP																					
TOXICIDAD POR PROBAR EN AGUAS IBÉRICAS																						
O probada sin efectos																						
<i>Alexandrium tamarense</i>	PSP																					
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	PSP																					
<i>Alexandrium</i> spp	PSP																					
<i>Dinophysis caudata</i> (<i>D. diegensis</i>)	DSP																					
<i>Dinophysis</i> spp	DSP																					
<i>Gymnodinium</i> cf <i>breve</i>	NSP																					
<i>Lingulodinium polyedrum</i> (= <i>Gonyaulax polyedra</i>)	Yessotoxinas																					
<i>Prorocentrum concavum</i>	DSP																					
<i>Prorocentrum mexicanum</i>	DSP																					
<i>Prorocentrum minimum</i>	+ / cultivo																					
<i>Gonyaulax grindleyi</i> (= <i>Prorocentrum reticulatum</i>)	Yessotoxinas																					
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp	ASP																					

G Galicia
P Portugal
AA Andalucía atlántica
AM Andalucía mediterránea
V Valencia
C Cataluña
B Baleares

ANEXO 2

ESPECIES NOCIVAS		EFECTOS							DISTRIBUCIÓN							EFECTOS (+) EN CULTIVO							EFECTOS (+) M. NATURAL						
EFECTOS PROBADOS EN AGUAS IBÉRICAS		G	P	AA	AM	V	C	B	G	P	AA	AM	V	C	B	G	P	AA	AM	V	C	B	G	P	AA	AM	V	C	B
<i>Amphidinium carterae</i>	ICT	☺	☺																										
<i>Gyrodinium galatheanum</i>	ICT	☺	☺													☺													
<i>Heterosigma akashiwo</i>	ICT	☺	☺						☺	☺						☺							☺						
<i>Pyramnesium parvum</i>	ICT	☺	☺						☺	☺						☺							☺						
EFECTOS POR PROBAR EN AGUAS IBÉRICAS																													
O PROBADOS SIN EFECTOS																													
<i>Alexandrium taylori</i>	Discoloración																												
<i>Alexandrium mangaleji</i>	Discoloración																												
<i>Dityocha speculum</i>	Piscicida	☺	☺						☺	☺																			
<i>Dityocha</i> spp	Piscicida	☺	☺						☺	☺																			
<i>Fibrocapsa japonica</i>	ICT																												
<i>Gymnodinium mikimotoi</i> (= <i>G. nagasakiense</i>)	ICT	☺	☺						☺	☺																			
<i>Gymnodinium pulchellum</i>	ICT	☺	☺						☺	☺																			
<i>Gymnodinium cf breve</i>	ICT	☺	☺						☺	☺																			
<i>Gyrodinium corsicum</i>	ICT																												
<i>Gonyaulax polygramma</i>	Discoloración	☺	☺						☺	☺						☺	☺						☺	☺					
<i>Noctiluca scintillans</i>	Discoloración	☺	☺						☺	☺						☺	☺						☺	☺					
<i>Phaeocystis pouchetii</i>	Espumas	☺	☺						☺	☺						☺	☺						☺	☺					
<i>Phaeocystis</i> spp	Espumas	☺	☺						☺	☺						☺	☺						☺	☺					

Listado de participantes en el grupo de trabajo sobre fitoplancton

Camp Sancho, Jordi

Delgado Morán, Maximino

Fraga Rivas, Santiago

Garces i Pieres, Esther

Gomis Catalá, Cristian

González Ferrández, María

Lion Vázquez, Mónica

Lozano León, Antonio B.

Mamán Menéndez, Luz

Miranda Bamio, Mercedes

Moroño Mariño, Angeles

Moyà Niell, Gabriel

Orozco Conti, Fernando

Pazos González, Yolanda

Puigserver Salvà, Margalida

Reguera Ramírez, Beatriz

Rodríguez Hernández, Francisco José

Sampayo, María Antonia

Sordo Touza, Ignacio

Vila Reig, Magda

GRUPO DE TRABAJO SOBRE ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS E INTERCALIBRACIONES PARA ANÁLISIS DE BIOTOXINAS

Como punto de partida se reconoció la necesidad de la realización de estudios intercomparativos, coordinados por el Laboratorio Comunitario de Referencia de Vigo, en el ejercicio de sus funciones como Laboratorio Nacional de Referencia (NRL). La carencia de métodos de referencia para el análisis de la mayor parte de las toxinas marinas y la escasez de patrones de toxinas y materiales certificados de referencia aumenta la importancia de la realización de estos estudios para cumplir los objetivos de acreditación de los laboratorios y asegurar la calidad de los resultados analíticos.

En el área de la estandarización de los métodos se trataron diferentes aspectos del análisis de toxinas DSP, PSP y ASP:

DSP

La discusión se centró en el bioensayo en ratón de Yasumoto (1978), método empleado por la generalidad de los participantes en el grupo de trabajo.

Se destacó la dificultad que entraña el análisis de bivalvos de pequeño tamaño (ej: coquinas), en los que la obtención del número de hepatopáncreas necesario para el análisis supone un proceso largo y laborioso. Se consideró la alternativa de realizar la extracción sobre el cuerpo entero, lo que obligaría a realizar particiones líquido-líquido adicionales con diferentes solventes orgánicos como el éter dietílico o el diclorometano. El principal inconveniente del uso del éter dietílico es la solubilización parcial de las yessotoxinas en el mismo. En cuanto al diclorometano, si bien proporciona una adecuada solubilización de todo el conjunto de toxinas incluidas en el grupo DSP, presenta como inconveniente, además de su elevada toxicidad, la formación con ciertas matrices de agregados muy difíciles de redissolver en Tween. Por todo ello, se constató la necesidad de continuar en la búsqueda de estrategias para la resolución de estos problemas.

Las dificultades que encuentran algunos laboratorios para mantener permanentemente una colonia estandarizada de ratones dieron lugar a la discusión sobre la posibilidad de conservar en refrigeración los extractos orgánicos de las muestras hasta que pudiera realizarse su inoculación a los ratones en las condiciones adecuadas. Se consideró que serían necesarios estudios de estabilidad antes de dar por válida esta alternativa. La escasez de patrones y materiales de referencia para realizar estos estudios hacen aconsejable dirigir los esfuerzos a conseguir la infraestructura necesaria para disponer de una colonia estandarizada de ratones.

Para facilitar la obtención de un extracto final homogéneo en Tween, que permitiera la inoculación de al menos tres ratones, se sugirió aumentar a 25 g la cantidad de

hepatopáncreas a partir de la cual se inicia la extracción, y utilizar 5 ml de Tween para dicha solución de tal forma que se respetara la proporción de 5g de hepatopáncreas / ml tween (extracto) inoculado.

PSP

El grupo de trabajo centró la discusión en el bioensayo en ratón de la AOAC, reconociéndose la necesidad de realizar la estandarización del método, esto es el cálculo del factor de conversión (FC), así como el chequeo periódico del mismo, aún a pesar de las dificultades que pudieran existir para la obtención de patrón de saxitoxina.

Se expuso la dificultad que presentan ciertas matrices que forman espumas durante el proceso de extracción, (ej: erizos de mar, etc.) Se sugirió como posible solución la utilización de antiespumantes, previa comprobación de su influencia en los resultados.

ASP

El grupo de trabajo centró la discusión en analizar las diferencias que pudieran producirse en los resultados de los análisis como consecuencia de utilizar el método de Lawrence (extracción en caliente en ácido Clorhídrico 0.1 N) o el método de Quilliam (extracción en frío en metanol : agua).

Se discutieron con detenimiento las ventajas e inconvenientes de ambos métodos, discrepando los participantes en la valoración de los mismos. Algunos participantes se mostraron satisfechos con su experiencia en la aplicación en rutina del método de Lawrence mientras que otros expresaron que en su experiencia habían encontrado recuperabilidades más altas y extractos más estables utilizando el método de Quilliam.

La experiencia canadiense, primer país afectado por episodios ASP , y primero en establecer regulaciones para su control sanitario, se aportó como ejemplo de utilización conjunta de ambos métodos. Como método de screening se utiliza el procedimiento de extracción en caliente en ácido Clorhídrico 0.1N y cuando se detectan cantidades significativas de ácido domoico (del orden de $5 \mu\text{g} / \text{g}$) se utiliza el procedimiento de extracción en frío con metanol:agua.

LISTA DE PARTICIPANTES

PORTUGAL

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR)

Avda. de Brasília
1400 LISBOA
Tlfn: 351 1 3027125
Fax: 351 1 3015941

- Cunha Viana Gomes, Susana María
- M. Sampayo, María Antonia Email: asampayo@ipimar.pt
- Teixeira Pinto, Ana Paula
- Vale, Paulo Email: pvale@ipimar.pt

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Avda. Padre Cruz
1699 LISBOA
Tlfn: 351 1 7519393
Fax: 0351 1 7590441
Email: lmeinsa@mail.telepac.pt

- Pereira, Paulo

ANDALUCÍA

Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección General de Pesca

C/ Tabladilla, s/n
41013 SEVILLA
Tlfn: 955032300
Fax: 955032142

- Márquez Pascual, Ildefonso Email: imarquez@cap.junta-andalucia.es
- Manzano Harriero, José Carlos Email: cmanzano@cap.junta-andalucia.es

Consejería de Agricultura y Pesca. Delegación Provincial de Huelva

CICEM "Agua del Pino"
Ctra. Cartaya, s/n
Apartado 104
21071 CARTAYA (HUELVA)
Tlfn: 959399104
Fax: 959399292

- Morales Cañavate, Jesús Email: jmorales@cica.es
- Caballos Villar, Mónica Email: mcaballo@cica.es

Consejería Agricultura y Pesca Delegación Provincial de Málaga

Avda. de la aurora, 47
29002 MÁLAGA
Tlfn: 952329500
Fax: 952312094

- López Linares, José Ignacio Email: jill@dpma.cap.junta-andalucia.es

Consejería de Salud. Dirección General de Salud Pública y Participación

Avda. de la Innovación, s/n. Edificio Arena, 1
41020 SEVILLA
Tlfn: 955006300
Fax: 955006329

- Conejo Díaz, José Antonio
- Sánchez-Laulhé Ollero, Rosario Email: spcrsl@csalud.junta-andalucia.es

Consejería de Salud. Delegación Provincial de Málaga

Avda. Muelle de Heredia, 34
29001 MÁLAGA
Tlfn: 952 129400

- Arbaizar Ruiz de Dulanto, Angel

Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía (D.a.p)

- Delegación de Sevilla

C/ Bergantin, 39
41012 SEVILLA
Tlfn: 954938115
Fax: 954938110

- Aguilar Perea, Manuel Email: maguilar@dap.es

- Delegación de Huelva

Laboratorio "El Rompido"
CICEM Aguas del Pino, Ctra. Punta Umbría-Cartaya s/n
21459 CARTAYA
Tlfn: 959504219
Fax: 959504219
Email: rompido@dap.es

- Marco Mirallas, José Javier
- Ocaña García-Donas, Asunción
- Fernández Fuentes, Lourdes
- Mamán Menéndez, Luz

- Delegación de Cádiz

C/ Buen Aire, 26
11201 ALGECIRAS
Tlfn: 956 652527
- Hernandez Guillén, David

- Delegación de Málaga
Parque Tecnológico de Andalucía
Centro de Empresas
Avda/Juan López Peñalver s/n
29950 CAMPANILLAS (MÁLAGA)
Tlfn: 952028040
Fax: 952028299
Email: malaga@dap.es

- Sánchez Molina, Alberto
- Valle González, Luis Francisco

Universidad de Granada. Departamento de Biología Vegetal

Campus Fuente Nueva, s/n
18071
Tlfn: 958 243268
Fax: 958 243254

- Sánchez Castillo, Pedro Email: psanchez@goliat.ugr.es

Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia. Departamento Bioquímica, Bromatología y Toxicología.

C/ Profesor García González, s/n
41012
Tlfn: 954 556762
Fax: 954 233765
Email: camean@fafar.us.es

- Cameán Fernández, Ana M^a. Email: camean@fafar.us.es

BALEARES

Universidad Illes Balears

Ctra. Valldemosa Km 7,5
07071 PALMA (MALLORCA)
Tlfn: 971172525
Fax: 971173184

- Moyá Niell, Gabriel Email: dbagmn0@clust.uib.es
- Puigserver Salvá, Margarita Email: dbamps4@ps.uib.es

FOA Ambiental, S.L.

C/ Licorers, 163 Mod. 16-18 A, Poligono Marratxí
07141 Marratxí (Mallorca)
Tlfn: 971 604727
Fax: 971 604720
Email: foaasl@lander.es

- Orosco Conti, Fernando

CATALUÑA

Ayuntamiento de Barcelona. Laboratorio Municipal de Barcelona

Avda. Drassanes, 13-15
08001
Tlfn: 93 4430610
Fax: 93 4430611

- Pellicer Fornatger, María Teresa

Instituto de Ciencias Marinas de Barcelona (C.S.I.C.)

Paseo Joan de Borbó, s/n
08139
Tlfn: 932216450
93 2126416
Fax: 932217340

- Camp Sancho, Jordi
 - Delgado Morán, Máximo
 - Garces i Pieres, Esther
 - Masó Agustina, Mercedes
 - Vila Reig, Magda
- Email: maxi@icm.csic.es
Email: esther@icm.csic.es
Email: meme@icm.csic.es
Email: magda@icm.csic.es

GALICIA

ANFACO - CECOPESCA

Lagose - Mancotende (Campus Universitario de Vigo)
36310 VIGO
Tlfn: 986469303
Fax: 986469269

- Leira Sanmartín, Francisco
- Email: fleira@anfaco.cesga.es

Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura, Peirao de Vilaxoan.

36611 VILLAGARCÍA DE AROSA
Tlfn: 986 512322/20
Fax: 986 512300
Email: cccmm@futurnet.es

- Miranda Bamio, Mercedes
- Morón Mariño, Angeles
- Pazos González, Yolanda
- Salgado Blanco, Covadonga

Centro de Investigacións Mariñas. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura

Pedras de corón, s/n
36620 VILANOVA DE AROUSA
Tlfn: 986500155
Fax: 986506788

Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Física

Campus Sur, s/n
15706 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tlfn: 981 520829
Fax: 981 520829
Email: elnacho@usc.es

- Sordo Touza, Ignacio Email: elnacho@usc.es

Universidad de Santiago de Compostela. Instituto de Acuicultura

Campus Universitario Sur
15706 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tlfn: 981563100 Ext. 16054
Fax: 981547165

- Lozano León, Antonio B. Email: abllsul@isc.es

VALENCIA

Universidad de Alicante. Departamento de Biotecnología

Campus de San Vicente
SAN VICENTE DEL RASPEIG (ALICANTE)
Tlfn: 965903400 Ext. 2650

- González Ferrández, María Email: maria.gonzalez@ua.es

Institut d'Ecologia Litoral

Carretera de Benimagrell, nº5
03560 EL CAMPELLO (ALICANTE)
Tlfn: 965 657 690
670 056 105

- Gomis Catalá, Cristian Email: phyto@dip-alicante.es

ÍNDICE DE AUTORES

Aguilar, M.
Aguilera, A.
Alcober, J.
Alonso, A.
Álvarez, E.M.
Álvarez, M.J.
Alvito, P.
Andrinolo, D.
Araújo, F.
Arévalo, F.
Arias, J.
Ávila, E.

Bermúdez de la Puente, M.
Blanco, J.
Botana, L.M.
Botelho, M.J.
Bravo, I.

Caballos, M.
Cacho, E.
Camp, J.
Carballal, E.
Castroman, B.

Delgado, M.

Fernández, L.
Fernández, M.L.
Fraga, S.
Franca, S.
Franco, J.
Franco, J.M.
Furones, D.

Gago, A.
Garcés, E.
Gomes, S.
Gomis, C.
González, M.
González-Gil, S.

Hernández, G.
Lastres, M.
Leão, J.M.
Leira, F.
Lozano, A.B.

Mamán, L.

Maneiro, J.
Marco, J.J.
Mariño, J.
Márquez, I.
Martínez, A.
Martínez, J.
Martínez-Taberner, A.
Martins, C.
Masó, M.
Míguez, A.
Molist, P.
Morales, J.
Moreno, O.
Moroño, A.
Moyá, G.

Ocaña, A.

Pazos, Y.
Pereira, P.
Pinto, A.P.
Piñeiro, N.
Puigserver, M.

Ramilo, I.
Ramon, G.
Reguera, B.
Rodríguez, F.
Rodríguez, J.A.
Rodrigues, S.

Salgado, C.
Sam-bento, F.
Sampayo, M.A.M.
Santamaría, M.
Santmarti, M.
Sintes, E.
Sordo, I.

Tavares, M.J.
Torres de, M.
Triñanes, J.A.

Vale, P.
Varela, J.
Vasconcelos, V.
Vieites, J.M.
Vieytes, M.R.
Vila, M.

Zapata, M.

ISBN 84-89802-88-2



9 788489 802889

P.V.P.
4.950 pt
29,75 €